

## NOUVELLES ÉTUDES SUR L'HYDROXYLYSINE

par

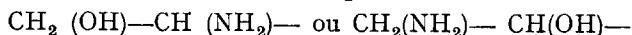
P. DESNUELLE ET S. ANTONIN

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences, Marseille (France)*

C'est en 1921 que VAN SLYKE et HILLER<sup>1</sup> signalent, dans la gélatine, la présence d'un amino-acide nouveau. Quelques années plus tard, SCHRYVER<sup>2</sup> décrit un acide aminé à propriétés fortement basiques, formant un carbamate de baryum insoluble dans l'eau ; son phosphotungstate est, en outre, insoluble dans les acides dilués et son complexe argentique, soluble en milieu barytique ; on le rencontre donc, au cours du processus de séparation classique, dans la fraction „lysinique” des hydrolysats. L'examen de sa formule brute et le fait qu'il donne, sous l'action du chlorure de benzoyle en milieu alcalin, un dérivé tribenzoylé, conduisent cet auteur à supposer que le nouvel amino-acide, qu'il appelle hydroxylysine, possède six atomes de carbone, deux fonctions  $\text{—NH}_2$  et une fonction  $\text{—OH}$ . Ces vues ont d'ailleurs été confirmées par la suite, quoiqu'elles semblent, a priori, reposer sur une erreur expérimentale : il est en effet difficile d'admettre que, dans les conditions indiquées au cours de ce travail, la benzylation puisse porter, de façon sensible, sur une fonction hydroxyle.

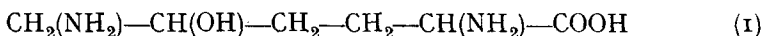
Partant de diverses protéines, SCHRYVER isole, d'autre part, d'importantes quantités d'hydroxylysine en la précipitant successivement sous forme de phosphotungstate et de carbamate de baryum ; il dit en obtenir, par cette méthode qui, dès l'abord, paraît assez grossière, 1,8 à 3,3% à partir de différentes gélatines de poissons, 3,3% à partir d'édestine et 1,5% à partir de la fraction protéique totale du grain d'avoine. Par contre, un échantillon de gélatine provenant d'animaux terrestres en fournit moins de 0,3% et l'ovalbumine ainsi que la caséine s'en révèlent totalement dépourvues.

VAN SLYKE et coll.<sup>3, 4, 5</sup>, reprenant récemment la question, préparent à partir de la fraction „lysinique” d'un hydrolysats de gélatine, un picrate plus soluble dans l'eau que le picrate de lysine et fondant (avec décomposition) à 225°. La formule brute de la base correspondante, isolée sous forme de chlorhydrate, ne diffère de celle de la lysine que par la présence d'un oxygène supplémentaire. Cette base contient, d'une part, trois groupements ionisables ( $\text{pK}' = 2,13, 8,62$  et  $9,50$ ) ; les deux premiers sont ainsi analogues aux groupements carboxyl et  $\alpha$  aminé de la lysine ( $\text{pK}' = 2,20$  et  $8,90$ ) tandis que le troisième est nettement moins alcalin que le groupement  $\text{—NH}_2$  en  $\varepsilon$  de cet amino-acide ( $\text{pK}' = 10,28$ ). Elle donne naissance, d'autre part, au cours de son oxydation par l'acide periodique, à une molécule de formol et une molécule d'ammoniaque. Cette dernière réaction est caractéristique<sup>6</sup> des structures :

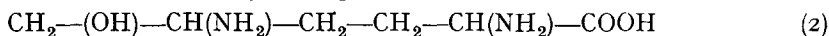


Il est donc tout-à-fait probable que le nouvel amino-acide porte un groupement hydroxyl en  $\alpha$  de sa deuxième fonction amine et, comme rien n'indique que sa chaîne

soit ramifiée, il semble qu'il faille l'identifier soit à l'acide  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -diamino- $\delta$ -hydroxycaproïque



soit à l'acide  $\alpha$ ,  $\delta$ -diamino- $\epsilon$ -hydroxycaproïque



MARTIN et SYNGE de leur côté<sup>7</sup>, partant également de gélatine, préparent de l'hydroxylysine pure (P.F. du picrate : 226—227°) en appliquant leur méthode générale de séparation des acides aminés hydroxylés par acétylation-benzoylation<sup>8</sup>. La benzoylation ne se fait d'ailleurs, malgré toutes les précautions prises, qu'avec un rendement très faible ; l'hydroxyle de l'acide-amino est donc probablement secondaire (formule 1).

L'ensemble de ces derniers travaux, s'il ne résoud pas de façon tout-à-fait définitive le problème de la structure de l'hydroxylysine, met cependant hors de doute sa présence dans les hydrolysats de gélatine.

Etendant leurs recherches, VAN SLYKE et coll.<sup>9</sup> ont alors cherché à doser cet acide-amino dans divers hydrolysats protéiques. Ils le séparent, dans ce but, des autres acides aminés  $\beta$  hydroxylés, par précipitation phosphotungstique. Le phosphotungstate d'hydroxylysine, quoique notablement soluble dans l'eau, est entraîné par les phosphotungstates des autres bases, pourvu que celles-ci soient présentes en quantités suffisantes. Les dernières traces d'hydroxyacides monoaminés sont éliminées par recristallisation des phosphotungstates et, après régénération des bases, on mesure la quantité d'ammoniaque libérée par l'acide periodique en milieu alcalin. De nombreuses protéines ont été analysées grâce à cette méthode, mais aucune d'entre elles n'a présenté une teneur en hydroxylysine supérieure à 1% (Tableau V). Les plus riches sont le collagène (extrait des tendons d'Achille du Chat) (0,88%) ainsi qu'une série de gélatines extraites d'animaux terrestres (0,7—0,9%). Viennent ensuite une préparation végétale désignée sous le nom d' „aleuronate" (0,54%), la zéine du maïs (0,33%) et la caséine (0,33%).

Les deux méthodes de dosage proposées jusqu'ici conduisant à des résultats souvent contradictoires, il est bien difficile d'en retirer une impression générale concernant la répartition de l'hydroxylysine dans la nature. Il nous a donc paru utile de reprendre la question dans son ensemble car elle est importante à un double point de vue :

1° Il est intéressant en soi de savoir si certaines protéines partagent réellement avec le collagène et la gélatine, le privilège de posséder le nouvel acide-amino en quantités notables.

2° Il importe de doser cet acide-amino car la méthode de dosage de la sérine d'après SHINN et NICOLET<sup>10</sup> ainsi que d'après DESNUELLE et coll.<sup>11</sup>, reposant sur la détermination du formol auquel donne naissance les hydrolysats protéiques par oxydation periodique, n'est plus spécifique en sa présence.

Il semble, d'autre part, que la méthode préconisée par VAN SLYKE, si elle marque sur celle de SCHRYVER un important progrès, n'est pas, non plus, à l'abri de toute critique. La détermination de l'hydroxylysine, qui doit être conduite en présence d'un gros excès d'acides-amino aisément désaminables, s'effectuerait, en effet, avec une sécurité plus grande si elle reposait sur le dosage d'une autre substance que l'ammoniaque.

Rappelons ici tout d'abord que le formol auquel l'hydroxylysine donne naissance par oxydation periodique peut être aisément déterminé grâce à une technique de microdosage colorimétrique récemment mise au point au Laboratoire<sup>11</sup> ; cette technique

semble, a priori, de par sa sensibilité \*, convenir particulièrement bien au dosage d'un amino-acide aussi peu répandu que celui-ci paraît être.

Possédant, par ailleurs, un caractère basique sans doute moins accentué que celui de la lysine, mais en tout cas bien supérieur à celui de l'histidine, l'hydroxylysine passe, selon toute probabilité, à la cathode au cours de la séparation des bases hexoniques par ionophorèse <sup>12</sup>. La séparation avec la sérine peut donc être tentée d'une façon moins laborieuse et plus sûre que celle impliquant la précipitation des phosphotungstates.

Au cours du présent travail, nous avons donc dosé l'hydroxylysine dans divers hydrolysats protéiques en séparant cette base de la sérine par ionophorèse et en déterminant colorimétriquement le formol auquel elle donne naissance quand on l'oxyde par le periodate de sodium.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### I. RAPPEL DU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA SÉRINE <sup>11</sup>

a cc. d'une solution contenant de 0,2 à 1,4 mg de sérine et amenée à pH 7, 5—8, sont mélangés dans un tube à essais rodé à (3—4)cc. d'eau et 0,7 cc. d'une solution de periodate de Na à 15%. Le mélange est maintenu à 27° environ pendant 20 minutes, puis refroidi dans la glace et additionné de 0,4 cc. de nitrate de K saturé. On laisse décanter le periodate de K qui précipite à cet instant et on prélève 1cc. de la liqueur surnageante que l'on dilue à 10 cc. A cc. de cette dilution sont amenés à 10 cc. avec de l'eau et additionnés de 2 cc. d'une solution fraîchement préparée de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1%. On maintient 20 min. à 27° environ, refroidit très soigneusement dans la glace et ajoute 1cc. d'une solution fraîche de ferricyanure de K à 2%. On laisse 20 min. dans la glace et ajoute doucement et en agitant bien, 5 cc. d'HCl concentré préalablement refroidi. Il apparaît alors, dans un milieu parfaitement limpide, une coloration rouge dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de formol présent, est mesurée au stufophotomètre de PULFRICH (filtre S 53) en utilisant comme liqueur compensatrice un mélange, traité dans les mêmes conditions, de tous les réactifs sauf le formol. Au préalable, une courbe de référence a été établie en présence d'iodate, de periodate et de nitrate de K, avec une solution de formol fraîchement distillée et titrée par iodométrie.

### 2. DOSAGE DU FORMOL APPARAISSANT AU COURS DE L'OXYDATION PERIODIQUE DE L'HYDROXYLYSINE

Il importe, tout d'abord, de savoir si les conditions expérimentales mises au point pour le dosage de la sérine permettent une réaction quantitative du periodate sur

TABLEAU I

FORMOL DÉGAGÉ EN FONCTION DU TEMPS AU COURS DE L'OXYDATION PERIODIQUE DE L'HYDROXYLYSINE

Temps d'action (min.)	Formol apparu (γ)		
	1° essai	2° essai	3° essai
0	0	0	0
5	285	445	595
10	320	450	598
15	320	447	600
20	321	443	602

\* 1 γ de formol peut encore être dosé avec exactitude.

l'hydroxylysine. Dans ce but, nous avons préparé un échantillon d'hydroxylysine à partir de gélatine selon la technique de VAN SLYKE<sup>3</sup> sans chercher, d'ailleurs, à éliminer totalement la lysine. Une partie de cette préparation traitée par le periodate de Na dans les conditions expérimentales qui viennent d'être décrites, a donné naissance aux quantités de formol indiquées par le Tableau I.

Les chiffres du Tableau I montrent que l'attaque de l'hydroxylysine se produit, dans nos conditions expérimentales, plus rapidement que celle de la sérine elle-même. Après 10 minutes, elle s'arrête brusquement et l'on a tout lieu de croire qu'elle est totale à ce moment.

### 3. COMPORTEMENT DE L'HYDROXYLYSINE ET DE LA SÉRINE AU COURS DE L'IONOPHORÈSE

La technique d'ionophorèse utilisée au cours de ce travail est identique à celle mise au point par KUHN et DESNUELLE<sup>12</sup> pour séparer les bases hexoniques d'un hydrolysât protéique et appelé primitivement „électrodialyse” par ces auteurs. Rappelons que l'appareil employé est celui de PAULY ; il comporte trois compartiments successifs séparés par une double épaisseur de cellophane perméable que l'on a préalablement déglycérinée avec soin. Le compartiment médian reçoit l'hydrolysât parfaitement débarrassé de ses ions minéraux ( $p_H$  compris entre 6 et 7,2). Les deux autres, remplis d'eau distillée, sont munis, à faible distance des membranes, de deux électrodes circulaires en toile de platine entre lesquelles on applique une tension continue de 190 volts. Dans ces conditions, les bases hexoniques sont rapidement transportées à la cathode et l'opération est interrompue quand l'histidine, la plus faiblement dissociée de ces bases, a complètement disparu du compartiment médian\*. Son contenu ( $M_1$ ), présentant généralement, à ce moment, un  $p_H$  compris entre 4,5 et 5, est réuni à la liqueur anodique  $A_1$ , tandis que la liqueur cathodique ( $C_1$ ) est soumise à une nouvelle ionophorèse identique. Celle-ci permet d'obtenir 3 fractions,  $M_2$ ,  $A_2$ , et  $C_2$ .  $A_2$  est réuni à  $M_2$  et l'on est en présence, en fin de compte, de trois solutions :  $A_1 + M_1$ ,  $A_2 + M_2$  et  $C_2$ . Dans  $C_2$  se trouvent les bases hexoniques.

#### a. Comportement de l'hydroxylysine.

Nous avons tout d'abord vérifié que l'hydroxylysine passait quantitativement à la cathode dans ces conditions expérimentales. Mélange soumis à l'ionophorèse : hydroxylysine : 27 mg., lysine 250 mg., histidine : 45 mg., glyocolle : 200 mg. et acide glutamique 250 mg.  $p_H$  du compartiment médian, initial : 7,1—final : 4,9. Durée : 210 min. Intensité de 110 à 40 milli-A. Hydroxylysine dans le compartiment cathodique : 26,5 mg.

#### b. Comportement de la sérine.

On peut prévoir, a priori, qu'une certaine portion de la sérine contenue dans le compartiment médian, passe à la cathode au cours de l'ionophorèse, quoique cet amino-acide soit électriquement neutre dans les conditions de  $p_H$  utilisées. Ce passage s'effectuera soit par diffusion à travers la membrane de cellophane soit par électroendosmose<sup>13</sup>. Des expériences d'orientation, effectuées sur des mélanges d'acides aminés, nous ont en effet montré que le liquide  $C_1$  contient des quantités très notables de sérine (15%

\* La réaction à l'acide diazosulfanilique est alors négative après benzylation de la tyrosine.

environ de la quantité totale). Le liquide  $C_2$  n'en est pas non plus complètement exempt (1,5% de la quantité totale). Cette teneur, pratiquement négligeable quand il s'agit de doser l'arginine, l'histidine et la lysine dans ce liquide, est au contraire susceptible d'introduire d'importantes erreurs par excès dans le dosage de l'hydroxylysine. Il importe donc d'établir une correction.

Parmi les facteurs variables susceptibles d'exercer une influence sur le phénomène, il faut citer : la durée de l'ionophorèse, la concentration de la sérine dans le compartiment médian et le nombre d'ions basiques traversant la membrane cathodique. Nous avons trouvé, d'ailleurs, que ce dernier facteur est pratiquement négligeable et que la quantité de sérine passant à la cathode est à peu près proportionnelle aux deux premiers, s'ils ne varient pas dans des limites trop larges.

Une solution de composition analogue à celle des liquides  $C_1$  et contenant 17,8 mg. de sérine (formol correspondant : 5,2 mg.), 95 mg. de bases hexoniques et 60 mg. d'autres amino-acides ( $p_H = 7,2$ ) a été soumise à l'ionophorèse jusqu'à disparition de l'histidine (165 min.). Sérine trouvée dans  $C_2$  : 2,5 mg. (formol correspondant : 0,72 mg.). Soient maintenant  $F_2$  et  $F_3$  les quantités de formol qui prennent naissance quand on traite par le périodate de sodium les fractions  $A_2 + M_2$  et  $C_2$  d'un hydrolysats quelconque (durée de la 2e ionophorèse : T min.). La quantité de formol qui revient à l'hydroxylysine pourra être obtenue en retranchant de  $F_3$  le facteur correctif :

$$f = 0,72 \cdot \frac{F_2 \cdot T}{5,2 \cdot 175}$$

#### 4. CONDUITE D'UNE IONOPHORÈSE

Le Tableau III rappelle les conditions expérimentales d'une séparation type par ionophorèse (pour plus de détails voir <sup>12</sup>) :

TABLEAU II

IONOPHORÈSE D'UN HYDROLYSAT D'ALBUMINE D'OEUF CRISTALLISÉE

Pds de protéine : 1,26 gr. Différence de potentiel : 190 volts.

Ionophorèse	Temps (min.)	Intensité (milli-A.)	pH (milieu)	M		C		Obs.
				A	H	A	H	
I	0	130	6,7	++	++	o	o	* *
	15	120	6,2	++	++	+	o	
	60	100	5,4	+	+	++	++	
	120	60	4,9	~ o	~ o	+	+	
	165	50	4,8	o	~ o	~ o	+	
	240	50	4,8	o	o	~ o	+	
II	0	100	7,2	++	++	o	o	* *
	45	80	5,8	+	++	++	~ o	
	105	40	5,3	~ o	+	++	++	
	180	10	5,2	o	+	o	+	
	225	10	5,1	o	o	o	+	

Les compartiments médians (M) et cathodique (C) contiennent de l'arginine (A) et de l'histidine (H) en quantités fortes (++), faibles (+), très faibles (~ o) ou nulles (o). Le signe \* dans la dernière colonne signifie que l'on a remplacé à ce moment le contenu du compartiment cathodique par de l'eau distillée.

## 5. DOSAGE DE L'HYDROXYLYSINE DANS DIVERSES PROTÉINES

## a. Préparation des protéines utilisées.

La „protéine de l'avoine” a été extraite de la farine d'avoine par la soude N. Précipitée à  $pH = 5$  par l'acide acétique, elle est débarassée de l'amidon qu'elle contient par de nombreuses dissolutions et précipitations successives.

L'albumine d'oeuf a été obtenue cristallisée à partir de blanc d'oeuf frais par la méthode de SØRENSEN<sup>14</sup>.

La séricine a été séparée de la fibroïne en traitant à  $100^{\circ}$  pendant 30 min. des fils de soie de Canton en suspension dans l'eau. Le liquide d'extraction, évaporé sous vide jusqu'à début de gélatinisation, est versé, encore chaud, dans 8 fois son volume d'alcool.

La glycine a été extraite, par  $NaCl$  10%, de la farine de soja dégraissée. L'extrait est saturé par  $SO_4Am_2$ . Le précipité centrifugé, puis lavé, est dissous dans  $SO_4Am_2$  5% ; on recueille la fraction qui précipite par dialyse et on la dissout dans  $NaCl$  10%. On lave et sèche les premières portions qui précipitent quand on dilue cette dernière solution avec de l'eau.

La préparation désignée sous le nom de „protéine totale du muscle de rat” nous a été fournie aimablement par Prof. ROCHE.

Pour la caséine (d'après HAMMARSTEN), l'édestine (HOFFMANN-LA ROCHE), l'élastine, l'ovalbumine (RHÔNE POULENC) et la gélatine (COIGNET), nous avons utilisé les produits commerciaux sans purification préalable.

## b. Résultats obtenus et conclusions.

Les diverses protéines sont hydrolysées pendant 24 heures à  $110^{\circ}$  avec  $SO_4H_2$  6 N sauf la gélatine, qui n'est traitée que 6 heures seulement. L'hydrolysate est amené à 100 cc. et 5 cc. en sont prélevés pour un dosage d'azote. Sur le reste, on élimine  $SO_4H_2$  par la quantité de baryte calculée moins 5% et le sulfate de Ba est centrifugé puis lavé à l'eau chaude. Une fois concentrée, la liqueur est amenée à  $pH = 9$  par de la baryte et maintenue 1/2 heure à  $40^{\circ}$  sous vide pour éliminer l'ammoniaque. L'ion  $Ba^{++}$  est quantitativement

TABLEAU III

QUANTITÉS DE FORMOL DONNÉES PAR L'OXYDATION PERIODIQUE DES FRACTIONS SÉPARÉES PAR IONOPHORESE

Protéine	Pds. mis en jeu (g.)	Formol total (mg.)	F <sub>1</sub> (mg.)	F <sub>2</sub> (mg.)	F <sub>3</sub> (mg.)	Somme F <sub>1</sub> +F <sub>2</sub> +F <sub>3</sub>
Gélatine („COIGNET médaille d'Or")	1,0	15,0	8,0	4,0	2,7	14,7
Gélatine („COIGNET médaille d'Or N° 1")	1,30	19,7	12,0	4,6	2,9	19,5
Gélatine („COIGNET qualité "A"")	1,46	22,3	13,3	5,4	3,4	22,1
„Protéine de l'avoine"	1,45	18,0	10,5	4,8	1,8	17,1
Protéine de BENGE JONES	0,77	16,3	14,1	1,3	0,4	15,8
„Protéine totale du muscle de rat"	2,70	17,8	12,0	4,0	1,0	17,0
Ovalbumine	1,26	26,1	18,6	5,6	1,35	25,55
Albumine d'oeuf crist.	1,07	23,0	18,4	3,7	0,6	22,7
Edestine	1,78	15,0	11,8	2,8	0,7	15,3
Caséine	1,16	17,5	14,2	3,0	0,5	17,7
Séricine	1,00	88,5	63,8	21,2	2,5	87,5
Glycine	1,47	16,3	10,3	5,0	0,8	16,1
Elastine	5,20	17,8	10,5	5,2	0,95	16,65

précipité par la quantité exactement nécessaire de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  dilué. Le deuxième précipité est traité comme le premier et les diverses liqueurs, une fois réunies, sont évaporées à 100 cc. Sur une partie aliquote, on dose le formol total apparaissant après oxydation periodique et le reste est soumis à deux ionophorèses successives.

Les trois fractions  $A_1 + M_1$ ,  $A_2 + M_2$  et  $C_2$ , traitées par le periodate de Na dans les conditions habituelles, donnent naissance, respectivement, à  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  mg. de formol. Ces valeurs, pour les diverses protéines analysées, sont données par le Tableau III.

Le Tableau IV donne les teneurs de ces diverses protéines en hydroxylysine telles que l'on peut les calculer à partir des chiffres du Tableau III.

TABLEAU IV  
TENEUR EN HYDROXYLYSINE DE DIVERSES PROTÉINES

Protéines	$F_3$	$F_2$	T	f	$F_3-f$	Hydroxylysine		N prot. total (mg.)	N-hydroxylysine en % de N total
						mg.	N (mg.)		
Gélatine „Méd. d'Or"	2,7	4,0	165	0,55	2,15	11,5	2,01	183	1,1
Gélatine „Méd. d'Or N° 1"	2,9	4,6	120	0,45	2,45	13,3	2,51	211	1,1
Gélatine „Qualité A"	3,4	5,4	135	0,55	2,85	15,4	2,66	267	1,0
Protéines de l'avoine"	1,8	4,8	165	0,7	1,1	5,9	1,02	204	0,5
Prot. de BENGE JONES	0,4	1,3	150	0,16	0,24	1,3	0,23	112	0,2
„Prot. totale muscle rat"	1,0	4,0	180	0,65	0,35	1,9	0,32	351	0,1
Ovalbumine	1,35	5,6	225	1,05	0,3	1,6	0,28	196	0,1
Albumine d'œuf crist.	0,6	3,7	135	0,35	0,25	1,3	0,23	168	0,1
Edestine	0,7	2,8	150	0,35	0,35	1,9	0,32	315	0,1
Caséine	0,5	3,0	180	0,45	0,05	0,3	0,05	181	0,0
Séricine	2,5	21,2	135	2,4	0,1	0,5	0,05	148	0,0
Glycinine	0,8	5,0	195	0,8	0,0	0,0	0,00	270	0,0
Elastine	0,95	5,2	165	0,73	0,22	1,2	0,20	598	0,0

Nous avons réuni dans le Tableau V, les résultats obtenus par SCHRYVER, VAN SLYKE et nous-même afin d'en rendre la comparaison plus facile.

TABLEAU V  
TABLEAU RÉCAPITULATIF DU DOSAGE DE L'HYDROXYLYSINE DANS LES PROTÉINES  
Les résultats sont donnés en N-hydroxylysine % de N protéique total.

Protéines	VAN SLYKE	Résultats du présent travail	SCHRYVER
Gélatine „Médaille d'Or"	0,89	1,1	0,3
Gélatine „Neutre"	0,9	—	—
Gélatine „Médaille d'Or N° 1"	—	1,1	—
Gélatine „Qualité A"	—	1,0	—
Collagène	0,88	—	—
Gélatine de porc	0,73	—	—
Gélatines de poissons	—	—	1,8—3,3
„Aleuronate"	0,54	—	—
„Protéines totales de l'avoine"	—	0,5	1,5
Zéine	0,33	—	—

Protéines	VAN SLYKE	Résultats du présent travail	SCHRYVER
Globuline du coton . . . . .	0,23	—	—
Protéine de BENCE JONES . . . . .	—	0,2	—
Gliadine . . . . .	0,12	—	—
„Protéines totales du muscle de rat” . . . . .	—	0,1	—
Ovalbumine . . . . .	0,09	0,1	—
Albumine d'oeuf crist. . . . .	—	0,1	—
Edestine . . . . .	—	0,1	3,28
Caséine . . . . .	0,33	0,0	0
Papaïne brute „A <sup>2</sup> ” . . . . .	0,04	—	—
Lactalbumine . . . . .	0,02	—	—
Lactoglobuline . . . . .	0,02	—	—
Arachine . . . . .	0,01	—	—
Hémoglobine du chat . . . . .	0,00	—	—
„Protéines totales” du plasma de cheval . . . . .	0,03	—	—
Séricine . . . . .	—	0,0	—
Glycinine . . . . .	—	0,0	—
Elastine . . . . .	—	0,0	—

Les chiffres du Tableau V permettent de faire les remarques suivantes :

1° Les divers échantillons de gélatine que nous avons eus à notre disposition, provenant d'animaux terrestres, contiennent bien, comme l'indique VAN SLYKE, 1% environ d'hydroxylysine et non 0,3% comme le prétend SCHRYVER. Cette hydroxylysine, d'ailleurs, n'est pas un artefact apparaissant pendant la préparation de la gélatine, car le collagène en contient des quantités du même ordre. Nous avons montré, d'autre part, qu'elle ne se forme pas au cours de l'hydrolyse de la protéine<sup>15</sup>.

2° Trois préparations d'origine végétale : „l'aleurionate”, la „protéine totale de l'avoine” et la zéine du maïs semblent contenir également cet amino-acide quoiqu'en moindres quantités (0,5—0,3%).

3° Dix autres protéines pures ou mélanges de protéines se révèlent dépourvus d'hydroxylysine. Nous n'en trouvons pas, en particulier, dans la caséine, tandis que VAN SLYKE donne, pour cette protéine, le chiffre de 0,33%.

4° La technique de VAN SLYKE et la nôtre conduisent pour sept protéines ou mélanges de protéines à des valeurs si faibles (0,1—0,2%) qu'il semble difficile d'en conclure à la présence d'hydroxylysine dans ces préparations. Il est peu probable, en particulier, que l'albumine d'oeuf puisse contenir 0,1% d'hydroxylysine, car elle devrait alors posséder un poids moléculaire minimum de 162.000 au lieu de 42.000 comme il est maintenant admis<sup>16</sup>. Nous avons récemment montré, d'autre part, que dans le cas de la gélatine<sup>15</sup>, la teneur en hydroxylysine de la protéine intacte est la même que celle de ses hydrolysats ; l'on ne peut donc admettre que cet amino-acide soit détruit de façon notable en cours d'hydrolyse comme on l'a maintes fois observé pour la sérine et la thréonine. Nous supposons donc que les chiffres précédents trahissent simplement la présence, dans les hydrolysats protéiques, de traces de dipeptides (sérylarginine, séryllysine ou sérylhistidine) se comportant au cours des techniques mises en oeuvre, comme l'hydroxylysine elle-même et pensons, jusqu'à plus ample informé, que ces sept prépara-



tions sont, comme les précédentes, dépourvues d'hydroxylysine. Parmi elles, signalons l'édestine pour laquelle SCHRYVER donne une teneur de 3,3%.

5° Nous n'avons pas vérifié, au cours du présent travail, si les gélatines de poissons contiennent réellement de 1,8 à 3,3% d'hydroxylysine, comptant entreprendre incessamment une recherche systématique de cet amino-acide chez les animaux aquatiques.

6° Quoique les résultats de cette étude n'excluent pas de façon absolue la possibilité de trouver en abondance de l'hydroxylysine dans certaines protéines particulières, ils permettent d'ores et déjà de penser que sa distribution dans la nature est fort parcimonieuse. Jusqu'à plus ample informé, le collagène et la gélatine sont les seules protéines animales qui contiennent cet amino-acide de façon certaine. Ni l'élastine, ni les protéines sanguines ou musculaires, ni les protéines du lait ou l'albumine d'oeuf, ni la sérine si riche pourtant en amino-acides  $\beta$  hydroxylés, n'en possèdent des quantités appréciables. Chez certaines protéines végétales, par ailleurs, quelques traces semblent pouvoir en être décelées.

Le Tableau VI donne enfin les teneurs en sérine des protéines étudiées, teneurs déduites des quantités de formol (Tableau III) que donnent les hydrolysats de ces protéines sous l'action du periodate de Na.

TABLEAU VI  
TENEUR EN SÉRINE DE DIVERSES PROTÉINES

Protéines	N sérine en % de N protéique total	Valeurs déjà publiées
Gélatine „Médaille d'Or"	2,6+	} 3,2 <sup>(19)</sup> 3,7 <sup>(18)</sup> + * 3,7 <sup>(20)</sup> $\pm$ 3,4 <sup>(22)</sup> *
Gélatine „Médaille d'Or N° 1"	3,0+	
Gélatine „Qualité A"	2,6+	
„Protéines de l'avoine"	3,4+	
Protéine de BENGE JONES	6,4	
„Protéines totale du muscle de rat"	2,2	
Ovalbumine	6,2	6,3 <sup>(19)</sup> 8,6 <sup>(20)</sup> $\pm$
Albumine d'oeuf crist.	6,4	
Edestine	2,1	
Caséine	4,3	4,7 <sup>(19)</sup> ; 4,9 <sup>(21)</sup> ; 5,2 <sup>(22)</sup> *; 6,5 <sup>(20)</sup>
Sérine	26,5	33,9 <sup>(17)</sup> *
Glycine	6,0	
Elastine	1,3	
Fibrine	11,4	13,6 <sup>(17)</sup> *; 14,5 <sup>(18)</sup> + *; 13,4 <sup>(20)</sup> $\pm$ .

+ Valeurs corrigées de la teneur en hydroxylysine.

\* Valeurs calculées en g de sérine pour 100 g de protéines. Les auteurs n'indiquant pas la teneur en azote de leurs préparations, rendent impossible toute comparaison précise avec leurs chiffres.

$\pm$  Différences entre les valeurs corrigées obtenues par les auteurs pour „N-amino-acides hydroxylés totaux" et „N-thréonine".

Ces teneurs ne sont d'ailleurs données qu'à titre indicatif car la sérine est peut-être partiellement détruite au cours de l'hydrolyse acide des protéines que nous conduisons sans précautions spéciales.

## RÉSUMÉ

On décrit une nouvelle méthode de dosage de l'hydroxylysine dans les protéines basée sur a) sa séparation d'avec la sérine par ionophorèse et b) le microdosage colorimétrique du formol auquel cet amino-acide donne naissance par oxydation periodique. Vingt-deux protéines ou mélanges de protéines ont été analysés par VAN SLYKE et par nous-même. Fait remarquable, les proportions de cet amino-acide n'atteignent 1% que dans le collagène et la gélatine qui en dérive. Les teneurs des autres protéines sont soit beaucoup plus faibles soit complètement nulles. Ni l'élastine ni les protéines sanguines (cheval) ou musculaires (rat), ni les protéines du lait (lactoglobuline, lactalbumine, caséine), ni l'ovalbumine ni la séricine n'en contiennent d'appréciables quantités. Quelques protéines végétales („aleuronate", „protéine totale de l'avoine", zéine) semblent en recéler de faibles proportions (0,2—0,5%) tandis que d'autres (gliadine, édestine, arachine, glycine, papaine) en sont pratiquement dépourvues.

## SUMMARY

The authors describe a new method for the quantitative determination of hydroxylysin in proteins, based on (a) the separation of oxylysin from serin by ionophoresis, and (b) colorimetric micro-determination of formol formed by the oxidation of this amino acid with periodic acid.

Twenty-two proteins or protein mixtures were analyzed by VAN SLYKE and the present writers. It is remarkable that a 1% oxylysin content is only found in collagen and in the gelatin derived from it; in the other proteins the oxylysin content is either much lower or zero.

Neither elastin, blood albumin (horse), muscle protein (rat), milk protein (lactoglobulin, lactalbumin, casein), ovalbumin or sericin contain any appreciable quantities of oxylysin. Some vegetable proteins („aleuronate", „oat whole" protein, zein) appear to contain a small quantity, while others (gliadin, edestin, arachin, glycinin, papain) are practically devoid of oxylysin.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser beschreiben eine neue Methode zur Dosierung des Oxylysins in Proteinen. Diese Methode beruht

- a) auf Trennung des Oxylysins von Serin durch Ionophoresis und
- b) auf der kolorimetrischen Mikrobestimmung des Formols, das durch die Oxydation dieser Aminosäure mit Perjodsäure entsteht.

Zweiundzwanzig Proteine bzw. Proteinmischungen wurden von VAN SLYKE und von uns analysiert. Bemerkenswert ist, dass ein Gehalt von 1% Oxylysin nur in Kollagen und der daraus entstehenden Gelatine erreicht wird; bei den anderen Proteinen ist der Gehalt entweder viel geringer oder null.

Elastin, Blutproteine (Pferd), Muskelproteine (Ratte), Milchproteine (Lactoglobulin, Lactalbumin, Casein), Ovalbumin und Sericin enthalten keine nennenswerten Mengen. Einige Pflanzenproteine („Aleuronat", „Vollhaferprotein", Zein) scheinen geringe Mengen (0,2—0,5%) zu enthalten, während andere (Gliadin, Edestin, Arachin, Glycinin, Papain) praktisch frei von Oxylysin sind.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> D. D. VAN SLYKE et A. HILLER, *Proc. Nat. Scienc. Washington* **7** (1921) 185.
- <sup>2</sup> S. B. SCHRIVER et D. H. MUKHERJEE, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **98 B** (1925) 58.
- <sup>3</sup> D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON et D. A. MAC FADYEN, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **38** (1938) 548.
- <sup>4</sup> D. D. VAN SLYKE, A. HILLER, D. A. MAC FADYEN, A. B. HASTINGS et F. W. KLEMPERER, *Journ. biol. Chem.*, **133** (1940) 287.
- <sup>5</sup> F. W. KLEMPERER, A. B. HASTINGS et D. D. VAN SLYKE, *Journ. biol. Chem.*, **143** (1942) 433.
- <sup>6</sup> B. H. NICOLET et L. A. SHINN, *Journ. Am. Chem. Soc.*, **61** (1939) 1615.

- <sup>7</sup> A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Biochem. Journ.*, **35** (1941) 294.  
<sup>8</sup> R. L. M. SYNGE, *Biochem. Journ.*, **33** (1939) 1924.  
<sup>9</sup> D. D. VAN SLYKE, A. HILLER et D. A. MAC FADYEN, *Journ. biol. Chem.*, **141** (1941) 681.  
<sup>10</sup> L. A. SHINN et B. H. NICOLET, *Journ. biol. Chem.*, **139** (1941) 687.  
<sup>11</sup> P. DESNUELLE, S. ANTONIN et M. NAUDET, *Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.)*, **26** (1944) 1168.  
<sup>12</sup> R. KUHN et P. DESNUELLE, *Ber. deutsch. Chem. Gesell.*, **70** (1937) 1907.  
<sup>13</sup> P. D. WATSON, *Ind. Engng. Chem.*, **26** (1934) 640.  
<sup>14</sup> M. SØRENSEN et G. HAUGAARD, *Biochem. Ztschr.*, **169** (1934) 271.  
<sup>15</sup> P. DESNUELLE et S. ANTONIN, *Comptes-rendus Acad. Sc.* **221** (1945) 206.  
<sup>16</sup> A. C. CHIBNALL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **131 B** (1942) 136.  
<sup>17</sup> B. H. NICOLET et L. J. SAIDEL, *Journ. biol. Chem.*, **139** (1939) 477.  
<sup>18</sup> J. L. STOKES et M. GUNNESS, *Journ. biol. Chem.*, **157** (1945) 651.  
<sup>19</sup> M. J. BOYD et R. A. LOGAN, *Journ. biol. Chem.*, **146** (1942) 279.  
<sup>20</sup> A. J. P. MARTIN et R. L. M. SYNGE, *Biochem. Journ.*, **35** (1941) 294.  
<sup>21</sup> B. H. NICOLET et L. A. SHINN, *Journ. biol. Chem.*, **142** (1942) 139.  
<sup>22</sup> B. H. NICOLET et L. A. SHINN, *Journ. biol. Chem.*, **139** (1939) 687.

Reçu le 26 mars 1946.