

SUR LA STRUCTURE DU LYSOZYME

ÉTUDE DE LA LIBÉRATION DES GROUPES FONCTIONNELS ET DES ACIDES AMINÉS AU COURS D'UNE HYDROLYSE ACIDE MÉNAGÉE

par

ROGER ACHER, MARIAN JUTISZ ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Connaissant à peu près la composition en acides aminés du lysozyme¹, nous avons entrepris l'étude de sa structure, étude basée sur l'isolement et l'identification de peptides résultant d'une hydrolyse ménagée de la protéine. Mais au lieu de mettre en œuvre une hydrolyse énergique, comme dans un travail précédent², et de recueillir les peptides subsistants, qui représentent alors les fragments les plus résistants de la molécule protéique, nous avons ici soumis cette dernière à une hydrolyse relativement douce, consistant à traiter le lysozyme par HCl 10 N à 37°, pendant des temps allant de 24 à 192 heures. Diverses investigations faites sur d'autres protéines ont montré que, dans ces conditions, on obtient, à côté d'acides aminés libres, un grand nombre de di- et de tripeptides dans lesquels l'ordre originel des acides aminés se trouve respecté; si, en effet, l'hydrolyse par voie enzymatique ou par des acides minéraux dilués et à chaud peut donner lieu à certains réarrangements, ceux-ci n'ont jamais été observés jusqu'à présent dans le cas des acides concentrés et à froid³.

Avant d'effectuer l'étude des peptides obtenus à partir du lysozyme, il nous a paru utile de suivre la progression de l'hydrolyse en fonction du temps par des dosages d'une part des groupes fonctionnels apparus et d'autre part des acides aminés libérés. Nous avons pu ainsi tirer quelques conclusions sur les différents degrés de labilité des liaisons peptidiques dans le lysozyme et sur les facteurs susceptibles d'influencer cette labilité.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

Le *lysozyme* utilisé est un échantillon provenant de Armour Laboratories, Chicago, recristallisé encore deux fois. Les résultats sont calculés pour du lysozyme isoélectrique, sec et sans cendres, de teneur en azote total = 18,6 %¹.

L'*hydrolyse partielle* est effectuée selon GORDON, MARTIN ET SYNGE³. Des quantités de 50 à 100 mg de lysozyme, dissoutes dans 2 ml de HCl 10 N privé de fer par des distillations convenables, sont placées dans des tubes scellés, sous vide, les tubes étant maintenus au thermostat à 37°. Les produits de l'hydrolyse sont étudiés après des périodes de 24, 48, 72, 96 et 192 heures. A la fin de chaque période, l'hydrolysat est transvasé dans une capsule, dilué 10 fois, évaporé 3 fois sous vide en présence de chaux sodée et de

Bibliographie p. 498.

chlorure de calcium anhydre, chaque fois après addition du volume initial d'eau distillée. On ajuste enfin dans un ballon jaugé de façon à obtenir une concentration de 5 mg de lysozyme par ml.

L'*hydrolyse totale* de la protéine est effectuée par HCl 6 N en tube scellé, sous vide, 24 heures à 110°.

Les dosages sont faits par les méthodes suivantes :

Ammoniac: microméthode de PARNAS après déplacement par la lithine et entraînement pendant 15 minutes par la vapeur d'eau sous vide de 15 à 20 mm Hg.

Groupes carboxyliques des acides aminés libres totaux: méthode de WEST, CHRISTENSEN ET RINEHART⁴; prises correspondant à 5 mg de protéine initiale dans le cas d'hydrolysats partiels, et à 2 mg dans le cas de l'hydrolyse totale.

Groupes aminés libres totaux: méthode manométrique de VAN SLYKE-NEILL, temps de réaction 4 minutes; prises correspondant dans tout les cas à 5 mg de protéine initiale.

Groupes aminés libres des acides aminés hydroxylés: méthode de VAN SLYKE, HILLER ET MCFADYEN⁵, adaptée par MARTIN ET SYNGE⁶ aux hydrolysats partiels. Dans les conditions réalisées, l'ammoniac dosé étant seulement les 89 % de la valeur théorique, nous avons appliqué la correction nécessaire. Prises correspondant dans tous les cas à 5 mg de protéine initiale.

Acides aminés individuels: toutes les déterminations des acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse partielle ont été faites par chromatographie quantitative sur papier, généralement après révélation à la ninhydrine, selon FISCHER, PARSONS ET MORRISON⁷; la proline a été révélée à l'isatine⁸, la cystine et la méthionine au réactif iodo-platinique⁹. Les solvants utilisés sont les suivants: phénol saturé d'eau pour les dosages du glycocolle, de la sérine, de lalanine, de la thréonine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, et un mélange constitué par butanol 75 %, acide formique 15 % et eau 10 %, pour les dosages de l'arginine, de lhistidine, de la lysine, de la valine, de la tyrosine, de la phénylalanine et des leucines.

RÉSULTATS

L'ensemble des résultats obtenus est donné dans les tableaux ci-dessous.

TABLEAU I
AMMONIAC

A = N de NH₃ exprimé en % de N total.
B = N de NH₃ exprimé en % de sa valeur dans l'hydrolysat total.

Temps en heures	A	B
24	7.2	62
48	8.8	76
72	9.7	84
96	10.3	89
192	10.3	89
Hydrolyse totale:	11.6	100

TABLEAU II
GROUPES CARBOXYLIQUES DES ACIDES AMINÉS LIBRES TOTAUX

A = N correspondant à CO₂ et exprimé en % de N total.
B = N correspondant à CO₂ et exprimé en % de sa valeur dans l'hydrolysat total.

Temps en heures	A	B
24	7.8	11
48	12.4	17
72	15.9	22
96	17.8	25
192	27.0	38
Hydrolyse totale:	71.8	100

TABLEAU III

GROUPES AMINÉS LIBRES TOTAUX

A = N de NH₂ exprimé en % de N total.
 B = N de NH₂ exprimé en % de sa valeur dans l'hydrolysat total.

Temps en heures	A	B
24	24.4	33
48	30.0	41
72	35.6	48
96	36.9	50
192	46.5	63
Hydrolyse totale:	73.8	100

TABLEAU IV

GROUPES AMINÉS DES ACIDES AMINÉS HYDROXYLÉS

A = N de NH₂ exprimé en % de N total.
 B = N de NH₂ exprimé en % de sa valeur dans l'hydrolysat total.

Temps en heures	O	B
24	7.5	71
48	—	—
72	8.9	84
96	9.1	86
192	9.1	86
Hydrolyse totale:	10.6	100

DISCUSSION

L'ammoniac dosé dans les hydrolysats de protéine peut être dû, non seulement à l'hydrolyse des groupes amidés, mais aussi à la désamination de certains acides aminés. GORDON, MARTIN ET SYNGE³ pensent à ce point de vue que la différence des teneurs en ammoniac des hydrolysats totaux et des hydrolysats partiels provient de la destruction des acides aminés hydroxylés, et en particulier de la sérine; d'après REES¹⁰, la formation d'ammoniac dans les 8 premiers jours d'une hydrolyse ménagée à froid serait due probablement uniquement aux groupes amidés; au contraire, DESNUELLE ET CASAL¹¹ font remarquer que la désamination des acides aminés hydroxylés peut commencer dès le premier jour de l'hydrolyse. Dans le présent travail, les chiffres du Tableau I montrent que l'ammoniac croît jusqu'à la 96e heure, pour rester ensuite constant pendant au moins une centaine d'heures; on peut donc attribuer ici la formation de cet ammoniac uniquement ou presque, à l'hydrolyse des groupes amidés, hydrolyse qui se trouve terminée à la 96e heure. La quantité d'ammoniac libéré correspond alors à l'existence de 20 groupes amidés dans la molécule de lysozyme (P.M. 14 700).

En ce qui concerne les *acides aminés totaux*, les chiffres du Tableau II indiquent que le quart des acides aminés du lysozyme est libéré après 96 heure d'hydrolyse. Si l'on admet que la molécule de cette protéine contient environ 120 résidus¹, une trentaine d'acides aminés sont ainsi à l'état libre à ce moment.

Les chiffres concernant les groupes aminés, donnés par le Tableau III, permettent d'appliquer la formule de GORDON *et al.*³ pour calculer la longueur moyenne des chaînes peptidiques libérées en cours d'hydrolyse:

$$\tau = \frac{\Delta (\text{valeur de A pour les acides aminés totaux, Tableau II})}{\Delta (\text{valeur de A pour les groupes aminés, Tableaux III})}$$

τ prenant les valeurs 2.0 pour un dipeptide, 1.5 pour un tripeptide et 1.33 pour un tétrapeptide. On trouve ici les valeurs suivantes:

heures	96	192
τ	1.46	1.64

Il y aurait ainsi surtout des tripeptides après 96 heures, et des di- et tripeptides après 192 heures.

L'étude des groupes aminés libres des acides aminés hydroxylés, faite à partir des chiffres du Tableau IV, confirme pour le lysozyme la labilité, déjà constatée chez d'autres protéines^{8,11}, des liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé hydroxylé se trouve impliqué par son groupe aminé. Cette labilité est ici très marquée, puisque 70% des groupes aminés des acides aminés hydroxylés sont libérés après 24 heures d'hydrolyse ménagée.

En ce qui concerne les acides aminés individuels, l'examen du Tableau V permet de faire des distinctions nettes entre les familles d'acides aminés:

TABLEAU V
LIBÉRATION DES ACIDES AMINÉS INDIVIDUELS

A = acide aminé exprimé en poids % de lysozyme.

B = acide aminé exprimé en % de sa valeur dans l'hydrolysat total.

Le signe + signifie que l'acide aminé libre a été identifié mais non dosé.

Les valeurs indiquées pour l'hydrolysat total sont ici tirées d'un travail antérieur, sauf celles marquées d'un astérisque, qui résultent de déterminations récentes plus précises.

Acide aminé	24 heures		48 heures		72 heures		96 heures		192 heures		Hydrolysat total
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Glycocolle	0.9	16	1.9	34	2.9	51	3.4	61	4.7	84	5.6
Alanine	0.7	12	1.2	20	1.7	28	1.8	30	2.8	46	6.1
Sérine	1.5	21	2.5	35	3.9	54	3.9	54	4.6	64	7.2
Cystine	0.0	0	0.0	0	0.0	0	+	+	+	+	8.0
Thrénanine	0.0	0	0.0	0	0.0	0	1.6	30	2.2	42	5.3
Méthionine	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	2.3*
Valine	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.7	15	4.7*
Leucine	0.0	0	0.0	0	0.6	7	0.7	8	1.3	15	8.4*
Isoleucine	0.0	0	0.0	0	0.4	8	0.5	9	1.6	30	5.3*
Phénylalanine	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2.3
Tyrosine	0.0	0	0.0	0	0.9	24	1.4	38	1.5	41	3.7
Proline	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	1.3*
Ac. aspartique	1.1	7	2.9	18	3.3	20	4.1	25	>7	>42	16.5*
Ac. glutamique	0.0	0	0.8	24	1.1	33	1.2	36	2.0	61	3.3
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7.4
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.1
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13.2*

Parmi les acides aminés neutres non aromatiques, le glycocolle, l'alanine et la sérine sont facilement libérés, alors que la cystine, la thrénanine, la valine, les leucines et la proline n'apparaissent à l'état libre que beaucoup plus lentement; il semble ainsi que la longueur du radical carboné intervient dans la facilité de libération de l'acide aminé. Ce résultat est à rapprocher des observations de SYNGE¹² sur les vitesses d'hydrolyse de divers glycylpeptides: la glycylvaline et la glycylleucine se révélant beaucoup plus résistantes à l'hydrolyse acide que la glycylglycine et la glycylalanine. D'autre part, si les groupes hydroxyles interviennent dans la labilisation des liaisons peptidiques auxquelles participent les acides aminés hydroxylés par leurs groupes aminés, et ceci à peu près également pour la sérine et la thrénanine, il n'en est pas de même lorsque les acides aminés hydroxylés participent à ces liaisons par leurs groupes carboxyliques; on constate, en effet, que la sérine est plus rapidement libérée que la thrénanine.

Chez les *acides aminés neutres aromatiques*, la tyrosine est libérée nettement, alors qu'aucune trace de phénylalanine n'est encore apparue à la 192e heure. Ce résultat conduirait à envisager une action labilisante du groupe oxhydryle de la tyrosine sur les liaisons peptidiques, mais la faible proportion des deux acides aminés dans la molécule de lysozyme ne permet pas une conclusion certaine, les acides aminés voisins ayant leur influence propre sur la résistance de ces liaisons. Quant au tryptophane, il est ici détruit en partie, et sa libération n'a pu être suivie.

Les deux *acides aminés dicarboxyliques* sont assez rapidement libérés, et en quantités appréciables. Il en est de même pour les *bases hexoniques* pour lesquelles il n'a pas été possible de faire ici des dosages précis, mais dont nous avons pu constater, qualitativement, une forte libération dès le début de l'hydrolyse.

RÉSUMÉ

L'étude des produits de l'hydrolyse ménagée du lysozyme par HCl 10 N à 37° a été faite après des temps de 24, 48, 72, 96 et 192 heures. Les substances et groupes suivants ont été dosés: ammoniac, groupes carboxyliques des acides aminés libres totaux, groupes aminés libres totaux, groupes aminés libres des acides aminés hydroxylés, acides aminés individuels. La libération de ces derniers au cours de l'hydrolyse a été suivie par chromatographie quantitative sur papier.

Environ un quart des acides aminés du lysozyme est libéré après 96 heures d'hydrolyse. Les liaisons peptidiques dans lesquelles les acides aminés hydroxylés sont unis par leurs groupes aminés, sont rompues particulièrement facilement. Parmi les acides aminés neutres non aromatiques, ceux à chaîne courte (glycocolle, alanine, sérine) sont libérés avant les autres; chez ces derniers, la valine est difficilement détachée, ce qui est peut-être dû à l'empêchement stérique par le groupe isopropyl. Les acides aspartique et glutamique et les bases hexoniques sont détachés assez rapidement.

SUMMARY

The products of graded hydrolysis of lysozyme by 10 N HCl at 37° C have been investigated after 24, 48, 96, and 192 hours. The following substances and groups have been determined quantitatively: ammonia, COOH-groups of total free amino acids, total free amino groups, free NH₂-groups of hydroxy-amino acids, individual amino acids. The liberation of the latter during hydrolysis has been followed by quantitative chromatography on paper.

App. 1/4 of the amino acids of lysozyme are liberated after 96 hours' hydrolysis. The peptide bonds in which the hydroxy-amino acids are involved by their amino group are particularly easily broken. Among the neutral non-aromatic amino acids those with a short chain (glycocolle, alanine, serin) are broken before the others; valin is detached with difficulty; this might be due to steric hindrance by the isopropyl group. Aspartic and glutamic acids and the hexonic bases are detached quite rapidly.

ZUSAMMENFASSUNG

Lysozym wurde der gemässigten Hydrolyse mit 10 N HCl bei 37° unterworfen und die Reaktionsprodukte nach 24, 48, 96, und 192 Stunden untersucht. Die folgenden Substanzen und Gruppen wurden bestimmt: Ammoniakgas, die Carboxylgruppen der gesamten freien Aminosäuren, die Gesamtzahl der freien Aminogruppen, die freien Aminogruppen der Hydroxy-Aminosäuren, die einzelnen Aminosäuren. Das Freiwerden der einzelnen Aminosäuren wurde durch quantitative Verteilungschromatographie auf Papier verfolgt.

Ungefähr ein Viertel der Aminosäuren des Lysozyms werden nach 96stündiger Hydrolyse in Freiheit gesetzt. Die Bindungen, an denen die Hydroxy-Aminosäuren durch ihre Aminogruppen beteiligt sind, werden besonders leicht gespalten. Von den neutralen, nicht aromatischen Aminosäuren werden diejenigen mit kurzer Kette (Glycocol, Alanin, Serin) vor den anderen in Freiheit gesetzt; Valin wird schwer abgespalten, was vielleicht durch sterische Hinderung durch die Isopropylgruppe bedingt wird. Die Asparagin- und die Glutaminsäure sowie die Hexonbasen werden verhältnismässig schnell abgespalten.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 509.
- ² R. MONIER ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 224.
- ³ A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1369.
- ⁴ E. WEST, B. CHRISTENSEN ET R. RINEHART, *J. Biol. Chem.*, 132 (1940) 681.
- ⁵ D. VAN SLYKE, A. HILLER ET D. A. MCFADYEN, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 681.
- ⁶ A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 294.
- ⁷ R. B. FISCHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ⁸ R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- ⁹ H. M. WINEGARD, G. TOENNIES ET R. J. BLOCK, *Science*, 108 (1948) 506.
- ¹⁰ M. W. REES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
- ¹¹ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ¹² R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 351.

Reçu le 11 janvier 1950