

QUELQUES PEPTIDES RÉSULTANT
DE L'HYDROLYSE PARTIELLE DU LYSOZYME

par

ROGER MONIER ET CLAUDE FROMAGEOT

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

La composition du lysozyme en acides aminés totaux étant à peu près connue¹, nous avons entrepris l'étude de la structure de cette protéine en cherchant à isoler divers peptides obtenus après hydrolyse partielle. Il nous a paru plus commode, au début, de soumettre la protéine à une hydrolyse assez énergique, encore qu'incomplète, plutôt qu'à une hydrolyse lente et ménagée. On évite ainsi la formation d'un trop grand nombre de peptides; seuls, en effet, subsistent alors les peptides les plus résistants à l'hydrolyse. Ce sont ceux-là dont nous commençons ici l'étude.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

100 mg de carbonate de lysozyme pur, cristallisé, à 16.7% d'azote total², sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6 N, en tube scellé, sous vide, 15 heures à 80°. L'acide chlorhydrique utilisé a été soigneusement privé de toute trace de métal, en particulier de fer, par 5 distillations successives dans un appareil convenable³. La solution provenant de l'hydrolyse a été évaporée 4 fois, chaque fois après addition d'eau distillée, dans un exsiccateur sur chlorure de calcium et chaux sodée, à la température ordinaire. Le résidu est repris par 2 ml d'eau. Le degré d'hydrolyse atteint dans ces conditions est indiqué par les quantités des groupements aminés et carboxyliques libérés, quantités exprimées en pour cent de celles qui correspondraient à une hydrolyse totale:

| | |
|---|-----|
| -NH ₂ (dosage d'après VAN SLYKE) | 74. |
| -COOH (dosage d'après VAN SLYKE, DILLON ET MACFAYDEN) | 55. |

La solution obtenue est soumise à la chromatographie sur papier (Whatman n° 1) avec du *n*-butanol à 15% d'eau. La ninhydrine révèle une série de taches correspondant aux divers acides aminés et à quelques peptides, et, bien en avant de la tache correspondant aux acides aminés les plus rapides, les leucines, une tache isolée de $R_F = 0.60^*$. Quoique bien délimitée, cette tache correspond à la présence de toute une série de peptides; elle constitue la fraction P. Selon un procédé maintenant classique⁴, on sépare cette fraction P par découpage du papier sur lequel a eu lieu chromatographie analogue, puis par élution à l'aide d'eau distillée. Après concentration sous vide, on soumet la fraction P à une seconde chromatographie sur papier, en utilisant comme solvant l'alcool benzylique saturé d'eau. On obtient ainsi 3 fractions: P.I, fourni avec la ninhydrine

* Tous les R_F dont il s'agit ici correspondent à des chromatographies sur papier faites à 18°.

une tache bien définie, restant au point de départ ($R_F = 0.00$), P.II, fournissant également une tache nette, de $R_F = 0.20$, et P.III se manifestant par une traînée que l'on peut caractériser par un R_F moyen de 0.40.

La fraction P.I est soumise à une chromatographie sur papier à l'aide d'alcool benzylique additionné de 4% d'acide formique, le tout saturé d'eau. On obtient ainsi d'une part une série de fractions correspondant à des taches confuses voisines les unes des autres, et toutes proches de la ligne de départ, et d'autre part une fraction P.I.2, correspondant à une tache bien définie, de $R_F = 0.10$.

La fraction P.II est chromatographiée à l'aide du mélange suivant (en volumes) : Chloroforme 43.3, isopropanol 45.0, pyridine 5.0, eau 6.7; on sépare ainsi d'une fraction hétérogène, correspondant à une traînée proche de la ligne de départ, deux fractions fournissant des taches nettes: P.II.1 de $R_F = 0.10$, et P.II.2, de $R_F = 0.20$.

La fraction P.III, chromatographiée dans les mêmes conditions que la fraction P.II, se scinde, à côté d'une fraction mal définie correspondant à une traînée confuse, en deux fractions fournissant avec la ninhydrine des taches nettes: P.III.1, de $R_F = 0.24$, et P.III.2, en tache allongée dont le centre a pour R_F 0.40.

Ainsi, de la fraction initiale P il est possible d'isoler à côté de diverses fractions correspondant encore certainement à des mélanges, 5 fractions bien nettes. L'emploi des solvants suivants, saturés d'eau sauf indication contraire: phénol + 0.1% NH_3 ; phénol + 0.1% de cupron; mélange (en volumes) de 75 de *n*-butanol + 15 d'acide formique + 10 d'eau; acide isobutyrique; mélanges constitués par de l'alcool isoamylque additionné soit de 5% soit de 10% de l'un des acides formique, acétique, propionique ou isobutyrique; alcool isoamylque + 5% de pyridine; mélanges à volumes égaux soit de chloroforme et d'isopropanol, soit de cyclohexane et d'isopropanol, soit d'acétate d'éthyle et d'isopropanol, n'a permis aucune autre séparation de ces dernières fractions; elles correspondent donc vraisemblablement chacune à un peptide homogène.

Trois de ces cinq peptides considérés, au moins provisoirement, comme homogènes ont été soumis à des analyses qualitatives concernant les acides aminés qu'ils renferment. Ces analyses ont été faites d'une part après hydrolyse acide totale; dans ce cas, les acides aminés ont été caractérisés par chromatographie sur papier, à l'aide soit de phénol contenant 0.1% de NH_3 , soit de *n*-butanol saturé d'eau, soit de *n*-butanol contenant 15% d'acide formique, le mélange étant additionné de 10% d'eau; ce dernier mélange étant particulièrement commode pour la détection des bases hexoniques. D'autre part, pour certains acides aminés, ces analyses ont porté directement sur les peptides eux-mêmes, sur le papier, avant toute hydrolyse: la cystine et la méthionine ont été recherchées par la réaction à l'iodo-platinat de potassium⁵, la proline par la réaction à l'isatine⁶, et ce, aussi bien sur les peptides que sur leurs produits d'hydrolyse; la tyrosine (détruite par hydrolyse acide des peptides toujours souillés de substances provenant de la dégradation de la cellulose du papier⁴) et l'histidine ont été recherchées par la réaction de PAULI sur les peptides eux-mêmes; quant au tryptophane, il n'est pratiquement pas détruit par l'hydrolyse acide telle que celle à laquelle le lysozyme a été soumis ici; en conséquence, on en retrouve la plus grande partie sur le papier, après la chromatographie des produits d'hydrolyse de la protéine, soit à l'état libre, état sous lequel il est facilement repéré par la ninhydrine, soit sous forme de peptides. Sous cette forme, le tryptophane est décelable par la réaction au paradiméthylaminobenzaldéhyde, selon la méthode de SYNGE ET TISELIUS⁷. C'est cette même réaction que nous avons utilisé pour la recherche du tryptophane dans les peptides du groupe P.

Dans le tableau ci-après, nous donnons les résultats de ces analyses, en y joignant, à titre de comparaison, la liste des acides aminés dont la présence a été caractérisée par les mêmes méthodes dans la fraction globale P.

TABLEAU I
ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES ISOLÉS DU LYSOZYME

○ = absence certaine.

? = présence douteuse.

Le nombre de signes + correspond à l'intensité relative de la tache obtenue par la ninhydrine. Les acides aminés dont l'absence a été constatée de façon certaine dans chacune des fractions n'ont pas été introduits dans le tableau.

| Acides aminés | Fractions | | | |
|------------------|-----------|--------|---------|---------|
| | P | P.I.2 | P.III.1 | P.III.2 |
| Glycocolle | + | + | traces | traces |
| Alanine | ++ | + | + | + |
| Sérine | + | ? | ? | ? |
| Thrénanine | + | ○ | ○ | ○ |
| Valine | ++ | traces | + | + |
| Leucines | +++ | + | ++ | ++ |
| Acide aspartique | + | traces | ? | ? |
| Acide glutamique | ++ | ++ | + | + |

Ces résultats permettent plusieurs observations:

1. Aucun des acides aminés suivants ne constitue un peptide appartenant au groupe P: Cystine, méthionine, proline, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, lysine, arginine.

2. La thrénanine, qui existe comme constituant de l'un des peptides faisant partie du groupe P, ne se rencontre dans aucun des peptides P.I.2, P.III.1 ou P.III.2.

3. L'analogie des compositions des deux peptides P.III.1 et P.III.2 est frappante, et les intensités relatives des taches correspondant aux acides aminés individuels qui les constituent sont à peu près les mêmes; le peptide P.I.2 se différencie des précédents par relativement plus d'acide glutamique et moins des leucines et de valine.

4. Les trois peptides ne renferment que peu, ou même peut-être ne renferment pas d'acide aspartique; ils contiennent au contraire une quantité relativement forte d'acide glutamique. Or, dans une molécule de lysozyme, il existe 18 résidus d'acide aspartique⁸ et 4 d'acide glutamique. Ce dernier appartient donc à des parties du lysozyme particulièrement résistantes à l'hydrolyse.

5. Les peptides considérés ici sont tous relativement riches en les leucines. Ce fait corrobore l'observation déjà faite par SYNGE⁹ que certains peptides riches en valine et en leucines sont particulièrement résistants à l'hydrolyse.

RÉSUMÉ

Une hydrolyse incomplète du lysozyme par l'acide chlorhydrique (15 heures à 80°) fournit toute une série de peptides. Par chromatographie sur papier, en utilisant divers solvants, il a été possible d'isoler cinq fractions considérées, au moins provisoirement, comme correspondant à autant de peptides homogènes. Trois ont été soumis à une analyse qualitative en ce qui concerne les acides aminés qu'ils renferment. Tous les trois sont relativement riches en les leucines et en acide glutamique; aucun ne contient ni acide aminé aromatique, ni base hexonique.

SUMMARY

The incomplete hydrolysis of lysozyme by hydrochloric acid (15 hours at 80° C) yields quite a number of peptides. It has been possible by paper chromatography and on using different solvents, to isolate five fractions which are considered, at least provisionally, as corresponding to five homogeneous peptides. The amino acids contained in three of these peptides have been analysed qualitatively. All three peptides are rich in the leucines and in glutamic acid; none of them contains either aromatic amino acids or hexonic bases.

ZUSAMMENFASSUNG

Die unvollständige Hydrolyse von Lysozym durch Salzsäure (15 Stunden bei 80°) liefert eine Reihe von Peptiden. Durch Verteilungs-Chromatographie auf Papier und durch Verwendung verschiedener Lösungsmittel gelang es, fünf Fraktionen zu isolieren, welche, wenigstens vorläufig, als fünf homogenen Peptiden entsprechend angesehen werden. Die Aminosäuren dreier dieser Peptide wurden qualitativ untersucht. Alle drei Peptide sind verhältnismässig reich an den Leucinen und an Glutaminsäure; keines enthält eine aromatische Aminosäure oder eine Hexonbase.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ CL. FROMAGEOT, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 17 (1949) 000.
- ² CL. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta* 4 (1950) 509.
- ³ R. MONIER ET M. JUTISZ, *Bull. Soc. Chim. biol.* (sous presse).
- ⁴ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ⁵ H. M. WINEGARD, G. TOENNIES ET R. J. BLOCK, *Science*, 108 (1948) 506.
- ⁶ R. ACHER, CL. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- ⁷ R. L. M. SYNGE ET A. TISELIUS, *Acta Chem. Scand.*, 3 (1949) 231.
- ⁸ D'après une communication personnelle de M. PRIVAT DE GARILHE, corrigeant le chiffre obtenu précédemment (13 résidus d'acide aspartique par molécule de lysozyme).
- ⁹ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 39 (1946) 351.

Reçu le 13 décembre 1949