

LA COMPOSITION DU LYSOZYME EN ACIDES AMINÉS

II. ACIDES AMINÉS TOTAUX

par

CLAUDE FROMAGEOT ET MICHEL PRIVAT DE GARILHE

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Dans une publication précédente¹, nous avons donné une première série de résultats concernant la teneur du lysozyme en les acides monoaminés monocarboxyliques aromatiques, monoaminés dicarboxyliques et diaminés monocarboxyliques. Après hydrolyse de la protéine par l'acide chlorhydrique, ces différents types d'acides aminés avaient été séparés les uns des autres par les chromatographies successives décrites par FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER². Il restait à étudier quantitativement la composition de la fraction correspondant au filtrat final de ces chromatographies, fraction contenant l'ensemble des acides monoaminés monocarboxyliques non-aromatiques; en outre, il convenait de déterminer sur un hydrolysats spécial la proportion de cystine et de rechercher la présence éventuelle de cystéine dans la molécule protéique; enfin, il était indispensable de fixer la teneur du lysozyme en soufre total et éventuellement en phosphore.

Les données du travail précédent avaient été obtenues à partir de carbonate de lysozyme, dont la teneur en azote total était de 16.7 %. Il paraît préférable de les rapporter au lysozyme isoélectrique, préparé en précipitant le lysozyme de sa solution acétique non plus par le bicarbonate de sodium, mais par la soude, à p_H voisin de 11. D'après les indications que Mr. FRAENKEL-CONRAT nous a aimablement communiquées, la teneur en azote total du lysozyme isoélectrique sec et sans cendres est de 18.6 %. Ce chiffre précise des données obtenues récemment par WHITE, SECOR ET CARTER LONG³, d'après lesquels la teneur en azote total du lysozyme isoélectrique serait de 18.3 à 18.5 %. Nous avons nous-mêmes effectué des dosages d'azote total sur du lysozyme isoélectrique, séché après avoir été soigneusement débarrassé de toute matière minérale; les résultats trouvés: 18.45; 18.55; 18.65; moyenne: 18.5 %, confirment complètement ceux des Auteurs californiens. Dans ce qui suit, les résultats sont calculés pour du lysozyme isoélectrique, sec et sans cendres, de teneur en azote total égale à 18.6 %.

D'autre part, dans le travail précédent, nous avons calculé la teneur en histidine en "corrigeant" de + 13 % la valeur par analyse de l'hydrolysats. Cette correction semblait devoir être faite par suite de la destruction que subit l'histidine lorsqu'on la traite dans les conditions de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique en présence de tryptophane. Etant donné l'importance de la détermination exacte de la teneur en histidine dont il n'existe qu'un résidu dans la molécule de lysozyme, nous avons repris l'étude du comportement de cet acide aminé au cours de son chauffage en milieu chlorhydrique en présence non plus seulement d'arginine et de tryptophane, mais aussi de cystine, de sérine et de thréonine, dans les proportions où ces acides aminés existent dans le lysozyme. Le mélange: Histidine, HCl, H₂O 1.22 mg, arginine 12 mg, lysine, HCl 5.3 mg,

Bibliographie p. 517.

tryptophane 7.5 mg, sérine 6.0 mg, thréonine 4.5 mg, cystine 8.0 mg est traité par 3 ml d'acide chlorhydrique 6 N en tube scellé à 115° pendant 24 heures. Après élimination de l'ammoniaque, chromatographie sur silice puis élution des bases adsorbées, on dose l'histidine dans l'éluat. On retrouve 98 à 100% de la quantité initiale. Dans les conditions réalisées, tout à fait comparables aux conditions dans lesquelles se trouve l'histidine au cours de l'hydrolyse, cet acide aminé ne subit aucune destruction. La teneur en histidine du carbonate de lysozyme, à 16.7% d'azote total, doit donc être ramenée au chiffre que nous avons trouvé, sans modification, de 0.95%, ce qui correspond à un poids moléculaire de 16300 pour le carbonate de lysozyme; il en résulte que les nombres des résidus de la plupart des autres acides aminés doivent être augmentés de une ou de deux unités. En particulier, les nombres des résidus d'arginine et de lysine passent de 11 à 13 et de 5 à 6 respectivement.

En admettant, d'après la teneur en arginine et en lysine, l'existence de 19 groupes basiques capables de fixer chacun un groupe CO_2H^- , on peut calculer que le poids moléculaire de 16300, trouvé précédemment pour le carbonate de lysozyme, doit être diminué de 1200 environ pour correspondre à celui du lysozyme isoélectrique; la teneur en azote total de ce lysozyme, calculée à partir de celle du carbonate, serait de 18.1%, chiffre qui se rapproche de façon satisfaisante des valeurs mesurées directement.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. ACIDES AMINÉS NEUTRES NON-AROMATIQUES, AUTRES QUE LA CYSTINE ET LA CYSTÉINE

La chromatographie de partage sur papier de gouttelettes prélevées sur le filtrat final après concentration sous vide montre que cette dernière fraction ne contient plus ni acide aminé neutre aromatique, ni acide aminé dicarboxylique, ni base hexonique. La séparation des acides aminés neutres non-aromatiques est donc bien spécifique. Pour différents hydrolysats, l'azote total de cette fraction, correspondant à 100 mg de lysozyme est, en mg:

5.73; 5.78; 5.85; 5.97; 6.55; Moyenne: 5.98.

Pour le dosage de la plupart des acides aminés de la fraction en question, nous avons employé soit seul, soit à côté d'une autre méthode spécifique, le procédé de FISHER, PARSONS ET MORRISON⁴. On sait que ce procédé est basé sur le fait que les surfaces des taches obtenues par chromatographie de partage sur papier, selon CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁵, d'un mélange d'acides aminés à concentrations convenables, sont proportionnelles aux logarithmes des concentrations des acides aminés auxquels ces taches correspondent. La démonstration de cette relation, a été fournie récemment par BRIMLEY⁶. Pour utiliser ce procédé, nous établissons une échelle de référence pour chacun des acides aminés étudiés, sur la même feuille de papier (Whatman no. 1), et dans des conditions identiques, en plaçant au sommet de la feuille de papier des volumes de l'ordre de 5 μ l, aussi égaux que possible de solutions contenant l'acide aminé en question, à des concentrations convenablement échelonnées. Sur la même feuille, nous disposons des mêmes volumes de diverses dilutions de la solution dont il s'agit de déterminer la concentration en l'acide aminé étudié. Par tâtonnements, on arrive à avoir après développement et révélation un nombre suffisant de taches utilisables pour permettre le calcul d'une moyenne ayant une signification précise. Le nombre des taches utilisées pour l'établissement de telles moyennes est indiqué ci-dessous entre parenthèses; l'approximation des résultats est donnée par la valeur de la déviation standard σ . Le développe-

ment est fait au moyen de phénol dans le cas du glyocolle, de l'alanine, de la sérine et de la thréonine, et de butanol dans le cas de la valine, de la leucine, de l'isoleucine, de l'hydroxyproline et de la proline. Chacun des solvants contient 0.1 % de cupron. La révélation est effectuée par la ninhydrine en solution à 0.2 % dans le butanol, sauf dans le cas de la proline, où selon ACHER, FROMAGEOT ET JUTISZ⁷ on utilise l'isatine à 0.2 % dans le butanol additionné de 4 % d'acide acétique pur. La mesure des surfaces des taches se fait en lumière jaune, directement sur le papier à chromatographie, à l'aide d'un planimètre. La fidélité et la précision de la méthode dépendent, d'une part, de facteurs inhérents à la méthode elle-même: précision du volume de la solution déposée sur le papier, homogénéité du développement et de la révélation; et, d'autre part, de la nature des acides aminés, dont certains donnent des taches mieux délimitées que d'autres.

Les résultats sont exprimés ici en mg d'acide aminé libre pour 100 mg de lysozyme. Les chiffres donnés pour chaque acide aminé par la méthode qui leur est spécifique sont la moyenne de plusieurs dosages exécutés sur des hydrolysats différents. Etant donnée l'identité des résultats trouvés à partir soit du lysozyme préparé par nous-mêmes, soit du lysozyme "Armour", il nous a paru inutile de continuer à les distinguer.

Glyocolle: Méthode de ALEXANDER, LANDWEHR ET SELIGMAN⁸ 5.8. Méthode de FISHER *et al.*: 5.3 (II) $\sigma = 0.13$. Moyenne générale: 5.6.

Alanine: Méthode de FISHER *et al.*: 6.1 (II) $\sigma = 0.70$.

Sérine: Méthode de DESNUELLE, ANTONIN ET NAUDET⁹ 7.2.

Les résultats obtenus dans les dosages de la sérine concordent bien entre eux, lorsque ces dosages sont effectués sur des échantillons d'une même hydrolysate; ils peuvent au contraire présenter des écarts atteignant 40 %, lorsque les dosages sont faits sur des échantillons d'hydrolysats différents. Ce phénomène doit évidemment être attribué à la labilité particulière de la sérine engagée dans la molécule de lysozyme; cette labilité entraîne une certaine destruction de l'acide aminé, variable d'une opération à l'autre, au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique. Qu'il s'agisse bien d'une labilité particulière de la sérine combinée, ressort de l'expérience suivante: un mélange de sérine, de thréonine et de tryptophane, en proportions voisines de celles où ces acides aminés existent dans 100 mg de lysozyme, a été traité par 3 ml d'acide chlorhydrique 5.5 N à l'ébullition pendant 18 heures. Les chiffres du Tableau I montrent que 8 % seulement de la sérine et 4 % de la thréonine ont été détruits. Ces chiffres sont tout à fait du même ordre de grandeur que ceux publiés par REES¹⁰.

TABLEAU I

DESTRUCTION DE LA SÉRINE ET DE LA THRÉONINE LIBRES EN PRÉSENCE DE TRYPTOPHANE PAR TRAITEMENT À L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Acides aminés dans le mélange initial (mg)		Acides aminés retrouvés (mg)
Sérine	6.8	6.25
Thréonine	5.2	5.0
Tryptophane	7.5	—

Sérine dosée par la méthode de DESNUELLE, ANTONIN ET NAUDET⁹; thréonine par la méthode de WINNICK¹¹.

Nous n'avons donc conservé des résultats fournis par les dosages de la sérine que les plus élevés, les considérant d'ailleurs seulement comme des valeurs minimum, même après la majoration que nous leur avons fait subir pour tenir compte des données du Tableau I.

Thréonine: Méthode de WINNICK¹¹ 5.2. Méthode de FISHER *et al.* 5.2 (7) $\sigma = 0.31$.

Les résultats fournis par ces dosages donnent lieu aux mêmes remarques que ceux

obtenus avec la sérine. La thréonine possède donc elle aussi dans le lysozyme une labilité particulière. Les résultats obtenus sont majorés ici de 4 % pour tenir compte des données du Tableau I; mais comme dans le cas de la sérine, nous ne les considérons que comme des valeurs minima.

Méthionine: Méthode de LAVINE¹² 0.0. Recherche par chromatographie sur papier 0.

Valine: Méthode de FISHER *et al.* 6.2 (19) $\sigma = 0.66$.

Leucine: Méthode microbiologique de SCHWEIGERT, MCINTYRE, ELVEHJEM ET STRONG¹³ à l'aide de *Lactobacillus arabinosus* 7.0. Méthode de FISHER *et al.* 7.0 (4) $\sigma = 0.45$.

Isoleucine: Méthode de FISHER *et al.* 6.2 (4) $\sigma = 0.12$.

Proline: La chromatographie sur papier, avec révélation par l'isatine⁷ ne montre aucune trace visible de proline.

Hydroxyproline: La chromatographie sur papier ne permet de déceler aucune trace visible correspondant à l'hydroxyproline, et ce, aussi bien par réaction avec la ninhydrine qu'avec l'isatine. Nous en concluons à l'absence d'hydroxyproline dans le lysozyme.

II. CYSTÉINE ET CYSTINE

Cystéine: Le dosage des groupes sulfhydryles totaux éventuellement présents dans la molécule de lysozyme, avant toute hydrolyse, a été effectué par la méthode de ANSON¹⁴, selon le procédé de DESNUELLE ET ROVERY¹⁵, à l'aide de ferricyanure en présence de dodécylsulfate. La précision de la méthode permet d'affirmer qu'il existe moins de 0.8 groupe sulfhydryle par molécule de lysozyme. Il n'y a donc pas de cystéine dans le lysozyme. Ce résultat est contraire aux observations de ABRAHAM¹⁶; il est contraire également aux conclusions de MEYER, THOMPSON, PALMER ET KHORAZO¹⁷, d'après lesquels la présence de groupes sulfhydryles serait nécessaire à l'activité enzymatique du lysozyme. Mais il est en plein accord avec les données récentes de FRAENKEL-CONRAT¹⁸.

Cystine: Pour le dosage de la cystine, nous avons hydrolysé le lysozyme selon la méthode de MILLER ET DU VIGNEAUD¹⁹: 100 mg de lysozyme sont traités à l'ébullition à reflux par un mélange de 5 ml d'acide chlorhydrique concentré pur, 3 ml d'acide formique pur à 96 % et 1 ml d'eau. La majeure partie de l'acide chlorhydrique et la totalité de l'acide formique sont éliminées par les évaporations habituelles. Le dosage de la cystine est effectué selon FOLIN ET MARENZI²⁰, d'après le procédé de LUGG²¹. Ce dosage a lieu soit directement sur l'hydrolysate, soit après séparation des divers groupes d'acides aminés, d'après FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER², sur la fraction des acides aminés neutres non-aromatiques. Dans ce dernier cas, la cystine a été préalablement réduite en cystéine par l'hydrogène sulfuré. La valeur trouvée pour la cystine exprimée en mg d'acide aminé libre pour 100 mg de lysozyme est de 8.0. Valeur trouvée antérieurement 7.9¹⁶. D'autre part, nous avons préparé un mélange contenant: cystine 7.2 mg, tryptophane 7.2 mg, thréonine 4.9 mg, sérine 5.8 mg, c'est-à-dire renfermant ces acides aminés en proportion voisine de celle où ils se trouvent dans le lysozyme, et nous avons vérifié que le traitement d'un tel mélange par l'acide chlorhydrique en présence d'acide formique à chaud, dans les conditions qui viennent d'être indiquées, ne provoque aucune destruction sensible de la cystine libre. Par contre, le traitement du même mélange par l'acide chlorhydrique seul en tube scellé, sous vide, à chaud, dans les conditions habi-

tuelles de l'hydrolyse¹, aboutit à une destruction de 12 % de la cystine. La quantité de cystine trouvée dans le lysozyme soumis à un tel traitement est de 6.7 %, chiffre qui corrigé de 12 % pour tenir compte de la destruction subie par la cystine libre, correspondrait à une teneur du lysozyme en cystine de 7.5 %. Cette dernière valeur est sensiblement inférieure à celle de 8.0 trouvée plus haut. Il apparaît ainsi que la cystine engagée dans la molécule de lysozyme est plus labile que la cystine libre.

III. SOUFRE TOTAL ET PHOSPHORE TOTAL

Le dosage du *soufre total* du lysozyme a été fait par nous-mêmes à l'aide de la micro-bombe de PARR, et par MM. WEILER ET STRAUSS, *Microanalytical Laboratory, Oxford*. Le soufre total correspondant à 100 mg de lysozyme est, en mg, de 2.53 (moyenne de 5 dosages). Cette valeur diffère notablement de celles publiées antérieurement: 0.72¹⁷; 2.16²²; 3.6¹⁶.

D'après les résultats obtenus par MM. WEILER ET STRAUSS, la teneur du lysozyme en *phosphore* est nulle. Valeur trouvée antérieurement: 0.28 %¹⁷.

DISCUSSION

Nous avons calculé, pour une teneur en azote total de 18.6 %, la teneur du lysozyme isoélectrique non seulement en les acides aminés neutres non-aromatiques, mais aussi en les autres acides aminés dosés précédemment¹. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le Tableau II.

Les chiffres du Tableau II donnent lieu aux remarques suivantes:

1. Le poids moléculaire du lysozyme isoélectrique, tel qu'il résulte de l'ensemble des données analytiques est de 14700 ± 250 , en accord satisfaisant avec celui que l'on peut calculer, comme il a été dit plus haut, à partir du poids moléculaire du carbonate de lysozyme.

2. En ce qui concerne le soufre et la cystine, les 5 résidus de cystine trouvés dans la protéine correspondent à 10 atomes de soufre; or il y a, dans le lysozyme, 12 atomes de soufre, pas de cystéine ni apparemment de méthionine. Il faut donc admettre, ou bien que la protéine contient 6 résidus de cystine et non pas 5, ou bien qu'elle renferme une autre substance contenant du soufre. La première de ces hypothèses pourrait s'appuyer sur la constatation faite plus haut que la cystine en combinaison dans le lysozyme est plus labile que la cystine libre; on pourrait alors supposer que même lorsque l'hydrolyse de la protéine est effectuée en présence d'acide formique, la cystine subit une certaine destruction au moment où elle se trouve en cours de libération, à l'état "naissant" en quelque sorte. Dans la seconde de ces hypothèses, éliminant toute possibilité de la présence de sulfate ou de cystéine, on pourrait penser que le lysozyme contient de la méthionine et que celle-ci échappé à nos analyses; en fait, d'après des renseignements aimablement communiqués par MM. H. FRAENKEL-CONRAT ET J. C. LEWIS, le lysozyme contiendrait une quantité de méthionine qui fournirait à peu près les 2 atomes de soufre manquant. Quoiqu'il en soit, chacun des atomes de soufre présent dans la protéine correspond à un atome d'azote.

3. En ce qui concerne l'acide glutamique, les résultats analytiques fournissent un nombre de résidus de 3.3 pour un poids moléculaire de la protéine de 14700. Nous avons arrondi ce nombre à 4 étant donné d'une part que la méthode analytique utilisée est

TABLEAU II

COMPOSITION DU LYOZYME EN SOUFRE, PHOSPHORE ET ACIDES AMINÉS

A = élément ou acide aminé

N = azote de l'acide aminé pour 100 d'azote du lysozyme. (Pour le soufre, poids pour 100 d'azote du lysozyme)

T = quantité d'élément ou d'acide aminé trouvée, exprimée en poids pour 100 de lysozyme isoélectrique, sec et sans cendres

C = quantité d'élément ou d'acide aminé calculée en admettant que 14 700 g de lysozyme renferment exactement le nombre d'atomes ou de résidus indiqué sous R

Dif = $\frac{[T - C] 100}{C}$

R = nombre d'atomes ou de résidus calculés à partir des données analytiques, pour 14 700 g de lysozyme

PM = poids moléculaire calculé à partir des données expérimentales

A	N	T	C	Dif	R	PM
Soufre	13.6	2.53	2.62	—6	12	15 200
Phosphore	0.0	0.0	—	—	0	—
Glycocolle	5.6	5.6	5.61	0	11	14 700
Alanine	5.2	6.1	6.05	0	10	14 600
Sérine	5.1	7.2	7.15	0	10	14 600
Cystéine	0.0	0.0	—	—	0	—
Cystine	5.0	8.0	8.15	—2	5	—
Thréonine	3.3	5.3	5.67	—7	7	—
Méthionine	0.0	0.0	—	—	0	—
Valine	4.0	6.2	6.36	—1	8	14 800
Leucine	4.0	7.0	7.13	—2	8	14 900
Isoleucine	3.6	6.2	6.25	0	7	14 700
Proline	0.0	0.0	—	—	0	—
Hydroxyproline	0.0	0.0	—	—	0	—
Phénylalanine	1.1	2.3	2.25	—	2	—
Tyrosine	1.6	3.8	3.70	3	3	14 500
Tryptophane	6.2	8.3	8.32	0	6	14 700
Ac. aspartique	6.7	11.8	11.8	0	13	14 700
Ac. glutamique	1.7	3.3	4.00	—17	4	—
Lysine	6.2	6.0	5.95	0	6	14 600
Histidine	1.53	1.05	1.05	0	1	14 700
Arginine	25.6	14.8	15.4	—4	13	15 300
N amidé } N divers }	10.0	1.86	—	—	—	—
Azote total	96.4	Poids moléculaire moyen: 14 700 ± 250				

peu précise et pensant d'autre part qu'il existe plus de chances d'obtenir ici un résultat par défaut, par suite de destruction au cours de l'hydrolyse, qu'un résultat par excès.

4. Les résultats trouvés pour la tyrosine ne sont pas les mêmes après hydrolyse acide ou hydrolyse alcaline¹; dans ce dernier cas, ils sont sensiblement supérieurs. Nous avons attribué cette différence à une destruction partielle de la tyrosine au cours de l'hydrolyse acide en présence de tryptophane. Mais la proportion de tyrosine déterminée après hydrolyse alcaline devient ici trop forte; celle que l'on trouve après hydrolyse acide s'accorde au contraire très bien avec la teneur en histidine dans un rapport de 3 à 1. Aussi avons nous repris dans le Tableau II pour la tyrosine les chiffres fournis par l'hydrolyse acide. Peut-être les chiffres plus élevés, obtenus après hydrolyse alcaline s'expliquent-ils par une légère oxydation de la tyrosine qui donnerait un produit (polyphénol) à pouvoir chromogène plus grand.

5. Le bilan de l'azote des différentes fractions isolées par chromatographie, et des différents groupes d'acides aminés s'établit comme il est indiqué dans le Tableau III.

TABLEAU III

RÉPARTITION DE L'AZOTE ENTRE LES DIFFÉRENTES FRACTIONS ET LES DIFFÉRENTS GROUPES D'ACIDES AMINÉS

Azote exprimé en pour 100 de l'azote total

Fraction séparée par chromatographie	Azote total de la fraction I	Azote des acides aminés contenus dans la fraction	
		Trouvé II	Calculé III
Basique	33.3	33.3	34.3
Neutre aromatique	5.1	8.9	8.7
Acide	15.6	8.4	8.7
Neutre non-aromatique	32.2	35.8	37.4
Azote amidé et divers	10.0	10.0	10.0
Azote total	96.2	96.4	99.2

L'accord entre les chiffres correspondant à l'azote "basique" est obligatoire, puisque l'azote de la lysine a été calculé précisément à partir de l'azote total de la fraction basique. En ce qui concerne l'azote "neutre aromatique", la différence entre le chiffre de la colonne I, d'une part, et les chiffres des colonnes II ou III, d'autre part, est due à la destruction du tryptophane; la somme azote (tyrosine) + azote (phénylalanine) correspondant à 2.7% de l'azote total de la protéine, 2.4% correspondent ainsi soit au tryptophane lui-même, soit à ses produits de décomposition ayant conservé un caractère aromatique; près des deux tiers du tryptophane a été détruit en perdant son caractère aromatique. La fraction "acide" contient beaucoup plus d'azote que la somme acide aspartique + acide glutamique. Il est vraisemblable qu'à l'azote de cette somme doit être ajouté celui de produits acides azotés non-aromatiques provenant de la décomposition du tryptophane, soit environ 4.0% de l'azote total de la protéine. L'excès de 3.4% d'azote total qui subsiste dans la fraction "acide" après cette addition peut s'expliquer par la rétention d'une partie de la cystine, incomplètement réduite au cours des manipulations sur la colonne d'alumine⁴. Peut-être aussi existe-t-il dans le lysozyme un peu plus des acides monoaminés dicarboxyliques que n'en ont révélé nos dosages spécifiques. Quoiqu'il en soit, une telle différence entre l'azote total de la fraction "acide" et l'azote de la somme des acides aminés dicarboxyliques ne se manifeste pas dans le cas d'une série d'autres protéines²³. La fraction "neutre non-aromatique" contient moins d'azote que l'ensemble des acides aminés correspondants; cela s'explique par le fait que la cystine a été dosée à part, sur un hydrolysats spécial, et ajoutée par le calcul aux autres acides aminés de cette catégorie. Il est impossible de dire comment s'est comporté l'azote de la cystine au cours du fractionnement des hydrolysats obtenus dans les conditions ordinaires.

6. On peut calculer approximativement la proportion d'azote amidé en admettant que sur les 1.86 mg d'azote dosés sous forme d'ammoniac, 0.3 mg proviennent de la décomposition du tryptophane, de la sérine et de la thréonine; il y aurait ainsi 16 groupes amidés dans la molécule de lysozyme, c'est à dire un de moins que de résidus d'acides dicarboxyliques*.

CONCLUSIONS

Admettant un poids moléculaire de 14700 et une teneur en azote total de 18.6% pour le lysozyme, on trouve que le nombre total des atomes d'azote qu'il renferme est 195. Les analyses du présent travail ont permis de déterminer la nature de 191 d'entre eux. La légère différence qui subsiste peut n'être qu'apparente et due au fait que le

* D'après FRAENKEL-CONRAT²⁴, l'azote amidé représente 9.4% de l'azote total du lysozyme isoélectrique, ce qui correspond à 17 ou 18 groupes amidés dans la molécule.

poids moléculaire trouvé pour la protéine est un peu trop élevé: un poids moléculaire de 14400 correspondrait précisément à 191 atomes d'azote dans la molécule; mais cette différence peut être due aussi à ce que quelques résidus d'acides aminés aient échappé aux analyses. De nouvelles investigations pourront seules dire s'il en est ainsi, et, si oui, à quels acides aminés devront être attribués les quelques atomes d'azote en excès.

Nous sommes heureux d'exprimer ici nos remerciements à MM. H. FRAENKEL-CONRAT ET J. C. LEWIS, qui nous ont très aimablement communiqué les résultats de leurs recherches sur le même sujet, et dont les critiques et les suggestions nous ont été particulièrement utiles, à M. P. DESNUELLE auquel nous devons une partie des analyses concernant la sérine, la thréonine et les groupes sulfhydryles, et à Mlle T. SÉJOURNÉ qui a exécuté les dosages microbiologiques de la leucine.

RÉSUMÉ

Calculés pour une teneur en azote de la protéine isoélectrique, sèche et sans cendres, de 18,6%, les résultats des analyses des acides aminés du lysozyme sont les suivants: Glycocolle 5,6, alanine 6,1, sérine 7,2, cystéine 0, cystine 8,0, thréonine 5,3, méthionine 0, valine 6,2, leucine 7,0, isoleucine 6,2, proline 0, hydroxyproline 0, phénylalanine 2,3, tyrosine 3,7, tryptophane 8,3, acide aspartique 11,8, acide glutamique 3,3, histidine 1,05, lysine 6,0, azote amidé et divers 1,86, soufre 2,53, phosphore 0%. Ces chiffres permettent de déterminer le poids moléculaire du lysozyme isoélectrique: 14700 ± 250 . Le calcul du nombre de résidus de chaque acide aminé montre que la nature de 98% au moins des atomes d'azote contenus dans la protéine a pu être établie; il permet de donner une première formule brute du lysozyme:

Gly₁₁ Ala₁₀ Sér₁₀ [(Cy.S)₂]₅ ou 6 Met₀ ou 2 Thr₇ Val₈ Leu₈ Ileu₇ Phé₂ Tyr₃ Try₆ Asp₁₃ Glu₄ (.NH₂)₁₆
Lys₆ His₁ Arg₁₃.

SUMMARY

The results of amino-acid analyses of lysozyme calculated for a total nitrogen content of 18,6% in the dry, ashless, iso-electric protein are as follows: glycine 5,6, alanine 6,1, serine 7,2, cysteine 0, cystine 8,0, threonine 5,3, methionine 0, valine 6,2, leucine 7,0, isoleucine 6,2, proline 0, hydroxyproline 0, phenylalanine 2,3, tyrosine 3,7, tryptophan 8,3, aspartic acid 11,8, glutamic acid 3,3, histidine 1,05, lysine 6,0, amido and other nitrogen 1,86, sulphur 2,53, and phosphorus 0%. These figures allow the determination of the molecular weight of iso-electric lysozyme as being 14700 ± 250 . The calculation of the number of residues of each amino-acid shows that the nature of at least 98% of the nitrogen atoms in the protein can be established. It enables a first molecular formula of lysozyme to be given:

Gly₁₁ Ala₁₀ Ser₁₀ [(Cy.S)₂]₅ or 6 Met₀ or 2 Thr₇ Val₈ Leu₈ Iley₇ Phe₂ Tyr₃ Try₆ Asp₁₃ Glu₄ (.NH₂)₁₆
Lys₆ His₁ Arg₁₃.

ZUSAMMENFASSUNG

Berechnet für einen Gesamtstickstoffgehalt von 18,6% für das isoelektrische, trockene und aschefreie Protein, sind die Ergebnisse der Analysen der Aminosäuren des Lysozyms folgende: Glykokoll 5,6, Alanin 6,1, Serin 7,2, Cystein 0, Cystin 8,0, Threonin 5,3, Methionin 0, Valin 6,2, Leucin 7,0, Isoleucin 6,2, Prolin 0, Hydroxyprolin 0, Phenylalanin 2,3, Tyrosin 3,7, Tryptophan 8,3, Asparaginsäure 11,8, Glutaminsäure 3,3, Histidin 1,05, Lysin 6,0, Amidostickstoff und verschiedener N 1,86, Schwefel 1,86 und Phosphor 0%. Diese Zahlen gestatten die Bestimmung des Molekulargewichts des isoelektrischen Lysozyms zu 14600 ± 250 . Die Berechnung der Anzahl der Einheiten von jeder Aminosäure zeigt an, dass die Natur von mindestens 98% der im Protein enthaltenen Stickstoffatome festgestellt werden konnte; sie erlaubt die Aufstellung einer ersten Bruttoformel des Lysozyms:

Gly₁₁ Ala₁₀ Ser₁₀ [(Cy.S)₂]₅ oder 6 Met₀ oder 2 Thr₇ Val₈ Leu₈ Ileu₇ Phé₂ Tyr₃ Try₆ Asp₁₃ Glu₄ (.NH₂)₁₆ Lys₆ His₁ Arg₁₃.

Bibliographie p. 517.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 82.
- ² C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ³ L. M. WHITE, G. E. SECOR ET M. D. CARTER LONG, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 31 (1948) 657.
- ⁴ R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ⁵ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ⁶ R. C. BRIMLEY, *Nature*, 163 (1949) 215.
- ⁷ R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- ⁸ B. ALEXANDER, G. LANDWEHR ET A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 51.
- ⁹ P. DESNUELLE, S. ANTONIN ET M. NAUDET, *Bull. soc. chim. biol.*, 26 (1944) 1168.
- ¹⁰ M. W. RIES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
- ¹¹ T. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 461.
- ¹² T. F. LAVINE, *J. Biol. Chem.*, 151 (1943) 281.
- ¹³ B. S. SCHWEIGERT, J. M. MCINTYRE, C. A. ELVEHJEM ET F. M. STRONG, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 183.
- ¹⁴ H. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 399.
- ¹⁵ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 500.
- ¹⁶ E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 33 (1939) 622.
- ¹⁷ K. MEYER, R. THOMPSON, J. W. PALMER ET D. KHORAZO, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 303.
- ¹⁸ H. FRAENKEL-CONRAT, *Proc. Federation Biol. Chem.*, Detroit 1949.
- ¹⁹ G. L. MILLER, ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 101.
- ²⁰ O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 103.
- ²¹ J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2144.
- ²² E. A. H. ROBERTS ET A. Q. WELLS, *Quart. J. Exptl Physiol.*, 27 (1937) 89.
- ²³ C. FROMAGEOT ET R. COLAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 417.
- ²⁴ H. FRAENKEL-CONRAT, *communication personnelle*.

Reçu le 3 juin 1949

Correction après épreuves:

Après de nouvelles investigations suggérées par une discussion avec Dr FRANKEL-CONRAT, nous avons trouvé que le lysozyme contient 2.3% de méthionine et 1.3% de proline, soit 2 résidus de chacun de ces acides aminés par molécule de lysozyme. Le détail de ces investigations sera donné ultérieurement.