



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2004/10/13
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2005/04/28
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2013/08/06
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2006/04/13
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2004/002602
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2005/037392
(30) Priorité/Priority: 2003/10/14 (FR0311992)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/12* (2006.01),
C07K 14/805 (2006.01), *C12P 19/34* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
ZAL, FRANCK, FR;
CHABASSE, CHRISTINE, FR;
ROUSSELOT, MORGANE, FR;
BAILLY, XAVIER, FR

(73) Propriétaires/Owners:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR;
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : PROCEDE DE DISSOCIATION DE LA MOLECULE D'HEMOGLOBINE EXTRACELLULAIRE D'ARENICOLA MARINA, CARACTERISATION DES CHAINES PROTEIQUES CONSTITUANT LADITE MOLECULE ET DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LESDITES CHAINES PROTEIQUES

(54) Title: METHOD FOR THE DISSOCIATION OF THE EXTRACELLULAR HAEMOGLOBIN MOLECULE OF ARENICOLA MARINA AND THE CHARACTERISATION OF THE PROTEIN CHAINS FORMING THE MOLECULE AND THE NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR SAID PROTEIN CHAINS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
28 avril 2005 (28.04.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/037392 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ : **B01D**(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal, Catherine** etc.; Grosset-Fournier & Demachy Sarl, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/002602(22) Date de dépôt international :
13 octobre 2004 (13.10.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0311992 14 octobre 2003 (14.10.2003) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE** [FR/FR]; 4, Place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ZAL, Franck** [FR/FR]; Saint Kirio, F-29600 Morlaix-Ploujean (FR). **CHABASSE, Christine** [FR/FR]; 75, Promenade du Rouge-Gorge, F-77176 Nandy (FR). **ROUSSELOT, Morgane** [FR/FR]; Brigneau, F-29350 Moëlan s/Mer (FR). **BAILLY, Xavier** [FR/FR]; 3, allée des Noisetiers, F-27180 Caugé (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR THE DISSOCIATION OF THE EXTRACELLULAR HAEMOGLOBIN MOLECULE OF <I>ARENICOLA MARINA</I> AND THE CHARACTERISATION OF THE PROTEIN CHAINS FORMING THE MOLECULE AND THE NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR SAID PROTEIN CHAINS

(54) Titre : PROCEDE DE DISSOCIATION DE LA MOLECULE D'HEMOGLOBINE EXTRACELLULAIRE D'ARENICOLA MARINA, CHARACTERISATION DES CHAINES PROTEIQUES CONSTITUANT LADITE MOLECULE ET DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LESDITES CHAINES PROTEIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a method of dissociating the extracellular haemoglobin molecule of annelids, e.g. *Arenicola marina*, which can be used to obtain the protein chains forming said molecule. The inventive method is characterised in that it comprises a step consisting in bringing an extracellular haemoglobin sample from annelids, e.g. *Arenicola marina*, into contact with at least one dissociating agent, e.g. a mixture containing dithiothreitol (DTT) or tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) hydrochloride or beta-mercaptoethanol and a dissociation buffer for a sufficient length of time in order to separate the protein chains from one another.(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.

WO 2005/037392 A2

PROCÉDÉ DE DISSOCIATION DE LA MOLÉCULE D'HÉMOGLOBINE EXTRACELLULAIRE D'*ARENICOLA MARINA*, CARACTÉRISATION DES CHAÎNES PROTÉIQUES CONSTITUANT LADITE MOLÉCULE ET DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CODANT POUR LESDITES CHAÎNES PROTÉIQUES

La présente invention a pour objet un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, ainsi que la caractérisation des chaînes protéiques constituant ladite molécule.

La présente invention a également pour objet la caractérisation des séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques susmentionnées, ainsi que le procédé de préparation de ces séquences nucléotidiques.

Le sang est un liquide complexe dont la fonction principale est de transporter l'oxygène et le gaz carbonique, afin d'assurer les processus respiratoires. C'est la molécule d'hémoglobine, que l'on trouve dans les hématies, qui assure cette fonction.

La molécule d'hémoglobine de mammifère est formée par l'assemblage de quatre chaînes polypeptidiques fonctionnelles semblables deux à deux (2 chaînes de globine de type α et 2 chaînes de globine de type β). Chacune de ces chaînes polypeptidiques possède la même structure tertiaire d'une molécule de myoglobine (Dickerson et Geis, 1983).

L'hème, site actif de l'hémoglobine, est un anneau protoporphyrinique tétrapyrrolique, contenant en son centre un unique atome de fer. L'atome de fer, fixateur de l'oxygène, établit 6 liaisons de coordinence : quatre avec les atomes d'azote de la porphyrine, une avec l'histidine proximale F8 et une avec la molécule d'oxygène lors de l'oxygénation de la globine.

On est actuellement confronté aux problèmes d'approvisionnement de sang, dus à la diminution des dons du sang par peur de contamination. Ainsi, la recherche de substituts sanguins s'est accélérée au cours des dernières années. On cherche à concevoir des substituts sanguins artificiels capables d'éliminer les risques de transmission de maladies infectieuses, mais également à s'affranchir des problèmes de compatibilité des groupes sanguins.

Jusqu'à présent, les principales voies de recherche concernent la synthèse de produits chimiques d'une part (Clark et Gollan, 1966) et la synthèse de produits biologiques d'autre part (Chang, 1957 ; Chang, 1964).

En ce qui concerne la première voie de recherche, on a utilisé les perfluorocarbones (PFC). Les PFC sont des produits chimiques capables de transporter l'oxygène et ils peuvent dissoudre une grande quantité de gaz, comme l'oxygène et le dioxyde de carbone.

Actuellement, on essaye de produire des émulsions de ces produits qui pourraient être dispersés dans le sang d'une façon plus efficace (Reiss, 1991 ; Reiss, 1994 ; Goodin et al., 1994).

L'avantage des PFC demeure dans leur capacité oxyphorique directement proportionnelle à la quantité d'oxygène se trouvant dans les poumons. Par ailleurs, en raison de l'absence de membrane à traverser, les PFC peuvent transporter l'oxygène plus rapidement vers les tissus. Toutefois, on ne connaît pas les effets à long terme de la rétention de ces produits dans l'organisme. Lorsque ces produits ont été utilisés pour la première fois comme substitut sanguin dans les années 1960 chez la souris (Clark et Gollan, 1966 ; Geyer et al., 1966 ; Sloviter et Kamimoto, 1967), les effets secondaires ont été très importants. Les PFC n'étaient pas éliminés de la circulation d'une façon satisfaisante et s'accumulaient dans les tissus de l'organisme, ce qui provoquait des œdèmes.

Dans les années 1980, on a testé une nouvelle version de PFC en phase clinique. Mais les problèmes de stockage, de coût financier, d'effets secondaires non négligeables et la faible efficacité de ce composé ont empêché l'extension de sa commercialisation (Naito, 1978 ; Mitsuno et Naito, 1979 ; Mitsuno et Ohyanagi, 1985).

Récemment, on a mis au point une nouvelle génération de PFC (PFBO perfluorooctylbromide). Un nouveau produit (Reiss, 1991) est en cours de test clinique aux Etats-Unis, mais on a déjà constaté qu'une augmentation de la quantité d'oxygène dans le sang peut engendrer une accumulation d'oxygène dans les tissus, ce qui est dangereux pour l'organisme (formation d'oxygène radicalaire de type superoxyde).

Ainsi, malgré les progrès réalisés au fur et à mesure, les effets secondaires de ces composés sont encore trop importants pour être commercialisés à grande échelle.

En ce qui concerne la deuxième voie de recherche, des chercheurs ont travaillé sur la mise au point de substituts sanguins en modifiant la structure de l'hémoglobine naturelle (Chang, 1957 ; Chang, 1997). Pour obtenir un substitut sanguin de type

hémoglobine modifiée, on utilise des hémoglobines synthétisées par des microorganismes génétiquement modifiés, ou d'origine humaine ou animale, notamment la molécule d'hémoglobine bovine. En effet, l'hémoglobine bovine est légèrement différente de l'hémoglobine humaine sur le plan immunologique, mais elle transporte plus facilement l'oxygène vers les tissus. Néanmoins, le risque de contamination virale ou de type encéphalopathie spongiforme reste toujours important.

Pour être fonctionnelle, l'hémoglobine doit être en contact avec un effecteur allostérique le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), présent uniquement à l'intérieur des globules rouges (Dickerson et Geis, 1983). De plus, sans le 2,3-DPG et d'autres éléments présents dans les globules rouges comme la méthémoglobine réductase, l'hémoglobine subit un processus d'auto-oxydation et perd sa capacité à transporter de l'oxygène ou du dioxyde de carbone.

On peut éliminer ces processus en modifiant la structure de l'hémoglobine, et plus précisément en stabilisant les liaisons faibles de la molécule tétramérique entre les deux dimères α et β (Chang, 1971). De nombreuses modifications ont été testées : liaison covalente entre deux chaînes α , entre deux chaînes β ou encore entre α et β (Payne, 1973 ; Bunn et Jandl, 1968).

On a également tenté de polymériser les molécules tétramériques ou de les conjuguer avec un polymère nommé polyéthylène glycol (PEG)(Nho et al., 1992). Ces modifications ont pour conséquence de stabiliser la molécule et d'augmenter sa taille, empêchant son élimination par les reins.

On a beaucoup étudié les Annélides pour leur hémoglobine extracellulaire (Terwilliger, 1992 ; Lamy et al., 1996). Ces molécules d'hémoglobine extracellulaire sont présentes chez les trois classes d'Annélides : Polychètes, Oligochètes et Achètes et même chez les Vestimentifères. Ce sont des biopolymères géants, constitués d'environ 200 chaînes polypeptidiques appartenant à 6 ou 8 types différents que l'on regroupe généralement en deux catégories. La première catégorie, comptant 144 à 192 éléments, regroupe les chaînes polypeptidiques dites "fonctionnelles" portant un site actif et capables de lier réversiblement l'oxygène ; ce sont des chaînes de type globine dont les masses sont comprises entre 15 et 18 kDa et qui sont très similaires aux chaînes de type α et β de vertébrés. La deuxième catégorie, comptant 36 à 42 éléments, regroupe les chaînes polypeptidiques dites de "structure" possédant peu ou pas de site actif mais permettant l'assemblage des douzièmes.

Les premières images obtenues sur des hémoglobines extracellulaires d'*Arenicole* (Roche et al., 1960) ont révélé des structures hexagonales. Chaque molécule d'hémoglobine est constituée de deux hexagones superposés (Levin, 1963 ; Roche, 1965) que l'on dit en "bicouche hexagonale" (hexagonal bilayer) et chaque hexagone est lui-même formé par l'assemblage de six éléments en forme de goutte d'eau (Van Bruggen et Weber, 1974 ; Kapp et Crewe, 1984), nommés structure globulaire creuse (hollow globular structure)(De Haas et al., 1996) ou "douzième". La molécule native est formée de douze de ces sous-unités, d'une masse moléculaire d'environ 250 kDa.

Ainsi, le brevet français n°2 809 624 concerne l'utilisation comme substitut sanguin d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, un Annélide Polychète de l'écosystème intertidal, ledit substitut sanguin permettant d'éliminer les problèmes de pénurie de dons.

Bien que l'architecture globale de l'hémoglobine de *Arenicola marina* soit connue, notamment grâce à son étude quaternaire fine par spectrométrie de masse (Zal et al., 1997), les séquences primaires des différentes chaînes protéiques qui la composent ne le sont pas.

Ainsi, la présente invention a pour but de fournir les séquences protéiques qui composent la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir les premières étapes de la synthèse *in vitro* d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* afin d'élaborer un substitut sanguin au moyen de procédés de biochimie et de biologie moléculaire.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir un procédé de préparation de la molécule d'hémoglobine, éventuellement simplifiée, par génie génétique, et ce afin notamment d'augmenter le stock de cette molécule dans le cadre d'une utilisation comme substitut sanguin.

La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.

La présente invention concerne un procédé d'obtention des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, et le cas échéant un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.

Par "hémoglobine extracellulaire", on désigne une hémoglobine non contenue dans les cellules et dissoute dans le sang.

L'expression "dissociation" désigne un traitement chimique capable de rompre les interactions faibles (hydrophobes, électrostatiques, hydrogènes...).

Par "tampon de dissociation", on désigne un liquide contenant un tampon permettant d'ajuster le pH et contenant des agents dissociants.

L'expression "agent dissociant" désigne un composé chimique capable de rompre les interactions faibles (hydrophobes, électrostatiques, hydrogènes...). Ledit agent dissociant est notamment choisi parmi : les ions hydroxydes, l'urée ou des ions hétéropolytungstates ou des sels de guanidinium ou du SDS (sodium dodécyl sulfate).

L'expression "réduction" désigne un traitement chimique capable de rompre les interactions fortes telles que les ponts disulfures.

L'expression "agent réducteur" désigne un composé chimique capable de rompre les interactions fortes telles que les ponts disulfures.

Les dix chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* comprennent 8 chaînes de type globine et 2 chaînes de type structure.

On rappelle que l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* d'une masse de 3648 ± 24 kDa est constituée de 198 chaînes polypeptidiques appartenant à 10 types différents regroupés en deux catégories :

- la première (156 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites "fonctionnelles" portant un site actif capable de lier réversiblement l'oxygène ; ce sont des chaînes de type globine dont les masses sont comprises entre 15 et 18 kDa ; ces chaînes sont très similaires aux chaînes de types α et β des vertébrés ; et

– la deuxième (42 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites de "structure" (ou "linker") possédant peu ou pas de site actif mais permettant l'assemblage des dodécamères ; ces chaînes ont des masses moléculaires comprises entre 22 et 27 kDa.

La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) et d'un tampon de dissociation, pendant environ une heure à trois semaines.

Un procédé de dissociation avantageux de l'invention est caractérisé en ce que le tampon de dissociation comprend un agent tamponnant à une concentration comprise d'environ 0,05 M à environ 0,1 M, notamment du Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane), de l'hepes, du phosphate de sodium, du borate de sodium, du bicarbonate d'ammonium ou de l'acétate d'ammonium, et 0 à 10 mM d'EDTA ajusté à un pH compris d'environ 5 à environ 12, et de préférence d'environ 7,5 à 12, le tout étant notamment ajusté à un pH compris d'environ 2 à 12, et de préférence d'environ 5 à 12.

De préférence, ledit tampon de dissociation comprend de l'EDTA à une concentration d'environ 1 mM ajusté à un pH d'environ 10, notamment avec une solution de soude 2N.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que les chaînes protéiques constituant ladite molécule sont obtenues par la réduction de quatre sous-unités par un agent réducteur, par exemple en présence de DTT, lesdites sous-unités étant elles-mêmes obtenues par mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec différents agents dissociants, notamment un tampon de dissociation.

La molécule native se dissocie en sous-unités sous l'action d'agents dissociants non réducteurs. Il n'y a donc pas rupture des liaisons covalentes. Toutefois, après l'action d'un agent réducteur (coupure des liaisons covalentes), les sous-unités sont réduites en chaînes polypeptidiques (chaînes protéiques constituées de l'assemblage d'acides aminés).

Les 4 sous-unités susmentionnées sont donc : les monomères, les dimères, les trimères et les dodécamères.

Les monomères sont des chaînes de globine.

Les dimères sous forme homo et hétérodimères sont des chaînes de structure.

Les trimères sont des assemblages covalents de trois chaînes de globine.

Les dodécamères sont constitués de 12 chaînes protéiques ; par exemple : 3 trimères + 3 monomères, 2 trimères + 6 monomères, 1 trimère + 9 monomères.

On peut donc obtenir les chaînes protéiques soit en une seule étape par réduction directe de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, soit en deux étapes, l'une consistant en la dissociation de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* en 4 sous-unités et l'autre en la réduction desdites 4 sous-unités en chaînes protéiques.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants utilisés pour obtenir les 4 sous-unités susmentionnées sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de base Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) et 0 à 10 mM d'EDTA ajusté à un pH compris d'environ 5 à environ 12, et de préférence d'environ 7,5 à environ 12, et
- une solution d'urée dont la concentration est comprise d'environ 0,1 M à environ 8 M, et est notamment égale à 3 M.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants pour obtenir les 4 sous-unités sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant 0,1 M de base Trisma et 1 mM d'EDTA ajusté à pH 10, et
- 3 M d'urée.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation et DE réduction tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants et réducteurs utilisés pour obtenir les chaînes protéiques sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de base Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) à un pH compris d'environ 8 à environ 9, et
- une solution d'urée dont la concentration est comprise d'environ 4 M à environ 8 M, et est notamment égale à 8 M, et
- 1 à 10% DTT

ou

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de bicarbonate d'ammonium à un pH compris d'environ 8 à environ 9, et
- 1 à 10% DTT

Le procédé de dissociation et de réduction de l'invention permet d'obtenir une composition contenant le mélange des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de couples d'amorces à partir des chaînes protéiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'isolement de chacune des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus,
- le microséquençage de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées par spectrométrie de masse et séquençage d'Edman, afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés, et
- la détermination des amorces dégénérées à partir des microséquences susmentionnées.

La première étape d'isolement des chaînes protéiques est notamment effectuée par chromatographie liquide en phase inverse et gel bidimensionnel à partir du mélange susmentionné comprenant les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine telles qu'obtenues selon le procédé de dissociation et de réduction de l'invention.

L'expression "microséquence" désigne des fragments de séquences protéiques.

Les microséquences susmentionnées peuvent provenir à la fois des extrémités C- et N-terminales mais aussi de séquences internes.

Les chaînes protéiques peuvent être obtenues par chromatographie liquide en phase inverse ou à partir de gel 2D à partir d'hémoglobine purifiée d'*Arenicola marina*. Chaque pic ou tache a été découpé et digéré par une protéase. Les peptides ainsi obtenus ont été extraits des gels et séparés par capLC (chromatographie liquide capillaire). Les fragments sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. D'autre part, chaque pic isolé par phase inverse a été analysé par séquençage d'Edman.

L'expression "amorces dégénérées" désigne des séquences nucléotidiques obtenues à partir de fragments de séquences protéiques. On parle d'amorces dégénérées en raison de la dégénérescence du code génétique (plusieurs codons pour 1 acide aminé).

La dernière étape de détermination des couples d'amorces dégénérées correspond à leur synthèse.

Cette étape permet d'obtenir à la fois des amorces sens et des amorces antisens.

La présente invention concerne également des couples d'amorces tels qu'obtenus selon le procédé tel que défini ci-dessus, lesdits couples étant notamment les suivants :

- a) *Amorce sens* : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG (SEQ ID NO : 21)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- b) *Amorce sens* : TGY GGN ATH CTN CAR CG (SEQ ID NO : 23)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- c) *Amorce sens* : AAR GTI AAR CAN AAC TGG (SEQ ID NO : 24)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- d) *Amorce sens* : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG (SEQ ID NO : 25)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- e) *Amorce sens* : AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA (SEQ ID NO : 26)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- f) *Amorce sens* : GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA (SEQ ID NO : 27)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine,

H représente A, C ou T.

La présente invention concerne également des couples d'amorces tels qu'obtenus selon le procédé tel que défini ci-dessus, lesdits couples étant notamment les suivants :

- a) *Amorce sens* : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG SEQ ID NO : 21
Amorce antisens : CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA SEQ ID NO : 28
- b) *Amorce sens* : AN TGY GGN CCN CTN CAR CG SEQ ID NO : 29
Amorce antisens : CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA SEQ ID NO : 28
- c) *Amorce sens* : AAR GTI AAR CAN AAC TGG SEQ ID NO : 24
Amorce antisens : CCA NGC NCC DAT RTC RAA SEQ ID NO : 30
- d) *Amorce sens* : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG SEQ ID NO : 25
Amorce antisens : CA NGC NYC RCT RTT RAA RCA SEQ ID NO : 31

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine,

D représente A, G ou T,

H représente A, C ou T.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, à partir des amorces telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il correspond à un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant une répétition d'au moins 30 fois du cycle constitué par les étapes suivantes :

- * la dénaturation, par chauffage, de l'ADNc monocaténaire codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de façon à dénaturer d'éventuelles structures secondaires et des reliquats d'ARN, ledit ADNc étant obtenu à partir d'ARNm, cette étape permettant d'obtenir des brins d'ADNc monocaténaires dénaturés,

- * l'hybridation des couples d'amorces tels qu'obtenus par le procédé tel que défini ci-dessus aux brins d'ADNc monocaténaires dénaturés susmentionnés à une température adéquate, pour obtenir des amorces hybridées, et

- * la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc par une polymérase à une température adéquate, à partir des amorces hybridées telles qu'obtenues à l'étape précédente.

L'ADNc codant pour les chaînes protéiques susmentionnées est obtenu à partir d'ARNm, ledit ARNm étant obtenu par purification à partir d'ARN totaux extraits sur des Arénicoles juvéniles en pleine croissance, lesdits Arénicoles juvéniles présentant un taux élevé de transcription des différents ARN messagers.

Si le cycle susmentionné est répété moins de 30 fois, l'amplification de l'ADN est réduite.

L'expression "éventuelles structures secondaires" désigne des appariements anarchiques entre deux séquences d'ADNc.

L'expression "dénaturation par chauffage de l'ADNc" désigne la rupture des appariements anarchiques entre deux séquences d'ADNc.

L'expression "hybridation à une température adéquate" désigne la reconnaissance par les amorces de leurs séquences complémentaires sur l'ADN matrice.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de préparation de séquences nucléotidiques selon l'invention est caractérisé en ce que :

- la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina* d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

- le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :

- * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina* d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

- * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 60°C, de préférence d'environ 50°C à environ 56°C,

- * une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et

- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

La réaction de PCR du procédé de l'invention est notamment effectuée en présence d'ADNc (5 à 20 ng), d'amorce sens (100 ng) et antisens (100 ng), de dNTP (200 µM final), de MgCl₂ (2 mM final), de tampon PCR (fourni avec la polymérase) (1 X final), de la Taq polymérase (1 unité) et d'eau (25 µl qsp).

Le procédé de préparation de séquences nucléotidiques susmentionné permet d'obtenir des séquences codantes partielles.

Une fois les séquences codantes partielles obtenues grâce aux expériences précédentes, l'amplification et le séquençage de la totalité de la séquence codante des ADNc de globines et du linker sont réalisés par 5' RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) PCR et selon les recommandations protocolaires de la fiche technique fournie par le fournisseur (5'/3' RACE kit, Roche).

La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les couples d'amorces utilisés sont tels que définis précédemment.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est : (GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG ; CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA) ou (GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, Y et N étant tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 30 secondes à une température égale à 56°C,
 - * une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 13,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1.

La séquence partielle SEQ ID NO : 13 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 13 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A2a. SEQ ID NO : 13 comprend 376 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A2a. SEQ ID NO : 1 comprend 474 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AN TGY GGN CCN CTN CAR CG ; CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA), N, Y et R étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
 - le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 30 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
 - la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,
- afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A2b. SEQ ID NO : 15 comprend 288 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY GGN ATH CTN CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), N, Y et R étant tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 30 secondes à une température égale à 53°C,
 - * une étape d'élongation de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3.

La séquence partielle SEQ ID NO : 15 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A2b. SEQ ID NO : 3 comprend 477 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est : (AAR GTI AAR CAN AAC TGG ; CCA NGC NCC DAT RTC RAA) ou (AAR GTI AAR CAN AAC TGG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, I, N et D étant tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour chacune des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 1 minute à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 1 minute à une température égale à 50°C,
 - * une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 1 minute et 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 17,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5.

La séquence partielle SEQ ID NO : 17 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 17 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A1. SEQ ID NO : 17 comprend 360 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A1. SEQ ID NO : 5 comprend 474 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG ;

CA NGC NYC RCT RTT RAA RCA) ou (TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), Y, H, R et N étant tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 19,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

La séquence partielle SEQ ID NO : 19 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 19 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B2. SEQ ID NO : 19 comprend 390 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée B2. SEQ ID NO : 7 comprend 498 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, H, N et Y étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'élongation de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence pour continuer la détermination complète de cette séquence codante,

ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B1. SEQ ID NO : 9 comprend 498 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA, CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, N et Y étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 40 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 1 minute à une température égale à 58°C,

- * une étape d'élongation de 1 minute et 10 secondes à une température égale à 72°C, et

- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence pour continuer la détermination complète de cette séquence codante,

ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrite et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de linker, notée L1. SEQ ID NO : 11 comprend 771 nucléotides.

La présente invention concerne également des séquences protéiques codées par l'une des séquences nucléotidiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 2 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A2a.

La séquence SEQ ID NO : 14 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A2a, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

Les propriétés de transport de l'oxygène des séquences protéiques de l'invention peuvent être notamment vérifiées en mesurant leur spectre d'absorption par spectrophotométrie typique de l'oxyhémoglobine.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 4.

La séquence SEQ ID NO : 4 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A2b.

La séquence SEQ ID NO : 16 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A2b, représentée par la séquence SEQ ID NO : 4.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 6.

La séquence SEQ ID NO : 6 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A1.

La séquence SEQ ID NO : 18 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A1, représentée par la séquence SEQ ID NO : 6.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 8.

La séquence SEQ ID NO : 8 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée B2.

La séquence SEQ ID NO : 20 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée B2, représentée par la séquence SEQ ID NO : 8.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 10.

La séquence SEQ ID NO : 10 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B1.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette l'association des chaînes de globines entre elles,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 12, sous réserve que ladite séquence homologue permette l'association des chaînes de globines entre elles,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette l'association des chaînes de globines entre elles, notamment tout

fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 280 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 12.

La séquence SEQ ID NO : 12 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne de Linker, notée L1.

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques codant pour une protéine telle que définie ci-dessus.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13 codant respectivement pour SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13 codant pour une protéine dérivée respectivement de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 1,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

Les conditions de stringence correspondent à des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 codant respectivement pour SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17 codant respectivement pour SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 5

ou SEQ ID NO : 17 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,

- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17,

- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 codant respectivement pour SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 7,

- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 9, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 10,

- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 10,

- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 9, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 9,

- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 11, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 12,

- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 11, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 11,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 800 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- une étape de mise en présence de la molécule d'hémoglobine susmentionnée avec au moins un agent dissociant et un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres,
- permettant la dissociation, puis la réduction de ladite molécule d'hémoglobine, afin d'obtenir les chaînes protéiques constituant ladite molécule,
- l'isolement des chaînes protéiques susmentionnées,
 - le microséquençage par spectrométrie de masse et le séquençage d'Edman de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées, afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés,
 - la détermination des couples d'amorces dégénérées (sens et antisens) à partir des microséquences susmentionnées,

– la préparation des séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques susmentionnées, à partir des amorces telles qu'obtenues précédemment, par un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant les étapes suivantes :

– la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

– le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :

* une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

* une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténares susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 56°C,

* une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et

– la dernière étape du procédé est une étape d'élongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente un chromatogramme de l'hémoglobine de *Arenicola marina* sur colonne Superose™ 12-C. La courbe supérieure correspond à une absorbance de 414 nm et la courbe inférieure à une absorbance de 280 nm. (Le collecteur est programmé pour collecter entre 16 et 18 minutes).

La Figure 2 représente le spectre UV de l'hémoglobine de *Arenicola marina* fonctionnelle (sous sa forme oxyhémoglobine).

La Figure 3 représente le chromatogramme (à 414 nm) de l'HbAm dissociée (partiellement) obtenu sur Superose 12-C et les traits verticaux sur le chromatogramme correspondent aux fenêtres de collecte (correspondant à la récupération des sous-unités).

La Figure 4 représente un gel SDS-PAGE obtenu pour les différentes fractions collectées.

La Figure 5 représente le chromatogramme (à 414 nm) de l'HbAm dissociée (partiellement) obtenu sur CIM DISK DEAE (système d'échange anionique) et les traits verticaux sur le chromatogramme correspondent aux fenêtres de collecte. La courbe en pointillés indique le gradient.

La Figure 6 représente un gel SDS-PAGE obtenu pour les différentes fractions collectées.

La Figure 7 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm en présence d'urée 3M. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" (chaîne de structure) ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 8 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm à pH 10. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au

pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 9 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm en présence d'urée 3M à pH 10. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 10 représente le suivi de la cinétique de réassociation à partir du pourcentage d'HbAm (HBL) et de Dodécamère (D) et selon la technique de changement de tampon (Centricon™ ou Dialyse). L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native avec la technique Centricon™; la courbe en traits pointillés correspond à HBL avec la technique de dialyse ; la courbe avec les triangles noirs correspond au dodécamère avec la technique Centricon™; la courbe en trait plein correspond au dodécamère avec la technique de dialyse.

La Figure 11 représente la superposition des chromatogrammes de chromatographie d'exclusion au cours de la réassociation correspondant à différents temps de réassociation.

La Figure 12 représente le chromatogramme HPLC obtenu après séparation des chaînes polypeptidiques par phase inverse sur une colonne Symmetry™ C18 (Waters). Les codes (d2, a1, a2, b2, c) correspondent aux noms des globines telles que mentionnées dans l'article de Zal et al. (1997).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

La présente invention a pour objectif l'utilisation de l'hémoglobine extracellulaire du polychaete marin *Arenicola marina* (HbAm) comme substitut sanguin chez des vertébrés. Cependant, même si ce ver représente une biomasse importante, la synthèse par génie génétique s'avère une voie indispensable et nécessaire. Il est donc primordial d'obtenir les séquences primaires des chaînes protéique constituant HbAm afin de développer une hémoglobine artificielle, fonctionnelle et stable à partir des propriétés d'auto-assemblage de cette molécule. Les protocoles de dissociations de chaque sous-unité et de réduction en chaîne polypeptidique, ainsi que les techniques de purification, d'isolement de microséquençage et de séquençage de ces chaînes et sont développées en détail ci-après.

Extraction et purification de l'hémoglobine

1) Espèce étudiée : *Arenicola marina* ; Annélide de l'écosystème intertidal

L'Annélide Polychète *Arenicola marina* est une espèce sédentaire très répandue sur toutes les côtes de l'Atlantique Nord, de la mer Noire et de l'Adriatique situées au-dessus du quarantième parallèle. Dans la région de Roscoff, l'Arénicole, communément appelée "ver du pêcheur" constitue des populations denses. Le sédiment habité par ces populations présente une surface irrégulière alternant bosses et creux formés respectivement par des monticules de déjections et des dépressions coniques. L'Arénicole vit dans des galeries aménagées dans le sable. La structure de la galerie se présente sous forme de U, avec une branche ouverte sur l'extérieur, l'autre étant fermée. L'Arénicole est logée dans la partie horizontale, son extrémité céphalique orientée vers la partie aveugle. Elle ingère le sable, en extrait la matière organique assimilable et défèque ensuite par son extrémité caudale, formant ainsi des monticules de tortillons de sable. A l'intérieur de l'étage médiolittoral, la répartition et la densité des peuplements sont essentiellement commandées par la granulométrie, la concentration en matière organique et la salinité.

L'Arénicole, vivant surtout dans les zones de balancement des marées, est amenée à subir des variations de pression d'oxygène. Sa galerie lui permet d'être en contact permanent avec l'eau de mer (riche en oxygène), pendant la marée basse.

2) Méthodes d'étude

2.1. Prélèvement du matériel biologique

Les animaux sont récoltés à marée basse, dans la baie de Penpoull, près de Roscoff (France) et maintenus dans l'eau de mer une nuit afin de vider leur tube digestif. Les prélèvements de sang sont effectués à l'aide d'une seringue au niveau du vaisseau dorsal. Les échantillons sont collectés sur de la glace et filtrés sur de la laine de verre. Après une centrifugation à froid (15 000 g pendant 15 min à 4°C) pour éviter la dissociation des molécules et pour éliminer les débris tissulaires, les surnageants sont concentrés au moyen d'une cellule Amicon™ (Millipore) et d'une membrane de « cut-off » de 500 kDa (ne sont retenues que les masses supérieures à 500 kDa).

2.2. Purification des hémoglobines

Une fois le sang concentré, une filtration basse pression (FPLC) par exclusion (séparation en fonction de la taille de la molécule : plus la molécule est de taille importante plus elle est éluée rapidement) est effectuée sur colonne (100 × 3 cm) de gel Sephacryl™ S-400 (Amersham)(gamme de séparation comprise entre 20×10^3 et 8000×10^3), en chambre froide (4°C). Chaque purification est effectuée sur 5 mL d'échantillon, élués avec le tampon salé *Arenicola marina* (10 mM Hepes ; 4 mM KCl ; 145 mM NaCl ; 0,2 mM MgCl₂ ajusté à pH 7,0 avec de la soude 2N). Le débit utilisé pour cette première purification est de 40 tr/min et n'est récupéré que la première fraction la plus rouge (contenant de l'hème). Cette fraction est ensuite concentrée à l'aide de tube Centricon-10kDa retenant les molécules d'un poids supérieur ou égal à 10000 Da.

Une deuxième purification est ensuite effectuée par filtration basse pression (Système HPLC, Waters) d'aliquot de 200 µL sur une colonne 1 × 30 cm Superose 12-C (Pharmacia, gamme de séparation comprise entre 5×10^3 et 3×10^5 Da) à température ambiante. Le débit utilisé est de 0,5 ml/min. Les échantillons sont conservés à 4°C et récoltés dans de la glace. L'absorbance de l'éluat est suivie à deux longueurs d'ondes : 280 nm (pic d'absorbance caractéristique des protéines) et 414 nm (pic d'absorbance caractéristique de l'hème). Les fractions contenant de l'hème sont isolées grâce au collecteur (programmé sur une fenêtre de temps correspondant au temps de rétention de l'hémoglobine)(Figure 1). Les échantillons sont concentrés, dosés, puis stockés à -40°C avant utilisation.

2.3. Dosage des hémoglobines

Le réactif de Drabkin (Sigma), utilisé pour le dosage, permet de déterminer la quantité en hème de la solution. L'hémoglobine réagit avec le réactif de Drabkin lequel contient du potassium de ferricyanure, du cyanure de potassium et du bicarbonate de sodium. L'hémoglobine est transformée en méthémoglobine par l'action du ferricyanure. Les méthémoglobines réagissent ensuite avec le cyanure pour former le cyanméthémoglobine. L'absorbance de ce dérivé à 540 nm est proportionnelle à la quantité d'hème dans la solution. Or, l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* (HBL) contient en moyenne 1 mol d'hème pour 23 000 g de protéine, ce qui permet par un calcul simple, d'obtenir la concentration en HBL de chaque échantillon.

3) Résultats

Ainsi, plusieurs milligrammes d'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* ont été purifiés. Chaque lot (aliquots de 1mL) est analysé par FPLC sur colonne Superose 12-C (Pharmacia) afin de s'assurer de la pureté de l'échantillon (un pic unique). De même un spectre UV sur une plage de 400 nm à 700 nm est réalisé pour vérifier la fonctionnalité des hémoglobines de chaque lot (Figure 2). Trois maxima d'absorption sont observés à 414, 541 et 577 nm. Par comparaison, on rappelle que la méthémoglobine présente deux maxima à 500 et 635 nm.

Enfin, ces lots sont utilisés par la société Biotrial S.A. (Rennes, France) pour des tests précliniques réalisés sur des souris et des rats afin de tester les éventuelles réactions pathologiques et immunogènes.

Dissociation de l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* en ces différentes sous-unités de base (Trimères, Dimères de linker et Monomères)

La dissociation de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* (HbAm) doit être totale et conserver les sous-unités fonctionnelles. Les différentes sous-unités sont ensuite isolées et analysées par des techniques de chromatographie liquide (exclusion et échange d'ions), développées à cet effet.

1) Dissociation de l'HBL

1.1. Protocole de dissociation

Les études préliminaires de dissociation ont été développées à partir des publications de l'art antérieur (Vinogradov et al., 1979 ; Sharma et al., 1996 ; Mainwaring et al., 1986 ; Polidori et al., 1984 ; Kapp et al., 1984 ; Chiancone et al., 1972 ; Vinogradov et al., 1991 ; Krebs et al., 1996), c'est-à-dire en présence d'un réactif dissociant unique : urée, ions hétéropolytungstate, sels de guanidinium, SDS ou ions hydroxydes. Les agents utilisés agissent différemment sur la molécule :

- les ions hydroxydes (OH⁻), le SDS, les sels de guanidinium et les ions hétéropolytungstate déstabilisent les ponts salins
- l'urée déstabilise les interactions hydrophobes

Or, l'intérêt est d'obtenir le plus rapidement et le plus efficacement possible les quatre sous-unités de bases d'où l'idée d'associer les différents agents dissociants et en particulier le pH alcalin et l'urée. Après différents tests, il s'avère qu'une dissociation rapide et efficace est obtenue avec de l'urée 3M dilué dans le tampon de dissociation (0,1 M de base Trisma et 1mM d'EDTA) ajusté à pH 10 avec de la soude 2N. L'HbAm est ajustée à une concentration d'environ 4 mg/mL (solution mère). Toutes les analyses sont effectuées à +4°C et les échantillons sont conservés à l'obscurité le temps de l'étude. (Trisma = tris[hydroxyméthyl]aminométhane)

1.2. Analyses par chromatographie d'exclusion

Les conditions d'analyses sont détaillées dans le tableau 1 ci-dessous.

Système HPLC	HPLC Waters 626 LC System	
Colonne	Superose 12-C (Pharmacia) (gamme de séparation comprise entre 5x10 ³ et 3x10 ⁵ Da)	
Débit	0.5 mL/min	
Eluant	tampon pH 7,0 (tamponné par exemple avec de l'acide chlorhydrique concentré) et filtré sur filtre 0,22 µm (ou 0,45µm)	
Température de l'injecteur	+ 4°C	
	Echantillon	
	Suivi Analytique	Séparation et collecte
Volume injecté	20µL	200µL
Préparation des échantillons	Solution mère diluée à 1mg/mL dans le tampon de dissociation à pH10 et filtrée sur 0,45µm	Solution mère filtrée sur filtre 0,45µm

1.3. Analyses par échange d'ions

Le point isoélectrique (pHi) de l'HBL étant de 4,69 (Vinogradov, 1985), l'analyse par échange d'ions est réalisée sur une colonne anionique CIM DEAE disk (Interchim). En effet, L'HBL est chargée négativement pour un pH supérieur au pHi et est donc fixée sur une résine chargée positivement (résine DEAE). L'élution est effectuée grâce à la force ionique avec un gradient non linéaire de NaCl de 0 à 1 M (solution de NaCl de 1 M diluée dans le tampon de dissociation à pH 7,0 et filtrée sur 0,45 µm). Le tampon de dissociation à pH 7 est utilisé comme tampon d'élution. Le débit est de 4 mL/min.

1.4. Analyses par chromatographie en phase inverse

La chromatographie par phase inverse est effectuée sur une colonne de Symmetry 300 C₁₈ 5µm (4,6 × 250 mm) de chez Waters. En présence d'acétonitrile et de TFA (acide trifluoroacétique), HbAm se dissocie en ses sous unités de base (Trimère, Monomère et Linker) et l'hème se dissocie des globines. Ainsi, sans traitement préalable, HbAm est dissociée en tête de colonne. La méthode développée est décrite dans le tableau ci-dessous.

débit	1 mL/min		
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v HFBA		
Eluant B	ACN + 0.1% v/v HFBA		
Gradient			
	Temps en min	% A	% B
	0	58	42
	40	50	50
	41	48	52
	90	47	53
	95	5	95
	110	5	95

2) Résultats

2.1. Chromatographie d'exclusion

Le chromatogramme de l'HbAm dissociée en partie, est représenté figure 3. Cinq pics sont observés et il s'agit de les identifier. Les molécules sont éluées selon leur masse décroissante et l'HbAm native élue dans le volume mort (16 min). Les fractions correspondant à chaque pic sont analysées par SDS-PAGE (figure 4). Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	16 min 40	HbAm native
2	22 min 20	Dodécamère
3	25 min 30	Dimère de linker
4	26 min 40	Trimère
5	28 min 30	Monomères

2.2. Chromatographie ionique

Une fois la méthode développée (tableau 3), les fractions sont collectées, concentrées et analysées par gel SDS afin d'identifier chaque pic (Fig. 6 et tableau 4).

Une méthode est ensuite développée pour repurifier chaque sous-unité.

Temps en min	A : 1M NaCl dans B	B : Tampon de dissociation pH 7.0
0	5%	95 %
0,5	15%	85 %
1,5	15%	85 %
2,5	22%	78 %
3,5	22%	78 %
3,6	25%	75 %
5,5	25%	75 %
5,6	29%	71 %
6,5	29%	71 %
6,6	36%	64 %
7,0	36%	64 %
8,0	45%	55 %
8,1	100%	0 %
9,5	100%	0 %

TABLEAU 3 : Méthode développée pour l'analyse de l'HBL dissociée sur CIM-DEAE

fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	1 min 15	Monomères
2	2 min 40	Dimère de linker
3	3 min 10	Dimère de linker
4	4 min 40	Dodécamère
5	6 min 30	?
6	7 min 30	Trimère
7	8 min 50	HbAm

TABLEAU 4 : Association réalisée après analyse du gel (Figure 6) entre le temps de rétention et les sous-unités.

2.3. Chromatographie en phase inverse

Une fois la méthode développée, les fractions sont collectées, lyophilisées et analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier chaque pic.

fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	12 min	Linker
2	22 min	Linker
3	34 min	Monomère a1
4	38 min	Monomère a2
5	50 -70 min	Trimères

Les propriétés chimiques des trimères doivent être trop proches pour que l'on puisse les séparer par phase inverse. Ainsi, seuls les deux linkers et les monomères a1 et a2 ont pu être isolés.

2.4. Dissociation de l'HbAm

La cinétique de dissociation est suivie par chromatographie d'exclusion. L'intégration des chromatogrammes par le logiciel Millénium (Waters), permet le calcul du pourcentage des différents composés à partir de l'aire sous courbe. L'évolution de la cinétique de dissociation est représentée figures 7, 8 et 9.

Les trois graphiques des Figures 7, 8 et 9 montrent bien l'intérêt d'associer les deux agents dissociants (urée 3M et OH⁻) pour obtenir efficacement les trois sous-unités de base en 24h.

Réassociation de l'hémoglobine

1) Matériels et méthodes

Les expériences de réassociation sont effectuées sur l'HbAm dissociée selon les protocoles cités plus haut (pH9, pH10, Urée 3M, Urée 4M, Urée 3M à pH10). Différents tampons de réassociation sont testés afin d'obtenir une réassociation optimale. Le changement de tampon (tampon de dissociation → tampon de réassociation) est effectué de deux façons différentes :

- L'HbAm dissociée est lavée 4 fois contre 4 mL de tampon de réassociation sur Centricon-10 (Millipore) à +4°C ;

– L'HbAm dissociée est dialysée 24 h contre de l'eau MilliQ (Millipore) ($2 \times 2L$) puis 48 h contre le tampon de réassociation ($3 \times 2L$) à $+4^{\circ}C$.

2) Résultats

D'après des résultats ultérieurs sur les hémoglobines extracellulaires d'Annélides (Mainwaring et al., 1986 ; Polidori et al., 1984), la présence d'ions divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} est nécessaire au maintien de la structure quaternaire de l'hémoglobine. En effet, ils la stabilisent et ralentissent le phénomène de dissociation (Sharma et al., 1996). Ces ions forment un complexe avec les groupes carboxylates des chaînes latérales et carbonyles des chaînes principales. La présence d'ions divalents peut avoir un effet sur la réassociation lorsque les groupements carboxyliques sont ionisés, donc entre autre lorsque la dissociation a eu lieu à pH alcalin. Il est donc important que le tampon de réassociation contienne du calcium et/ou du magnésium. Ceci explique aussi la présence d'EDTA dans le tampon de dissociation ; EDTA qui chélate ces ions divalents. Le tampon actuellement mis au point est constitué de 0,1 M de base Trisma, 400 mM de NaCl, 2,95 mM KCl, 32 mM $MgSO_4$, 11 mM $CaCl_2$ ajusté à pH 7 avec de l'HCl concentré. La réassociation est suivie selon le même principe que la dissociation (Figures 10 et 11).

Une réassociation est observée si la dissociation est de courte durée de l'ordre de la minute. Cette réassociation correspond à un réarrangement d'intermédiaires de dissociation qui sont des hémoglobines tronquées (HBL dissociée de 1 à plusieurs douzièmes).

Réduction de l'HbAm pour l'étude des différentes chaînes polypeptidiques

1) Réduction de l'hémoglobine préalable à la séparation par chromatographie liquide par phase inverse

L'HbAm (4 mg/mL) est réduite dans 10% de DTT (dithiothréitol) dissous dans un tampon de dissociation à pH 8-9 (0,1 M trisma ou 10 mM bicarbonate d'ammonium) pendant 30 minutes à température ambiante. Une fois réduites, les chaînes protéiques obtenues sont alkylées en présence de 100mM iodoacétamide dissout dans un tampon de dissociation à pH 8-9 pendant 30 minutes à température ambiante.

On peut éventuellement également envisager le protocole suivant : L'HbAm (4 mg/mL) est réduite dans 100 mM de DTT (dithiothréitol) dissout dans le tampon de dissociation à pH 8-9 pendant 1 h à $40^{\circ}C$. Dans ces conditions drastiques, seules les

globines pourront être analysées. En effet, les linkers (protéines non-globines) sont riches en cystéines et sont donc détériorés. Une fois réduite, l'HbAm est lavée 4 fois sur Amicon 30 000Da (Millipore) dont seul le filtrat est récupéré (tout ce qui est de poids inférieur à 30 000 Da). Le filtrat est ensuite lavé sur Amicon 10 000Da pour éliminer tout ce qui est inférieur à 10 000 Da. Ainsi, seuls les monomères compris entre 30 000 Da et 10 000 Da sont contenus dans l'échantillon (gamme de poids des chaînes de globines qui constituent l'HbAm).

2) Séparation des chaînes protéiques par chromatographie de phase inverse

2.1. Matériels et méthodes

La chromatographie par phase inverse est effectuée sur une colonne de Symmetry 300 C₁₈ 5µm (4,6 × 250 mm) de chez Waters. La méthode développée est décrite dans le tableau ci-dessous et le chromatogramme obtenu est représenté figure 12.

débit	1 mL/min		
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v HFBA		
Eluant B	ACN + 0.1% v/v HFBA		
Gradient			
	Temps en min	% A	% B
	0	75	25
	2	58	42
	10	58	42
	40	40	60
	45	0	100
	55	0	100

On peut éventuellement également envisager le protocole suivant.

débit	1 mL/min	
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v TFA	
Eluant B	ACN + 0.1% v/v TFA	
Gradient		
Temps en min	% A	% B
0	80	20
0,25	60	40
4,0	55	45
10,0	55	45
10,05	0	100
16,0	0	100

Chaque chaîne protéique (mises en évidence par un pic unique à 280nm) est collectée puis lyophilisée et stockée à -40°C jusqu'aux prochaines analyses. Ainsi, il a

été possible de séparer les 5 monomères suivants : a_1 (~15952 kDa), a_2 (~15975 kDa), d_2 (~17033 kDa), b_2 (~16020 kDa) et c (~16664 kDa).

3) Séparation des chaînes protéiques par gel bidimensionnel

Le gel bidimensionnel qui est une combinaison des techniques d'isoélectrofocalisation en première dimension et de SDS-PAGE en seconde dimension permet de séparer un mélange complexe de protéine.

Electrofocalisation

Après purification par FPLC, l'hémoglobine de *Arenicola* est dialysée et lyophilisée. 500 µg sont repris dans un tampon de réhydratation. Ce tampon contient du Chaps (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate ; Sigma) à 4%, 1% de DTT fraîchement préparé, cocktail d'inhibiteurs de protéase (Bohringer), 50 µg/ml de TLCK (inhibiteur de la trypsine), 1 µl de Bleu de Bromophénol à 1%.

Le mélange est soniqué et centrifugé pour éliminer le matériel non dissous. On dépose ensuite de l'huile de roche aux deux extrémités du support de la bande d'électrofocalisation, et on dépose ensuite l'échantillon au milieu. La bande de 17 cm est ensuite déposée sur l'échantillon en éliminant toute bulle d'air. La bande est alors recouverte d'huile de roche pour éviter l'évaporation de l'échantillon.

Une réhydratation active est alors réalisée à 50V (20°C durant 12 heures). Ensuite nous procédons à la focalisation durant deux jours.

La bande sera ensuite récupérée et placée sur un gel d'acrylamide 6-18%, notamment à 10%, de largeur 18 cm, de longueur 20 cm et d'épaisseur 1 mm. La migration est effectuée en enceinte réfrigérée à 10°C, pendant 14 heures à 400 V, 25 mA et 100 W.

La séparation des chaînes protéiques sera alors réalisée en fonction de leur taille après avoir scellé la bande en haut du gel à l'aide d'une solution d'agarose à 1%. Une fois séparées, les bandes protéiques sont révélées sur gel par coloration au bleu de Coomassie (Coomassie® G250).

Construction du gel en gradient

Vingt-cinq ml de solution dense à 18% de polyacrylamide (acrylamide 2,5 M ; Tris 0,4 M ; Glycérol 30% (v/v) ; dodécyl sulfate de sodium (SDS) 3,5 mM ; TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine ; Sigma) 0,05% (v/v) ; persulfate de sodium

1,6 mM) sont placés dans la chambre de mélange sous agitation constante tandis qu'un même volume de solution légère à 6% de polyacrylamide (acrylamide 0,8 M ; Tris 0,4 M ; SDS 3,5 mM ; TEMED 0,06% (v/v) ; persulfate de sodium 2,4 mM) est placé dans l'autre chambre. Le haut du gel est recouvert d'une solution d'isobutanol saturée en eau bidistillée. Le gel est ensuite laissé 1 h à polymériser à température ambiante puis le haut du gel est rincé plusieurs fois avec de l'eau bidistillée et l'ensemble est placé une nuit à 10°C. Après avoir enlevé l'eau résiduelle à l'aide d'un papier absorbant, la solution de gel de concentration (acrylamide 0,56 M ; méthylène bis-acrylamide 6,9 mM ; Tris 124 mM ; SDS 3,5 mM ; TEMED 0,05% (v/v) ; persulfate de sodium 2,2 mM) est coulée sur le gel de séparation et une cale permettant de former l'empreinte de la bande est introduite dans la solution gel de concentration. La polymérisation est complète après 1 h à température ambiante.

4) Analyse par micro séquençage des chaînes protéiques isolées par phase inverse et gel bidimensionnel

Les chaînes protéiques isolées par chromatographie en phase inverse et par gel bidimensionnel sont ensuite digérées et analysées par spectrométrie de masse LC-MS/MS sur un appareil de type ESI-Q-TOF.

Digestion des protéines séparées par chromatographie en phase inverse.

Chaque chaîne protéique isolée est soumise à une digestion enzymatique, étape essentielle avant leur analyse par microséquençage. Les chaînes protéiques lyophilisées sont dissoutes dans une solution eau milliQ, acétonitrile contenant l'endoprotéase ; la trypsine qui hydrolyse au niveau C-terminal de la lysine et de l'arginine, donnant généralement des peptides de masses comprises entre 500 et 2500 Da, pendant au minimum 3h à température ambiante.

Digestion des protéines séparées sur gel bidimensionnel

Chaque spot du gel est découpé pour être soumis à une digestion enzymatique. Cette étape de digestion enzymatique est essentielle. Elle consiste à hydrolyser les protéines de façon spécifique, à l'aide d'une enzyme, en plusieurs peptides.

Avant de débiter la digestion, des étapes de décoloration, de réduction et d'alkylation sont indispensables :

- les lavages successifs à l'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et à l'acétonitrile (ACN) permettent d'éliminer l'agent de coloration présent dans le morceau de gel,
- les réactions de réduction au dithiothréitol (DTT) et d'alkylation à l'iodoacétamide permettent l'ouverture puis le blocage des ponts disulfures formés entre deux cystéines présentes dans la séquence de la protéine et des liaisons cystéine-acrylamide.

La dernière étape de la méthode consiste à extraire du gel les peptides tryptiques à l'aide d'une solution d'extraction, composée d'acétonitrile et d'eau, additionnée d'un peu d'acide.

Analyse par nanoLC-MS-MS

Les peptides extraits sont ensuite transférés vers la plaque PCR. Ce transfert se fait en deux fois 15 μL , pour récupérer la totalité du volume. Pour éliminer l'acétonitrile, qui pourrait gêner la rétention des peptides sur la pré-colonne, un temps d'évaporation (pause) de 2 heures est appliqué avant l'analyse par nanoLC-MS-MS.

Résultats

Ceci a permis l'obtention de quelques centaines de micoséquences correspondant à chaque chaîne protéique séparée par gel 2D.

5) Analyse par séquençage d'Edman des chaînes protéiques isolées par chromatographie en phase inverse

Principe

En présence de tampon N-méthyl pipéridine, le Phényl-Iso-Thio-Cyanate (PITC) se couple aux fonctions amines primaires et secondaires des protéines (PTC-Protéine). Le temps de réaction à 45°C est de 18 minutes. La liaison peptidique suivante est fragilisée, ce qui permet sa coupure en 3 minutes par l'acide trifluoracétique (TFA) pur générant ainsi l'anilino-thiazolinone (ATZ) du premier acide aminé (AA) et la protéine ayant perdu le 1^{er} AA.

L'ATZ-AA est extrait du milieu réactionnel et converti en milieu acide (TFA à 25 % dans l'eau) en phényl thio-hydantoïne (PTH-AA) plus stable. Le PTH-AA peut donc

être analysé par HPLC et sa nature déterminée grâce à un étalon de PTH-AAs. Le cycle de réaction peut être répété et conduit ainsi à la séquence de la protéine. Edman a automatisé la réaction qui porte son nom en créant en 1967 le premier séquenceur de protéine. L'appareil est couplé à une HPLC dans laquelle il injecte le PTH-AA. Par comparaison avec un spectre étalon, il est alors possible d'identifier l'acide aminé d'origine et d'obtenir sa quantification. Le tout est sous le contrôle d'un ordinateur qui pilote les différents éléments et assure l'acquisition de données ainsi que leur traitement.

Résultats

Ainsi, il a été possible d'obtenir environ 30 acides aminés des extrémités N-terminales de 5 monomères et d'un linker isolés par phase inverse.

Détails des protocoles d'amplification par PCR et présentation des séquences nucléotidiques et polypeptidiques des globines des sous-familles A1, A2a, A2b, B2 et B1 et du linker L1 du polychète marin *Arenicola marina*

Les amplifications par PCR des 5 globines A1, A2a, A2b, B1 et B2, ainsi que du linker L1, dont les séquences nucléotidiques sont présentées ci-dessous, ont débuté par la conception d'amorces dégénérées spécifiques (sens et antisens) des sous-familles A1, A2, B1 et B2. Ces amorces, qui ont permis l'amplification des cinq globines susmentionnées (A1, A2a, A2b, B1 et B2) puis le clonage et le séquençage des produits de PCR correspondants, ont été conçues à partir d'alignements de séquences protéiques de globines d'annélides disponibles dans les banques de données.

Les matrices d'ADN complémentaires utilisées pour les réactions de PCR ont été synthétisées à partir d'ARN messagers purifiés à partir d'ARN totaux extraits sur des Arénicoles, en raison de la petite taille des organismes et de leur rythme intense de croissance traduisant des niveaux importants d'expression des gènes, dont ceux impliqués dans la synthèse de l'hémoglobine. Les ADN complémentaires ont ainsi été synthétisés. Ces étapes ont fait appel à des kits commerciaux de biologie moléculaire de chez Ambion (purification des ARNs), Amersham (purification des ARNm), Promega (RT), Invitrogen (clonage), Abgene (séquençage).

Dans un second temps, nous avons mis au point les réactions de PCR, notamment en ce qui concerne la détermination des paramètres de temps de dénaturation, de temps et de température d'hybridation et de temps d'élongation. Les concentrations en MgCl_2 ont également été optimisées.

Enfin, dans une dernière étape, des expériences de 5' et 3' RACE PCR ont été effectuées de façon à obtenir les séquences codantes complètes. Ces étapes ont fait appel au kit de biologie moléculaire de chez Roche.

Sont présentées ci-dessous, les séquences nucléotidiques des amorces dégénérées sens et antisens, les paramètres des PCR et les séquences codantes partielles ou complètes pour chacune des globines A2a, A2b, A1, B1 et B2, et pour le linker L1.

On précise que l'analyse totale de ces séquences par un blast dans les banques de données donne des valeurs comprises entre $2.10^{-3} < \text{Eval} < 5^{-31}$.

Globine A2a

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la globine A2a (SEQ ID NO : 2), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 19 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

Temps et température initiale de dénaturation :	4 min à 95°C	
Temps et Température de dénaturation :	30 s à 95°C	} 35 cycles
Temps et Température d'hybridation :	30 s à 56°C	
Temps et Température d'élongation :	40 s à 72°C	
Temps et Température d'élongation finale :	10 min à 72°C	

Réaction de PCR :

Par réaction :

- 5-20 ng ADNc
- 100 ng amorce sens
- 100 ng amorce antisens
- dNTP 200 μM final
- MgCl_2 2mM final
- Tampon PCR 1X final
- 1 unité Taq Polymérase
- Qsp 25 μL H_2O

Globine A2b

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 codant pour la globine A2b (SEQ ID NO : 4), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 21 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
30 s à 95°C
30 s à 52°C
40 s à 72°C
10 min à 72°C

} 35 cycles

Globine A1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 codant pour la globine A1 (SEQ ID NO : 6), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 22 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
1 min à 95°C
1 min à 50°C
1 min 30 à 72°C
10 min à 72°C

} 35 cycles

Globine B2

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 codant pour la globine B2 (SEQ ID NO : 8), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 23 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
30 s à 95°C
40 s à 52°C
30 s à 72°C
10 min à 72°C

} 35 cycles

Globine B1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 codant pour la globine B1 (SEQ ID NO : 10), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 24 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR: 4 min à 95°C
 30 s à 95°C
 40 s à 52°C } 35 cycles
 30 s à 72°C
 10 min à 72°C

Linker L1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 codant pour le Linker L1 (SEQ ID NO : 12), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 25 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
 40 s à 95°C
 1min s à 58°C } 35 cycles
 1min s à 72°C
 10 min à 72°C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bunn, H.F. et Jandl, J.H. (1968) *Trans Assoc Am Physicians*, **81**, 147,
- Chang, T.M.S. (1957) Hemoglobin Corpuscles, McGill University,
- Chang, T.M.S. (1964) *Science*, **146**, 524-525,
- Chang, T.M.S. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **44**, 1531-1533,
- Chang, T.M.S. (1997) Blood substitutes: principales, methods, products and clinical trials, Vol. I, Karger, Basel, Suisse,
- Chiancone, E., et al. (1972) Studies on erythrocrucorin. II. Dissociation of earthworm erythrocrucorin, *J Mol Biol*, **70**(1): 73-84,
- Clark, L.C.J. et Gollan, F. (1966) *Science*, **152**, 1755,
- De Haas, F.; Boisset, N.; Taveau, J.C.; Lambert, O.; Vinogradov, S.N. et Lamy, J.N. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 1973-1984,
- De Haas, F.; Taveau, J.-C.; Boisset, N.; Lambert, O.; Vinogradov, S.N. et Lamy, J.N. (1996) *J. Mol. Biol.*, **255**, 140-153,
- De Haas, F.; Zal, F.; Lallier, F.H.; Toulmond, A. et Lamy, J.N. (1996) Proteins-structure fonction and genetics, **3**, 241-256,
- De Haas, F.; Zal, F.; You, V.; Lallier, F.H.; Toulmond, A. et Lamy, J.N. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 111-120,
- Dickerson, R.E. et Geis, I. (1983) Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology., Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA,
- Geyer, R.P.; Monroe, R.G. et Taylor, K. (1968) Survival of rats totally perfused with a fluorocarbon-detergent preparation., J.C. Norman, J. Folkman, W.G. Hardisson, L.E. Rudolf et F.J. Veith (Eds), 85-96, Appleton Century Crofts, New York,
- Goodin, T.H.; Grossbard, E.B.; Kaufman, R.J.; Richard, T.J.; Kolata, R.J.; Allen, J.S. et Layton, T.E. (1994), *Crit Care Med*, **22**, 680-689,
- Hirsch, R.E.; Jelicks, L.A.; Wittenberg, B.A.; Kaul, D.K.; Shear, H.L. et Harrington, J.P. (1997) Artificial Cells, Blood Substitutes & Immobilization Biotechnology, **25**, 429-444,
- Jia, L.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J. et Stamler, J.S. (1996) *Nature*, **380**, 221-226,
- Kapp, O.H. et Crewe, A.V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **789**, 294-301,

- Kapp, O.H., et al. (1984) The reassociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin dissociated at alkaline pH, *J Biol Chem*, **259**(1): 628-39,
- Krebs, A., et al. (1996) Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin, *J Biol Chem*, **271**(31): 18695-704,
- Lamy, J.N.; Green, B.N.; Toulmond, A., Wall, J.S.; Weber, R.E. et Vinogradov, S.N. (1996), *Chem. Rev.* **96**, 3113-3124
- Levin, O. (1963) *J. Mol. Biol.*, **6**, 95-101,
- Mainwaring, M.G., et al. (1986) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris* at acid pH and its reassociation at neutral pH. A new model of its quaternary structure, *J Biol Chem*, **261**(23): 10899-908,
- Mitsuno, T. et Naito, R. (1979) Perfluorochemical Blood Substitutes., Excerpta Medica, Amsterdam,
- Mitsuno, T. et Ohyanagi, H. (1985) Present status of clinical studies of fluosol-DA (20%) in Japan, K.K. Tremper (Ed), 169-184, Little Brown & Co, Boston,
- Naito, R. et Y. K. (1978) An improved perfluorodecalin emulsion. In Blood Substitutes and Plasma Expanders, G.A. Jamieson and T.J. Greenwalt (Eds), 81, Alan R. Liss Inc., New York,
- Nho, K.; Glower, D.; Bredehoeft, S.; Shankar, H.; Shorr, R. et Abuchowski, A. (1992) Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology, An International Journal, **20**, 511-524,
- Payne, J.W. (1973) *Biochem J.* **135**, 866-873,
- Polidori, G., et al. (1984) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Tubifex tubifex* at extremes of pH and its reassociation upon return to neutrality, *Arch Biochem Biophys*, **233**(2): 800-14,
- Reiss, J.G. (1991) *Vox Sang*, **61**, 225-239,
- Reiss, J.G., (1994) Artificial Cells, Blood substitutes & Immobilization Biotechnology, An International Journal **22**, 945-1511,
- Roche, J. (1965) Electron microscope studies on high molecular weight erythrocrurins (invertebrate hemoglobins) and chlorocrurins of annelids., D.A. Munday (Ed), 62-80, Pergamon Press, Oxford,
- Roche, J.; Bessis, M. et Thiery, J.P. (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 182-184,
- Roche, J.; Bessis, M.T. et Thiery, J.P. (1960) *C. R. Soc. Biol.* **154**, 73-80,

- Sharma, P.K., et al. (1996) The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin, *J Biol Chem*, **271**(15): 8754-62,
- Sloviter, H. et Kamimoto, T. (1967) *Nature*, **216**, 458,
- Terwilliger, N.B. (1992) Molecular Structure of the extracellular heme proteins., Vol. 13, C.P. Mangum (Ed), 193-229, Springer-Verlag, Berlin,
- Van Bruggen, E.F.J. et Weber, R.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **359**, 210-212,
- Vinogradov, S.N., et al. (1991) A dodecamer of globin chains is the principal functional subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*, *J Biol Chem*, **266**(20): 13091-6,
- Vinogradov, S.N., Shlom J. M. et Doyle, M. (1979) Dissociation of the extracellular hemoglobin of *Arenicola cristata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 145-150,
- Vinogradov, S.N. (1985) The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins), *Comp Biochem Physiol B*, **82**(1): 1-15,
- Zal, F.; Green, B.N.; Lallier, F.H.; Vinogradov, S.N. et Toulmond, A. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **243**, 85-92.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'obtention des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend :

(i) soit une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant et un agent réducteur qui est un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres ;

(ii) soit la réduction de quatre sous-unités par un agent réducteur, lesdites sous-unités étant elles-mêmes obtenues par mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec un tampon de dissociation, ledit tampon de dissociation comprenant de l'EDTA à une concentration d'environ 1 mM ajusté à un pH d'environ 10.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent dissociant est l'urée 3M et le tampon de dissociation comprend un agent tamponnant, soit du Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) à une concentration de 0,1 M, et 1mM d'EDTA, ajusté à un pH de 10.

3. Couples d'amorces, lesdits couples étant les suivants :

a) **Amorce sens** : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG (SEO ID NO : 21),

Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22);

b) **Amorce sens** : TGY GGN ATH CTN CAR CG (SEQ ID NO : 23),

Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22);

c) **Amorce sens** : AAR GTI AAR CAN AAC TGG (SEQ ID NO : 24),

Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22);

d) **Amorce sens** : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG (SEQ ID NO : 25),

Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22);

e) **Amorce sens** : AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA (SEO ID NO : 26),

Amorce antisens: CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22); ou

f) **Amorce sens** : GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA (SEQ ID NO : 27),

Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEO ID NO : 22);

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine, et

H représente A, C ou T.

4. Procédé de préparation de molécules d'acide nucléique codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, à partir des couples amorces tels que définis à la revendication 3, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), incluant une répétition d'au moins 30 fois du cycle constitué par les étapes suivantes :

* la dénaturation, par chauffage, de l'ADNc monocaténaire codant pour une des chaînes protéiques, de façon à dénaturer d'éventuelles structures secondaires et des reliquats d'ARN, ledit ADNc étant obtenu à partir d'ARNm, cette étape permettant d'obtenir des brins d'ADNc monocaténaires dénaturés ;

- * l'hybridation des couples d'amorces aux brins d'ADNc monocaténares dénaturés à une température adéquate, pour obtenir des amorces hybridées ; et
- * la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc par une polymérase à une température adéquate, à partir des amorces hybridées.

5. Protéine codée par la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou 19.

6. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :
 (i) le polypeptide de SEQ ID NO : 2 ; ou
 (ii) tout fragment d'au moins 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène.

7. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :
 (i) le polypeptide de SEQ ID NO : 4 ; ou
 (ii) tout fragment d'au moins environ 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène.

8. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :
 (i) le polypeptide de SEQ ID NO : 6 ; ou
 (ii) tout fragment d'au moins environ 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène.

9. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :
 (i) le polypeptide de SEQ ID NO : 8 ; ou
 (ii) tout fragment constitué d'au moins environ 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène.

10. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par:
 (i) la séquence SEQ ID NO : 10 ; ou
 (ii) tout fragment d'au moins environ 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène.

11. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par:
 (i) le polypeptide de SEQ ID NO : 12 ; ou
 (ii) tout fragment d'au moins environ 60 acides aminés contigus de (i), sous réserve que ledit fragment permette l'association des chaînes de globines entre elles.

12. Molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou 19.

13. Molécule d'acide nucléique codant pour une protéine telle que définie dans l'une quelconque des revendications 5 à 11.

14. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :
 (i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 1 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 2 ;
 (ii) toute molécule d'acide nucléique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de (i) ;

(iii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i) ou (ii); ou
 (iv) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i), (ii) ou (iii) et codant un polypeptide permettant le transport de l'oxygène, les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

15. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

(i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 3 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 4 ;
 (ii) toute molécule d'acide nucléique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de (i);
 (iii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i) ou (ii); ou
 (iv) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i), (ii) ou (iii) et codant un polypeptide permettant le transport de l'oxygène, les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

16. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

(i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 5 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 6 ;
 (ii) toute molécule d'acide nucléique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de (i) ;
 (iii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i) ou (ii); ou
 (iv) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i), (ii) ou (iii) et codant un polypeptide permettant le transport de l'oxygène, les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

17. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

(i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 7 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 8 ;
 (ii) toute molécule d'acide nucléique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de (i) ;
 (iii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i) ou (ii); ou
 (iv) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i), (ii) ou (iii) et codant un polypeptide permettant le transport de l'oxygène, les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

18. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

(i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 9 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 10 ;
 (ii) toute molécule d'acide nucléique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de (i) ;
 (iii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i) ou (ii); ou

(iv) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i), (ii) ou (iii) et codant un polypeptide permettant le transport de l'oxygène, les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

19. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- (i) la molécule d'acide nucléique de SEQ ID NO : 11 codant pour le polypeptide de SEQ ID NO : 12 ;
- (ii) tout fragment d'au moins environ 180 nucléotides contigus de (i); ou
- (iii) toute molécule d'acide nucléique s'hybridant dans des conditions stringentes avec toute molécule d'acide nucléique complémentaire à (i) ou (ii) et codant un polypeptide permettant l'association des chaînes de globine entre elles , les conditions de stringences comprenant des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

20. Procédé de préparation de molécules d'acide nucléique codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- (i) une étape de mise en présence de la molécule d'hémoglobine avec au moins un agent dissociant et un agent réducteur, l'agent réducteur étant un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres, permettant la dissociation, puis la réduction, de ladite molécule d'hémoglobine, afin d'obtenir les chaînes protéiques constituant ladite molécule ;
- (ii) l'isolement de chacune des chaînes protéiques obtenues à l'étape (i);
- (iii) le microséquençage par spectrométrie de masse et le séquençage d'Edman de chacune des chaînes protéiques isolées obtenues à l'étape (ii), afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés ;
- (iv) la détermination de couples d'amorces dégénérées à partir des microséquences; et
- (v) la préparation des molécules d'acide nucléique codant pour les chaînes protéiques, à partir des couples amorces obtenues à l'étape (iv), par un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant les étapes suivantes :
 - (a) une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C ;
 - (b) un cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprenant les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C ;
 - * une étape d'hybridation d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 56°C ; et
 - * une étape d'élongation d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C ; et
 - (c) une étape d'élongation d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

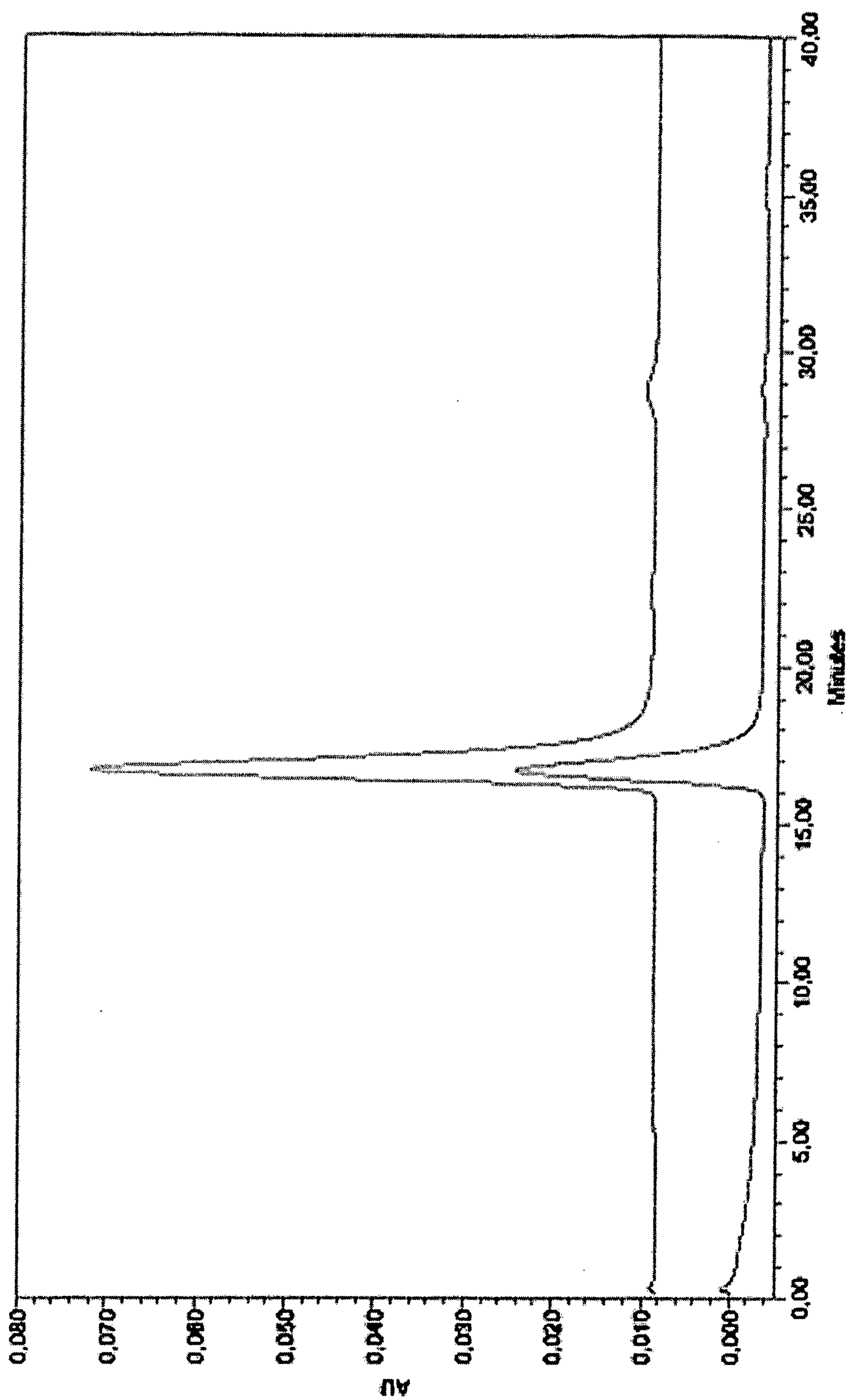


FIGURE 1

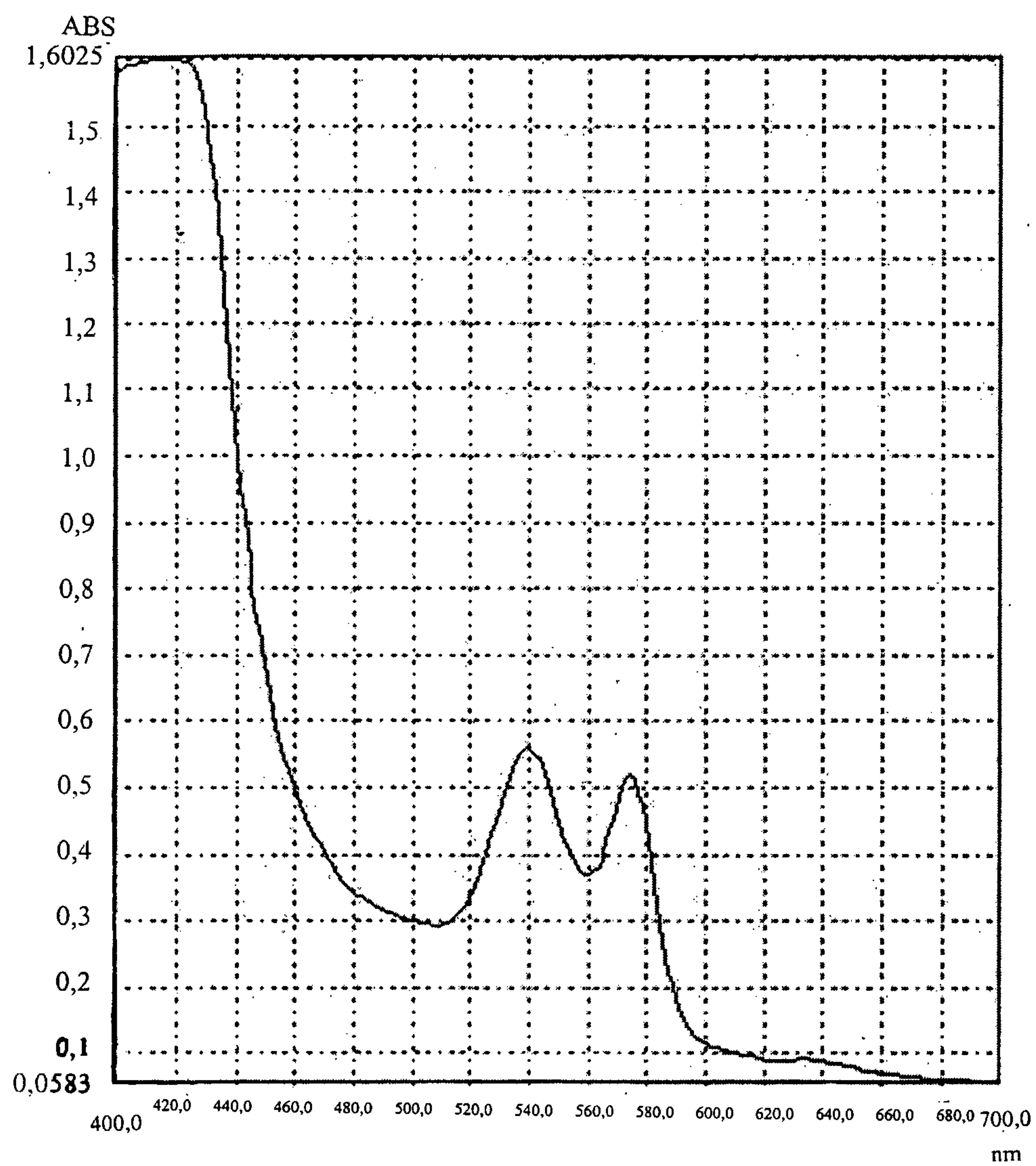


FIGURE 2

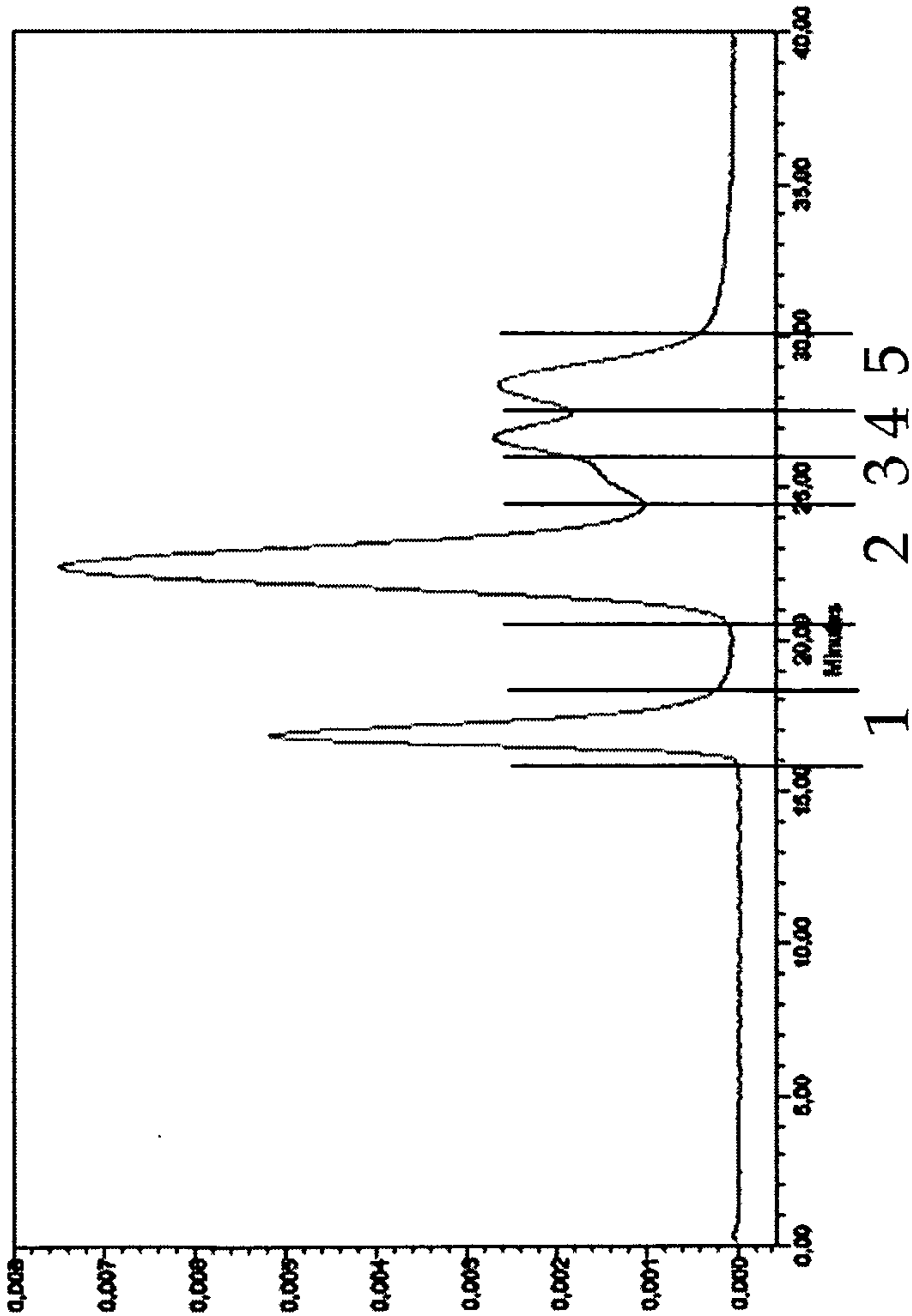


FIGURE 3

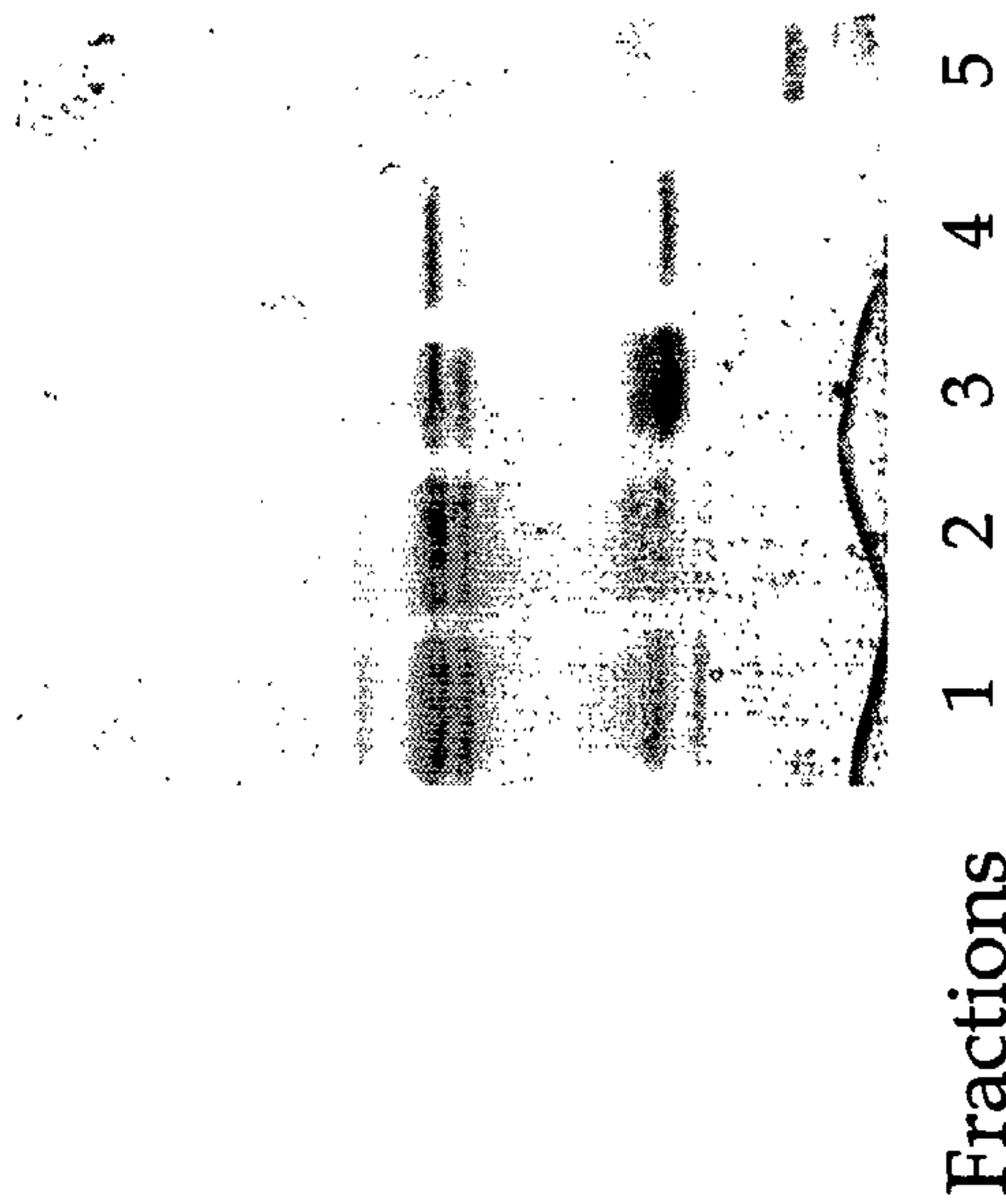


FIGURE 4

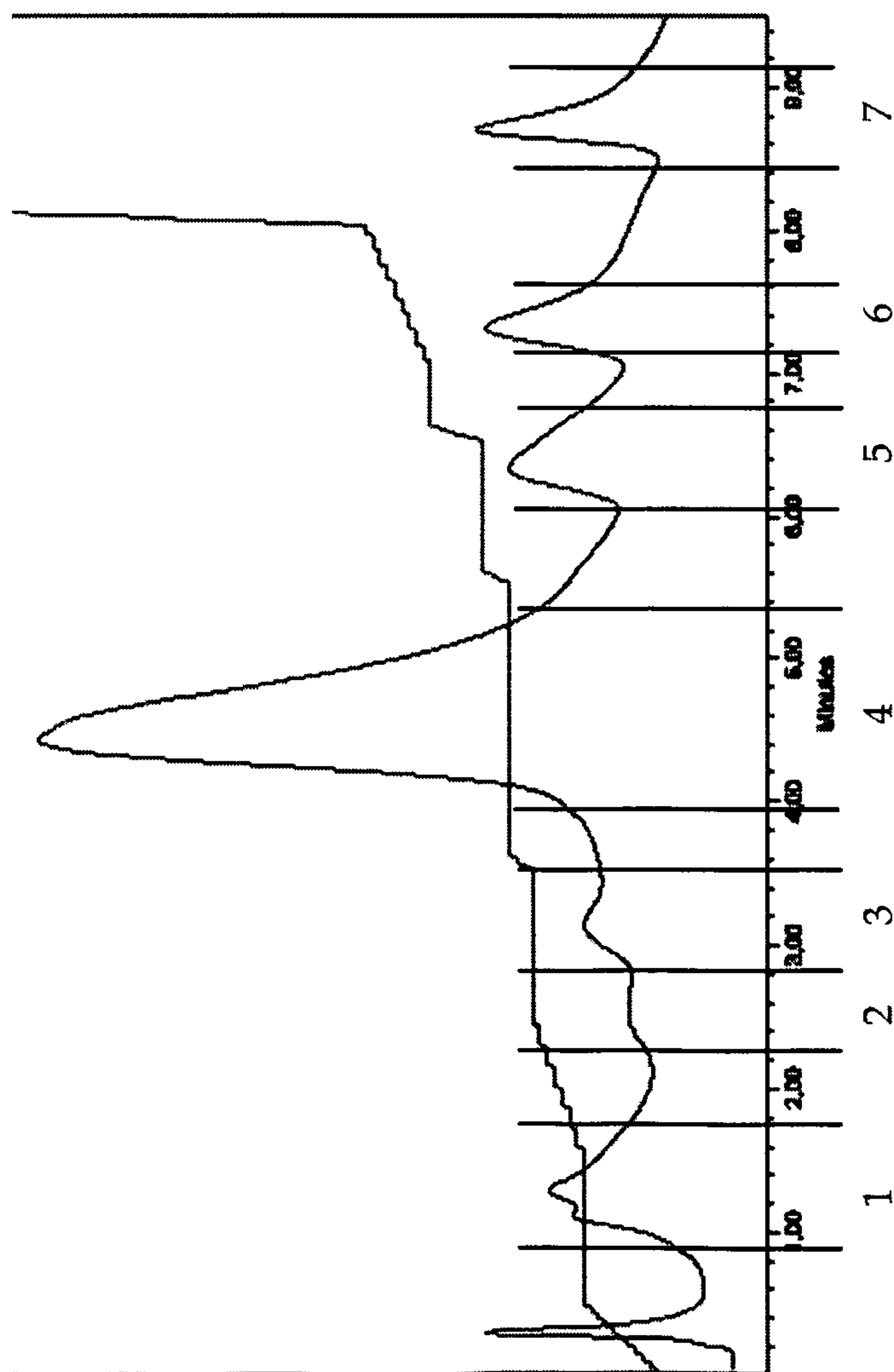


FIGURE 5

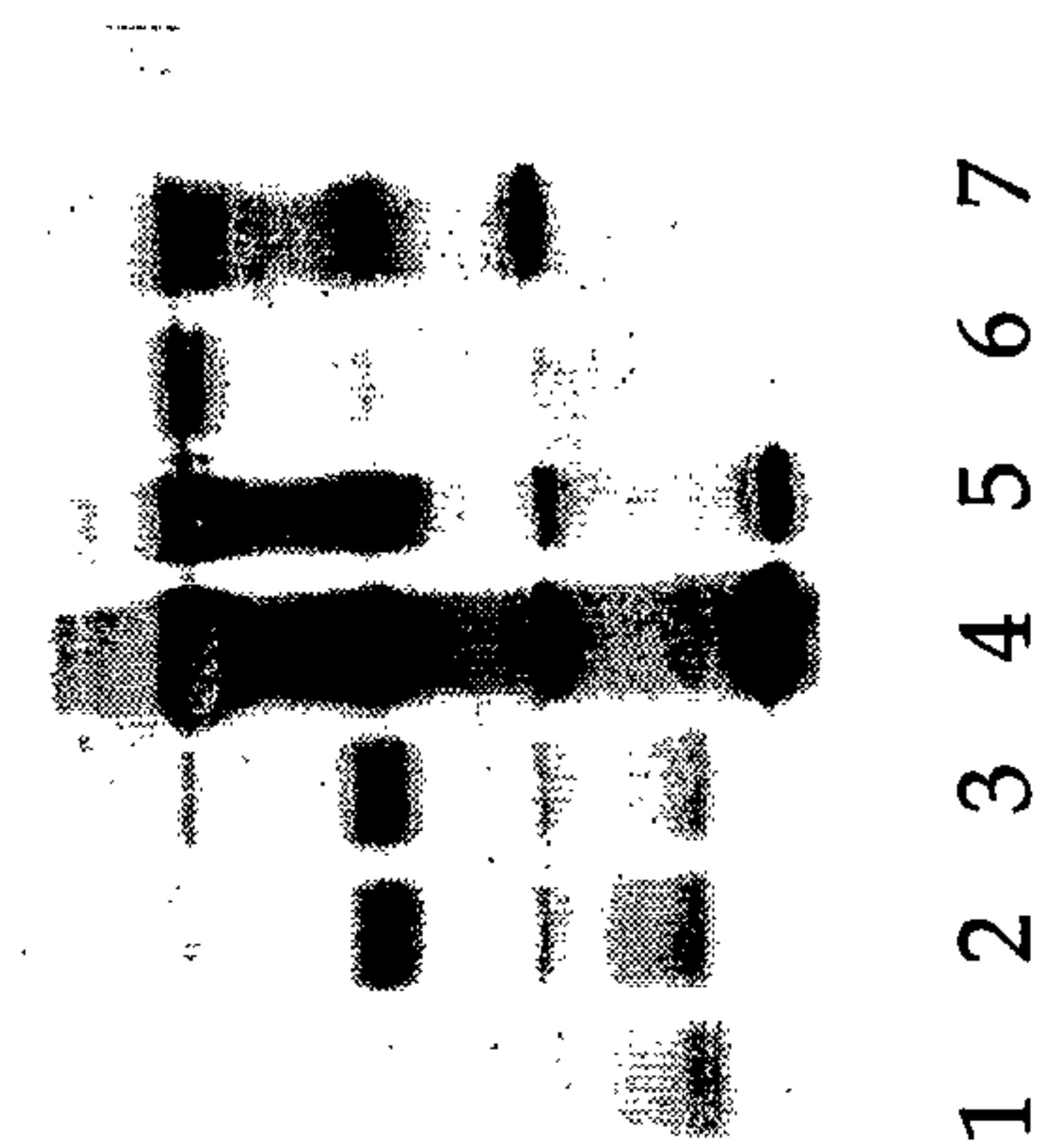


FIGURE 6

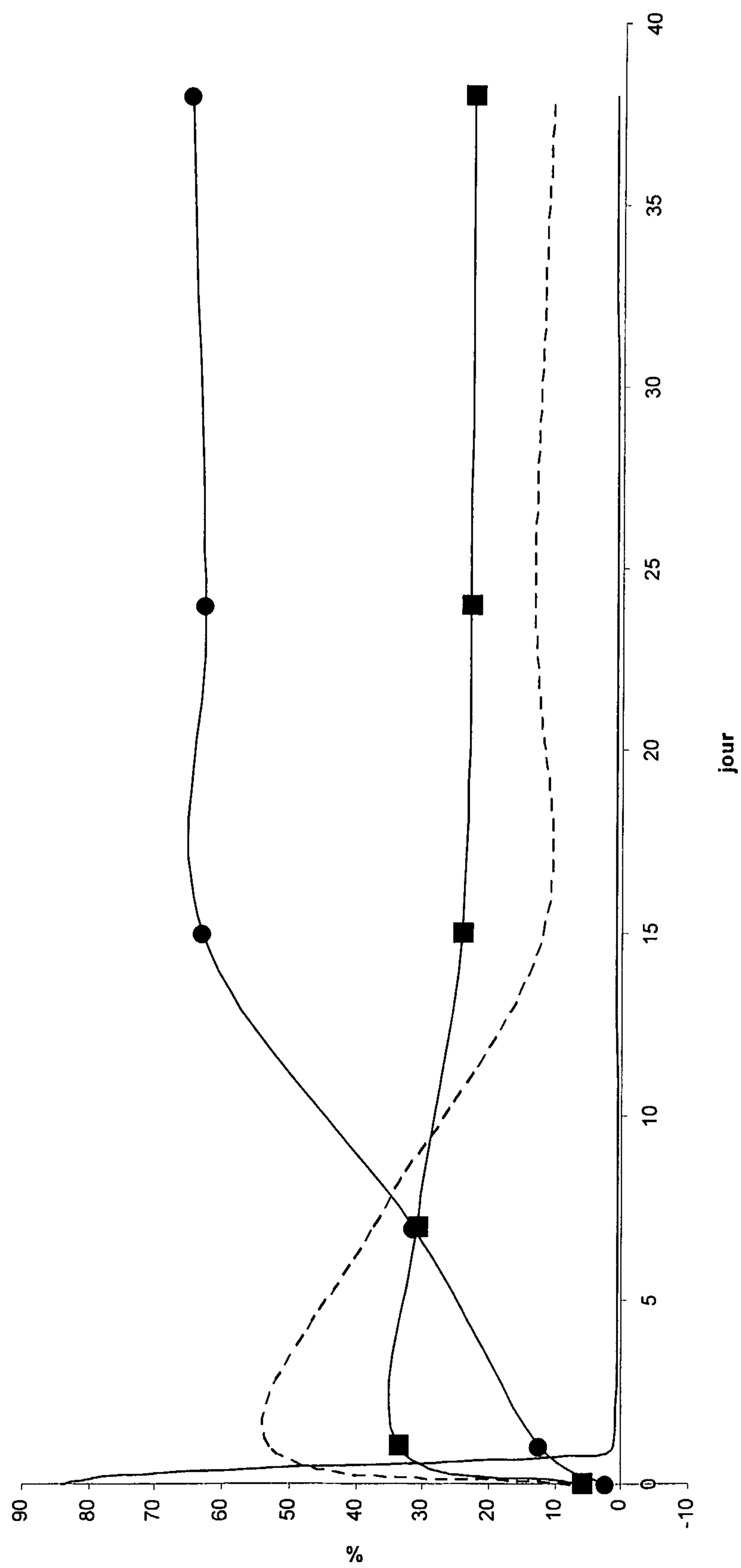


FIGURE 7

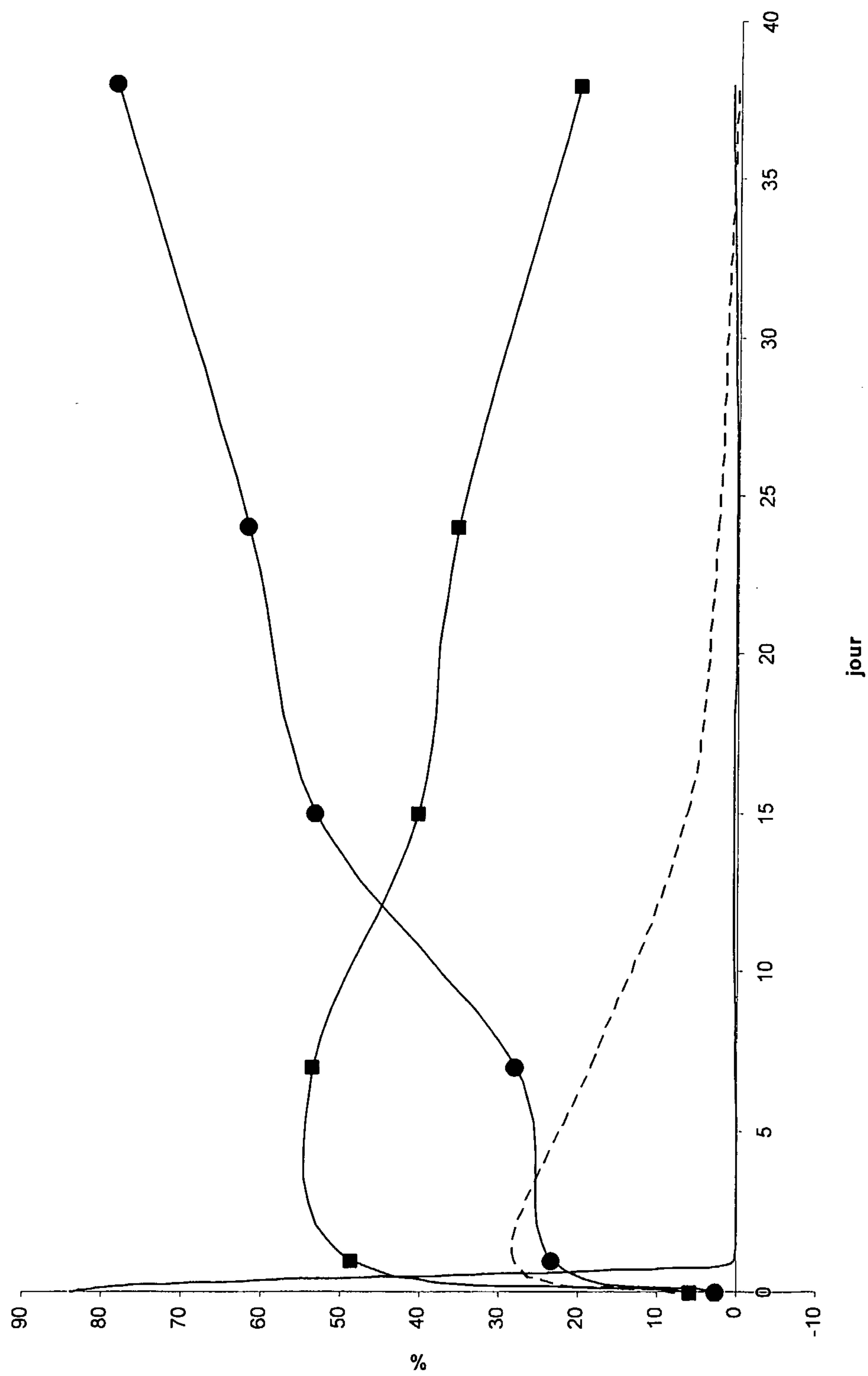


FIGURE 8

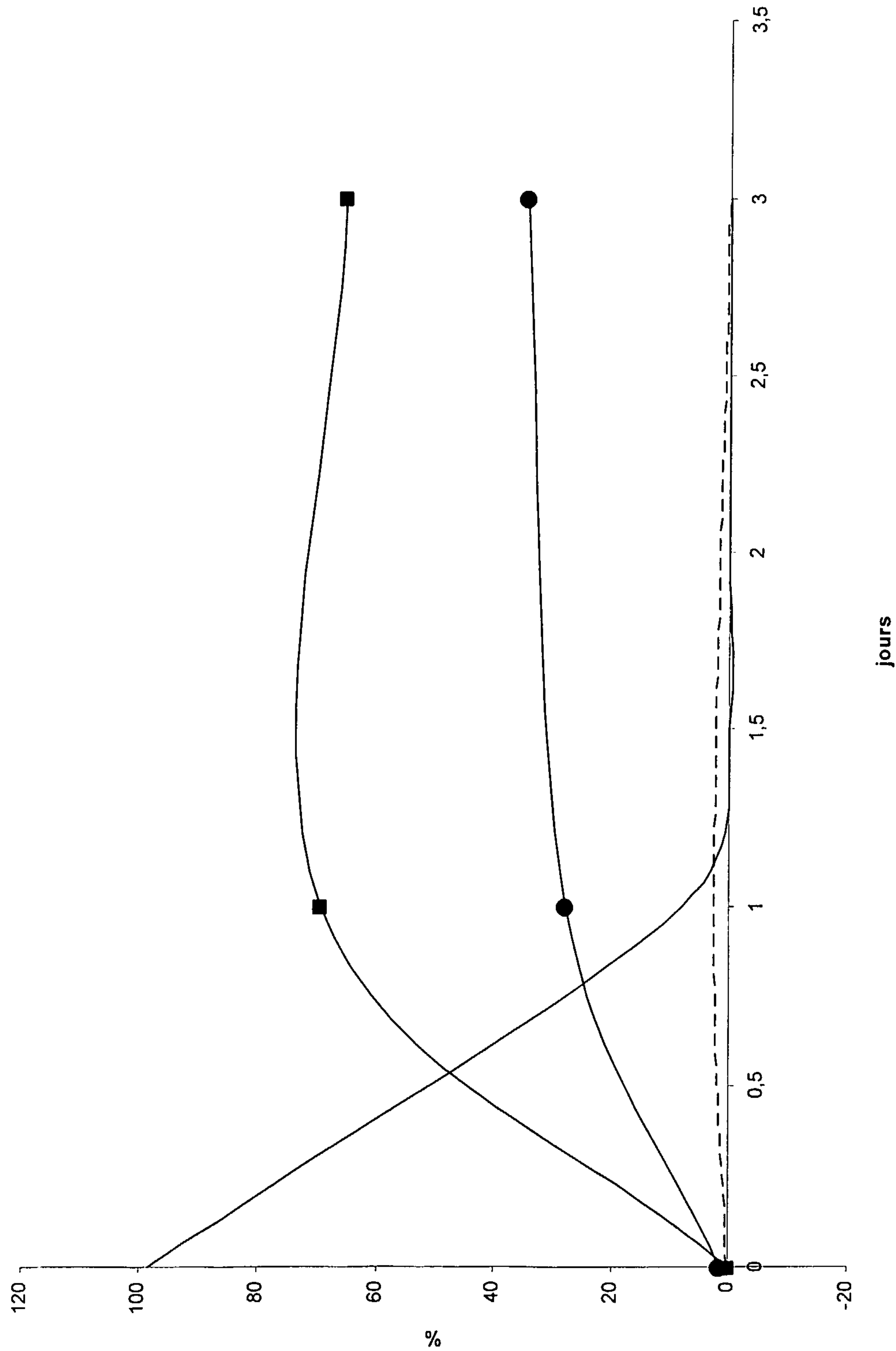


FIGURE 9

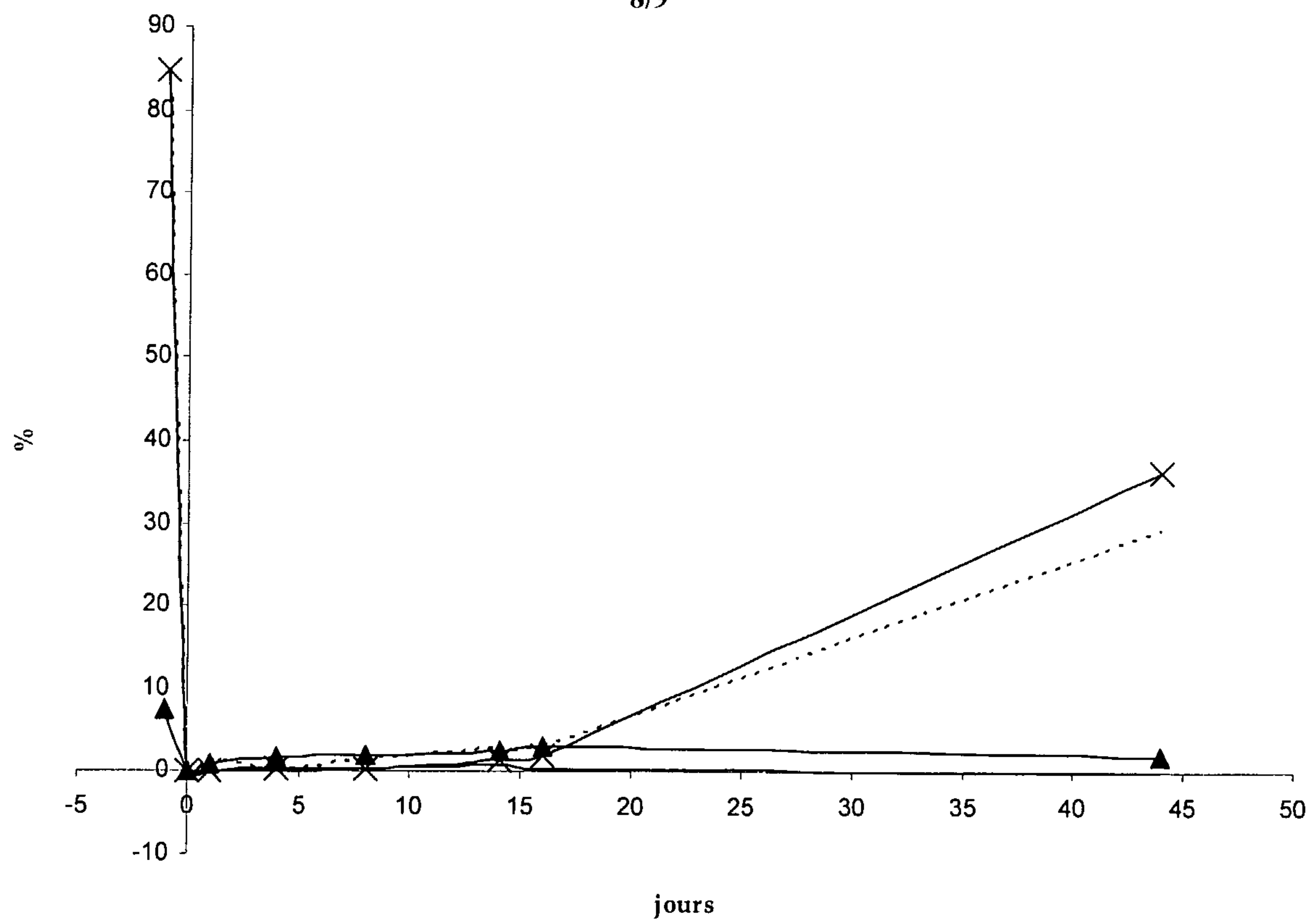


FIGURE 10

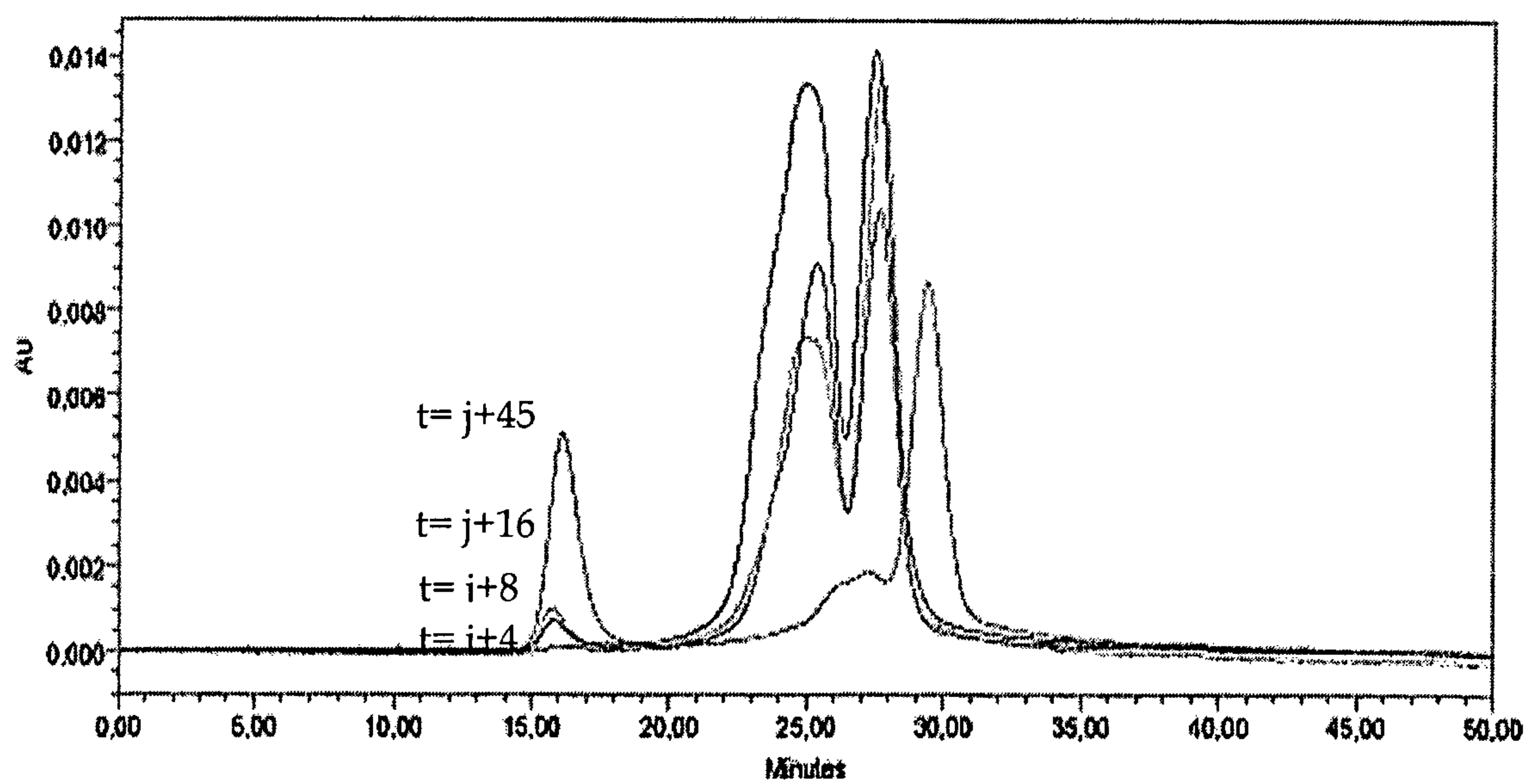


FIGURE 11

9/9

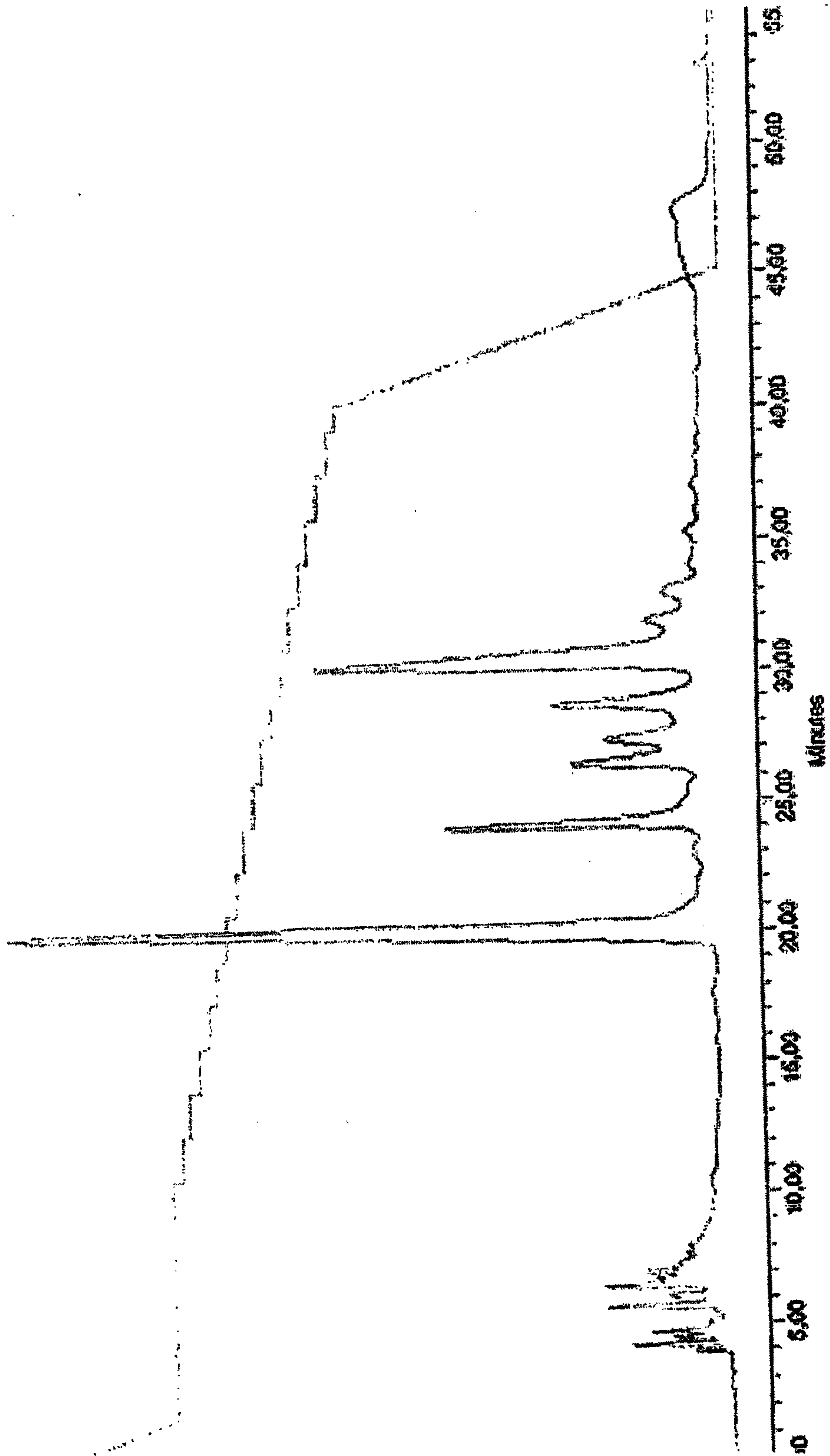


FIGURE 12