

**LE SPECTRE ULTRA-VIOLET DU LYSOZYME;
AVEC DES CONSIDÉRATIONS SUR LE SPECTRE ULTRA-VIOLET
DE DIVERS ACIDES AMINÉS ET DE QUELQUES-UNS
DE LEURS PEPTIDES**

par

CLAUDE FROMAGEOT ET GEORGES SCHNEK

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

On sait que parmi les acides aminés constitutifs des protéines, seuls le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et la cystine présentent des spectres d'absorption caractéristiques, pour des longueurs d'onde comprises entre $240 \text{ m}\mu$ et $310 \text{ m}\mu$. Diverses mesures, parmi lesquelles celles de HOLIDAY¹, de ANSLOW ET NASSAR² et de GOODWIN ET MORTON³ portant sur les spectres ultra-violet de protéines définies ont montré que, dans des conditions de pH déterminées, ces spectres correspondent, quantitativement, à la somme des spectres des acides aminés aromatiques et de la cystine que ces protéines contiennent, à un léger décalage de longueur d'onde (de l'ordre de 1 à 2 $\text{m}\mu$) près. Or, des recherches précédentes⁴ ont indiqué que le lysozyme renferme pour un poids moléculaire de 14 700, 6 résidus de tryptophane, 3 de tyrosine, 2 de phénylalanine et 5 de cystine. L'étude du spectre ultra-violet de cette protéine devait permettre une confirmation de ces données analytiques. En outre, elle était susceptible de donner des indications sur le rôle éventuel joué par les résidus des acides aminés en question dans la structure de la protéine. Enfin, la connaissance préalable du spectre ultra-violet du lysozyme était nécessaire à des investigations actuellement en cours sur le mode d'union de cet enzyme avec le polysaccharide sur lequel il exerce son action.

La comparaison du spectre du lysozyme avec celui d'un mélange des acides aminés précédents, en les proportions convenables, nécessite la connaissance du spectre de chacun de ces acides aminés placé dans des conditions bien définies. Or, en consultant la bibliographie à ce sujet, nous avons constaté que bien des incertitudes règnent encore dans la connaissance de certains de ces spectres. Aussi avons-nous repris leur détermination. D'autre part, les modifications des spectres des acides aminés en question, selon l'état de dissociation de ces derniers, rendaient utiles des investigations sur les spectres de quelques-uns de leurs peptides.

Le présent travail comporte ainsi:

1. La détermination des spectres des acides aminés suivants: tyrosine, tryptophane, phénylalanine, cystine, cystéine dans diverses conditions, libres ou sous forme de peptides: leucyl-tyrosine, tyrosyl-cystéine, glycyl-trypophane.

2. La détermination du spectre du lysozyme en milieu acide et en milieu alcalin, et l'étude des variations de ce spectre en fonction du pH.

Bibliographie p. 122.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les acides aminés et les peptides utilisés (Hoffmann La Roche, Eastman Kodak) ont été soigneusement recristallisés, par les procédés habituels⁵. La vérification de leur pureté a été effectuée par dosage de l'azote total et de l'azote aminé, par chromatographie de partage sur papier, et éventuellement par leur pouvoir rotatoire.

Le lysozyme a été préparé soit par nous-mêmes comme il a été indiqué précédemment, soit par "Armour Laboratories". Quelle que soit leur origine, les différents échantillons de lysozyme ont toujours fourni pratiquement les mêmes résultats. Les concentrations en lysozyme ont été calculées à partir d'une teneur en azote total de 18.6% et d'un poids moléculaire de 14 700 pour la protéine iso-électrique⁴.

Les spectres ont été mesurés à la température de 18 à 20°, au moyen d'un spectrophotomètre de Beckman à optique de quartz entre 240 m μ et 320 m μ , l'épaisseur des solutions étant de 1 cm. Dans les régions où les courbes présentent des variations importantes, les points ont été mesurés tous les 1 m μ ou même tous les 0.5 m μ . Comme d'habitude, nous désignons par ϵ le coefficient d'absorption moléculaire.

I. Spectres ultra-violets des acides aminés et de quelques-uns de leurs peptides

Tyrosine. Le spectre ultra-violet quantitatif de la tyrosine placée dans diverses conditions, a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations^{1, 2, 3, 6, 7}. Si, en gros, les résultats obtenus s'accordent, et si en particulier tous les auteurs sont d'accord pour attribuer à l'ionisation du groupement -OH le décalage considérable observé entre le spectre en milieu alcalin et le spectre en milieu acide, il apparaît néanmoins des différences non négligeables dans les données des divers auteurs, notamment en ce qui concerne le nombre et la position exacte des bandes d'absorption apparaissant sur le spectre.

Les mesures portent ici d'une part sur des solutions de tyrosine de $5 \cdot 10^{-4} M$ ou de $2 \cdot 10^{-4} M$, soit dans l'acide chlorhydrique 0.1 N, soit dans l'acétate de

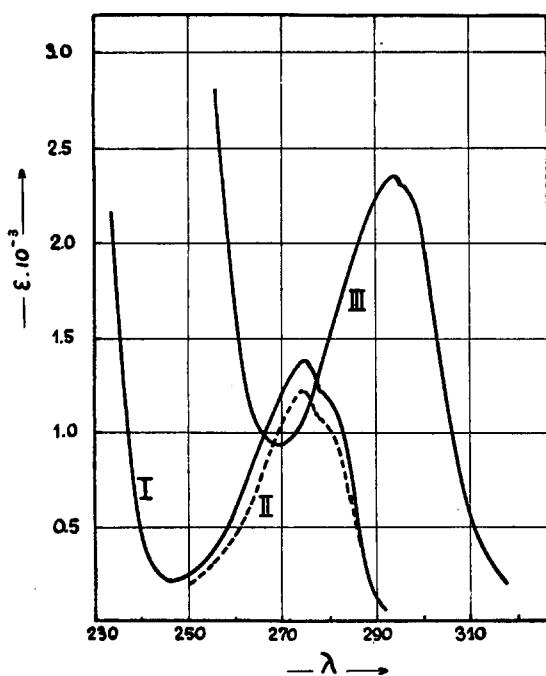


TABLEAU I
POSITION ET VALEUR DU MAXIMUM DES
BANDES D'ABSORPTION DE LA TYROSINE

Solvant	λ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
HCl 0.1 N	275 280	1.39 1.18
Acétate de Na 0.01 M	275 280	1.23 1.04
NaOH 0.1 N	293 296	2.34 2.27

Fig. 1. Spectre d'absorption de la tyrosine

- I. Dans HCl 0.1 N
- II. Dans CH_3COONa 0.01 M
- III. Dans NaOH 0.1 N

sodium 0.01 M (pH 6.1), soit dans la soude 0.1 N. Les spectres ainsi obtenus sont représentés respectivement par les courbes I, II et III de la Fig. 1. Chacun de ces spectres présente deux bandes d'absorption dont les positions et les maxima sont indiqués dans le Tableau I.

Ces maxima n'avaient été signalés jusqu'ici que par HOLIDAY¹ et seulement pour la tyrosine en solution dans l'acide chlorhydrique. Les maxima observés ici en milieu acide et en solution aqueuse correspondent sensiblement aux bandes qui apparaissent à $\lambda = 276 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 282 \text{ m}\mu$ sur les photographies publiées par FERAUD, DUNN ET KAPLAN⁸, représentant le spectre qualitatif de la tyrosine en solution aqueuse. Etant donné que le pk du groupement OH de la tyrosine est voisin de 10, le spectre de la tyrosine en solution aqueuse est en effet à peu près le même qu'en solution acide. Mais nous n'avons pu mettre en évidence les nombreuses autres bandes d'absorption qui se sont manifestées sur les premières photographies obtenues par FERAUD *et al.*⁸. Ces dernières bandes, ou au moins la plupart d'entre elles, sont donc bien dues à un artefact, comme l'ont indiqué ultérieurement les mêmes auteurs⁹.

D'autre part nous avons suivi en détail les variations du spectre de la tyrosine en fonction du pH, et ce, à titre de comparaison avec les mesures décrites plus loin; on peut ainsi, comme l'ont déjà indiqué CRAMMER ET NEUBERGER⁶ déterminer la valeur du pH du groupe OH de la tyrosine. Nous trouvons ici sensiblement 10.1 (courbe I, Fig. 2), cette valeur n'étant pas corrigée en ce qui concerne la légère influence de l'activité ionique des solutions tampons (0.1 M); cette valeur est en bon accord avec celle de 10.05 (non corrigée) trouvée par CRAMMER ET NEUBERGER⁶.

Leucyl-tyrosine et tyrosyl-cystéine. Les mesures concernant la leucyl-tyrosine et la tyrosyl-cystéine sont faites dans des conditions analogues aux précédentes, en prenant en outre les précautions convenables pour éviter l'oxydation de la tyrosyl-cystéine, surtout en milieu alcalin. Les résultats obtenus, illustrés par les courbes I, II, III, IV de la Fig. 3, et II, III de la Fig. 2, confirment^{10, 11, 12, 13} que le spectre de la tyrosine ne subit guère de modification sensible lorsque l'acide aminé est en combinaison peptidique; ils montrent en outre que la valeur (non corrigée) du pk du groupe OH de la tyrosine engagée dans les peptides en question est de 10.2 pour la leucyl-tyrosine et de 10.5 pour la tyrosyl-cystéine. Ces chiffres, à peine supérieurs à celui que l'on trouve pour la tyrosine libre, indiquent toutefois que le fait d'être en combinaison peptidique freine légèrement la dissociation du groupe phénolique.

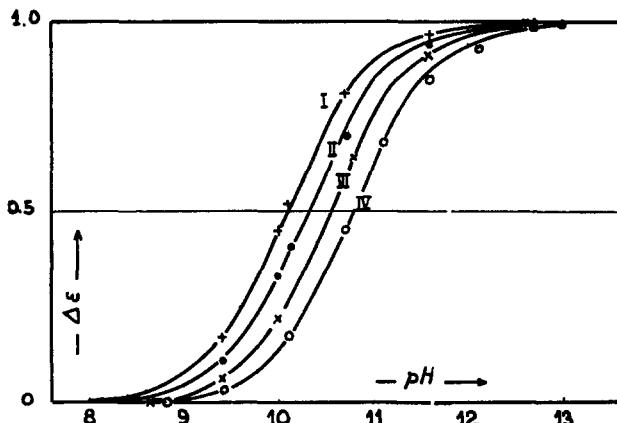


Fig. 2. Accroissement de ϵ (moyenne pour $\lambda = 285 \text{ m}\mu$, $\lambda = 290 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 295 \text{ m}\mu$) en fonction du pH, la différence observée entre la valeur minimum de ϵ (mesurée à des pH < 8) et la valeur maximum de ϵ (mesurée à pH = 13) étant prise égale à 1

I. Tyrosine II. Leucyl-tyrosine
III. Tyrosyl-cystéine IV. Lysozyme

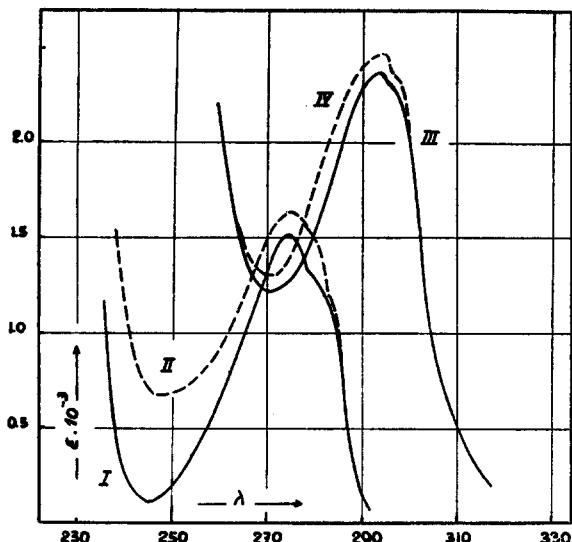


Fig. 3. Spectre d'absorption de la Leucyl-tyrosine et de la Tyrosyl-cystéine

- I. Leucyl-tyrosine dans Tampon Sörensen pH 7.8
- II. Tyrosyl-cystéine dans Tampon Sörensen pH 7.8
- III. Leucyl-tyrosine dans NaOH 0.1 N
- IV. Tyrosyl-cystéine dans NaOH 0.1 N

bandes: celles qui apparaissent sur les photographies publiées par FERAUD *et al.*⁸ et qui, sur ces photographies, sont situées à 280 $m\mu$ et 289 $m\mu$. Seuls les spectres obtenus en solution aqueuse, par RAPPORT *et al.*¹⁴ et par EDWARDS¹⁵ montrent les trois bandes dont nos déterminations confirment l'existence. On pourrait penser que la présence de la bande voisine de 273 $m\mu$, et qui existe quel que soit

TABLEAU II
POSITION ET VALEUR DU MAXIMUM DES BANDES D'ABSORPTION DU TRYPTOPHANE

Solvant	λ ($m\mu$)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
HCl 0.1 N	273	5.40
	278	5.75
	288	4.50
Eau	272	5.10
	279	5.25
	288	4.40
NaOH 0.1 N	272	5.05
	279	5.25
	288	4.55

Bibliographie p. 122.

Tryptophane et glycyl-tryptophane. De même que celui de la tyrosine, le spectre ultra-violet quantitatif du tryptophane a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations^{1, 3, 7, 14}; les données publiées par les différents auteurs présentent également des variations sensibles.

Les mesures portent ici sur des solutions de tryptophane variant de $2 \cdot 10^{-4} M$ à $1 \cdot 10^{-4} M$, soit dans l'acide chlorhydrique 0.1 N, soit dans l'eau (pH = 6.0), soit dans la soude 0.1 N. Les spectres ainsi obtenus sont représentés respectivement par les courbes I, II et III de la Fig. 4. Chacun de ces spectres présente trois bandes d'absorption dont les positions et les maxima sont indiqués dans le Tableau II.

La plupart des courbes obtenues précédemment montraient l'existence de deux seulement de ces

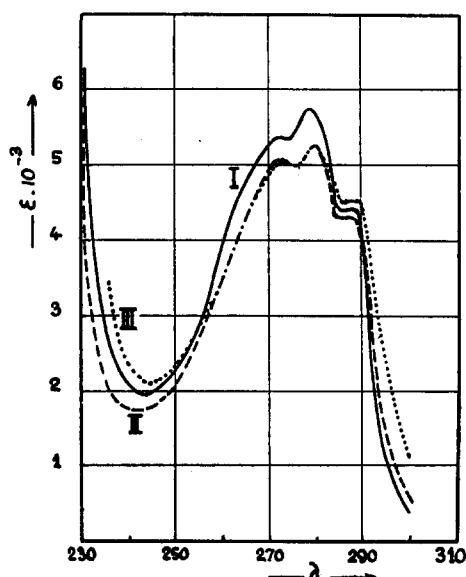


Fig. 4. Spectre d'absorption du tryptophane

- I. Dans HCl 0.1 N
- II. Dans l'eau
- III. Dans NaOH 0.1 N

le pH de la solution, serait due non pas au tryptophane lui-même, mais à une impureté dont la présence serait toujours possible malgré les recristallisations subies par le tryptophane. Le fait que cette bande existe dans le glycyl-triptophane et dans le lysozyme dont le spectre est conditionné surtout par le tryptophane, permet d'éliminer cette interprétation et d'attribuer la bande en question réellement au tryptophane.

Il n'est pas sans intérêt d'interpréter les légers écarts qui existent entre les spectres du tryptophane obtenus lorsque celui-ci est en solution acide, aqueuse ou alcaline. Nous bornant à la partie comprise entre $\lambda = 255 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 300 \text{ m}\mu$, on peut considérer deux zones : dans la première, située entre $\lambda = 255 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 283 \text{ m}\mu$, les courbes d'absorption du tryptophane en solution aqueuse et en solution alcaline se confondent ; l'absorption est donc la même, dans ce intervalle, que le tryptophane soit sous la forme $^+H_3N-R-COO^-$ ou sous la forme $H_2N-R-COO^-$. Dans cette même zone, la courbe d'absorption du tryptophane en solution acide est nettement au-dessus des deux autres, ce qui indique que cet acide aminé sous la forme $^+H_3N-R-COOH$ absorbe plus que l'une des deux formes précédentes. On peut donc en conclure que l'absorption de la molécule hypothétique non dissociée $H_2N-R-COOH$ correspondrait, dans la zone comprise entre $\lambda = 255 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 283 \text{ m}\mu$, à celle du tryptophane en solution acide. Dans la deuxième zone, située entre $\lambda = 283 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 300 \text{ m}\mu$, ce sont les courbes d'absorption du tryptophane en solution acide et en solution aqueuse qui se confondent, la courbe d'absorption en solution alcaline étant au-dessus des deux autres. Par un raisonnement analogue au précédent, on est conduit à admettre que, dans cette zone, c'est la courbe en milieu alcalin qui représenterait le spectre de la molécule de tryptophane non dissociée. Il apparaît ainsi que la courbe d'absorption de la molécule non dissociée, toute théorique, du tryptophane, est ainsi constituée, de $\lambda = 255 \text{ m}\mu$ à $\lambda = 283 \text{ m}\mu$, par celle du tryptophane en milieu acide, et de $\lambda = 283 \text{ m}\mu$ à $\lambda = 300 \text{ m}\mu$, par celle du tryptophane en milieu alcalin. L'intérêt d'une telle courbe est qu'elle correspond vraisemblablement au spectre du tryptophane tel qu'il se trouve au sein des protéines, à l'état de "résidu", forme sous laquelle son spectre doit être plus proche du spectre de la molécule non dissociée, que de celui du tryptophane sous forme d'anion ou de cation. C'est une telle courbe que nous utilisons plus loin dans l'étude du lysozyme.

La détermination du spectre du glycyl-triptophane, placé dans des conditions analogues à celles du tryptophane, a donné les courbes de la Fig. 5. Ces courbes qui dans l'ensemble sont sensiblement les mêmes que celles fournies par le tryptophane libre, en diffèrent toutefois d'une part par ce que leur ordre entre $\lambda = 240 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 285 \text{ m}\mu$ n'est pas le même que dans le cas du trypto-

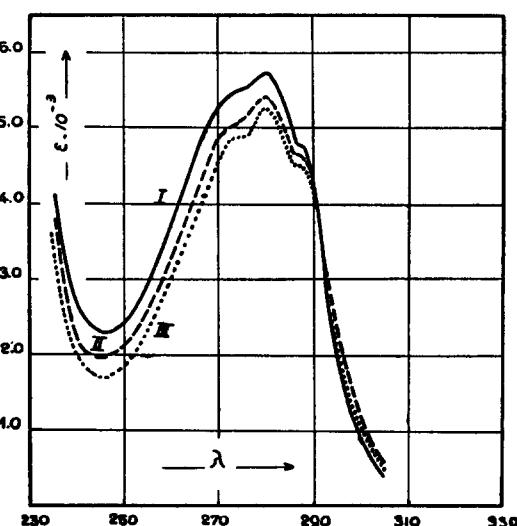


Fig. 5. Spectre d'absorption du glycyl-triptophane

- I. Dans HCl 0.1 N
- II. Dans l'eau
- III. Dans NaOH 0.1 N

phane*, et parce que toutes trois sont pratiquement confondues pour $\lambda \geq 290 \text{ m}\mu$. L'aspect de ces spectres confirme la validité des considérations développées à propos du tryptophane: en effet, dans le glycyl-tryptophane, seule peut entrer en jeu la dissociation du groupe acide du tryptophane: celle-ci n'influence l'absorption, comme on vient de le voir, que pour $\lambda \leq 285 \text{ m}\mu$. En milieu acide, cette dissociation est nulle; on constate alors que la courbe d'absorption du glycyl-tryptophane, en milieu acide, sur toute l'étendue du spectre, est la même, aux erreurs de mesure près, que celle qui résulte des considérations théoriques concernant le tryptophane non dissocié. La dissociation acide étant seule en jeu, on s'explique que pour $\lambda \leq 285 \text{ m}\mu$, l'absorption soit d'autant plus faible que cette dissociation est plus forte, c'est-à-dire que le pH de la solution s'accroît, d'où l'ordre des courbes dans cette partie du spectre.

Phénylalanine. Comme ceux des acides aminés précédents, le spectre quantitatif de la phénylalanine a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations. Négligeant les travaux anciens d'après lesquels le spectre de la phénylalanine en solution aqueuse serait représenté par une courbe ne montrant qu'un seul maximum entre $\lambda = 240 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 270 \text{ m}\mu$, ces déterminations indiquent l'existence dans cette région, de plusieurs bandes d'absorption très nettes^{2,16}. Les photographies de FERAUD *et al.*⁸ en montrent sept.

Les mesures que nous avons effectuées ici portent sur des solutions de phénylalanine $1 \cdot 10^{-2} M$ à $1 \cdot 10^{-3} M$, soit dans HCl 0.1 M, soit dans l'eau, soit dans NaOH 0.1 M.

Les spectres obtenus sont représentés respectivement par les courbes I, II et III de la Fig. 6.

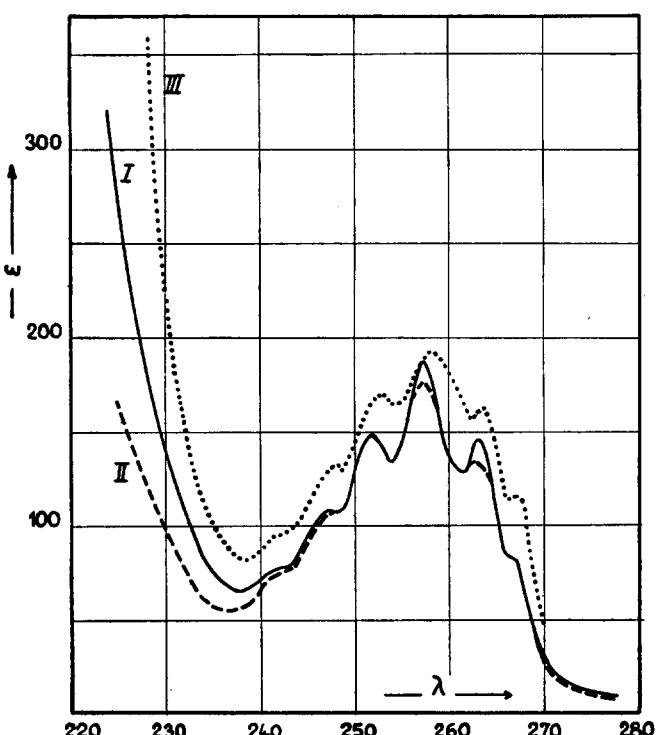


Fig. 6. Spectre d'absorption de la phénylalanine

I. Dans HCl 0.1 N II. Dans l'eau III. Dans NaOH 0.1 N

* On pourrait utiliser les variations du spectre dans cette zone pour déterminer, au moins approximativement, la valeur de p_{Ka} de la dissociation du groupe acide du glycyl-tryptophane.

TABLEAU III
POSITION ET VALEUR DU MAXIMUM
DES BANDES D'ABSORPTIONS DE LA
PHÉNÝLALANINE

Solvant	λ (mμ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
HCl 0.1 N	242	0.77
	247	1.07
	252	1.48
	257.5	1.86
	263	1.46
	267	0.82
Eau	242	0.75
	247	1.05
	252	1.46
	257	1.77
	263	1.35
	267	0.82
NaOH 0.1 N	242	0.96
	248	1.32
	251.5	1.68
	258.5	1.93
	263.5	1.62
	267.5	1.15

Les six bandes ainsi mises en évidence, dont les positions et les maxima sont donnés dans le Tableau III, correspondent assez bien à celles signalées par FERAUD *et al.*⁸. Par contre nous n'avons pu mettre en évidence la septième bande indiquée par ces auteurs comme étant située à $\lambda = 235 \text{ m}\mu$.

Cystine et Cystéine. Une détermination précise du spectre de la cystine a déjà été faite par ANSLOW ET FOSTER¹⁷, d'après lesquels la courbe représentant ce spectre s'infléchit entre $\lambda = 240 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 260 \text{ m}\mu$, et ce aussi bien en solution acide qu'en milieu alcalin.

En ce qui concerne la cystine, nos mesures ont été effectuées sur des solutions $1 \cdot 10^{-3} M$ soit dans $\text{HCl } 0.1 N$, soit dans $\text{NaOH } 0.1 N$. Quant à la cystéine, son spectre a été étudié sur une solution $1 \cdot 10^{-2} M$ uniquement dans $\text{HCl } 0.1 N$. Les résultats obtenus sont illustrés par les courbes I, II et III de la Fig. 7.

On constate que l'absorption de la cystine est considérablement plus élevée que celle de la cystéine, et que, comme l'avaient déjà vu ANSLOW ET FOSTER¹⁷, l'absorption générale de la cystine est plus forte en milieu alcalin qu'en milieu acide; en particulier, le maximum ($\epsilon = 340$) qui se manifeste en milieu alcalin à $\lambda = 249 \text{ m}\mu$ disparaît pratiquement en solution acide.

II. Spectre ultra-violet du lysozyme

Comparaison entre le spectre du lysozyme et celui d'un mélange des acides aminés absorbants. Le spectre du lysozyme a été mesuré tout d'abord en solution soit dans $\text{HCl } 0.1 N$, soit dans $\text{NaOH } 0.1 N$, la concentration en lysozyme variant de 112 à 225 μg d'azote total par ml. Les résultats obtenus, calculés pour un poids moléculaire de la protéine de 14 700, sont donnés par les courbes des Figures 8 et 9. Chacune de ces figures présente également, à titre de comparaison, la courbe théorique calculée pour le spectre d'un mélange de 6 molécules de tryptophane, 3 molécules de tyrosine et 5 molécules de cystine. Nous n'avons pas fait intervenir la phénylalanine, dont la proportion (2 ou 3 molécules par molécule de lysozyme) et les coefficients d'absorption moléculaires sont trop faibles pour jouer ici un rôle appréciable. Dans l'établissement de cette courbe théorique, nous avons considéré qu'il convenait de prendre comme base, pour le tryptophane dont le rôle est ici de beaucoup le plus important, la courbe d'absorption de la molécule supposée non dissociée telle que nous l'avons déterminée plus haut. Les courbes des Figures 8 et 9 montrent qu'il existe un accord tout à fait satisfaisant entre le spectre du lysozyme et celui du mélange des acides aminés, et ce, aussi bien en milieu acide qu'en solution alcaline. En particulier, les trois maxima se retrouvent parfaitement. La seule différence réside dans un léger décalage du spectre du lysozyme vers les grandes longueurs d'onde, décalage de l'ordre de 2 $\text{m}\mu$; un tel décalage s'observe généralement dans le cas d'autres protéines.

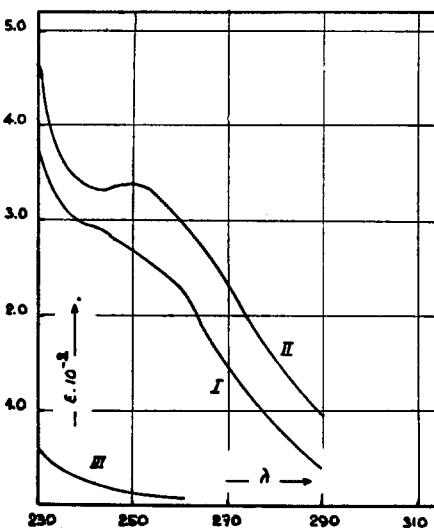


Fig. 7. Spectre d'absorption de la cystine et de la cystéine

- I. Cystine dans $\text{HCl } 0.1 N$
- II. Cystine dans $\text{NaOH } 0.1 N$
- III. Cystéine dans $\text{HCl } 0.1 N$

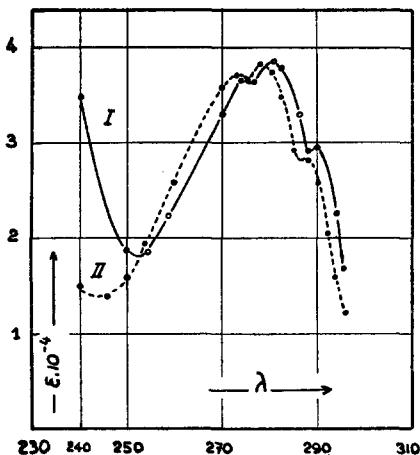


Fig. 8. I. Spectre d'absorption du lysozyme dans HCl 0.1 N; II. Spectre d'absorption calculé pour le mélange 6 tryptophane + 3 tyrosine + 5 cystine, dans HCl 0.1 N

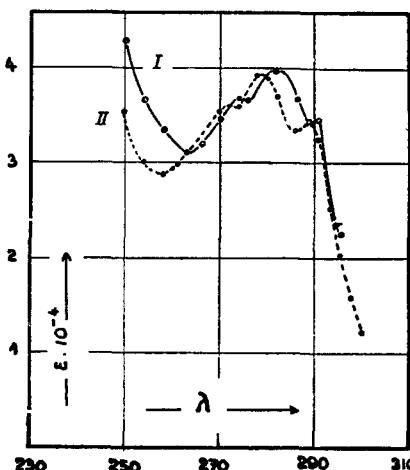


Fig. 9. I. Spectre d'absorption du lysozyme dans NaOH 0.1 N; II. Spectre d'absorption calculé pour le mélange 6 tryptophane + 3 tyrosine + 5 cystine, dans NaOH 0.1 N

TABLEAU IV

POSITIONS ET VALEURS COMPARÉES DES MAXIMA DES SPECTRES D'ABSORPTION DU LYSOZYME D'UNE PART ET DU MÉLANGE: 6 MOL. TRYPTOPHANE + 3 MOL. TYROSINE + 5 MOL. CYSTINE D'AUTRE PART

Lysozyme		Mélange acides aminés		$(\Delta m\mu)$
$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (m μ)	
A. Dans HCl 0.1 N				
3.67	274	3.72	273	1
3.88	281	3.86	278	3
2.97	290	2.85	288	2
B. Dans NaOH 0.1 N				
3.70	274	3.62	272	2
3.98	281	3.96	279	2
3.45	290	3.44	288	2

L'accord entre les spectres mesurés et les spectres calculés confirme les valeurs analytiques trouvées par FROMAGEOT ET PRIVAT DE GARILHE⁴ pour la teneur du lysozyme en tryptophane, tyrosine et cystine; la valeur de 6.3% pour le tryptophane, valeur indiquée récemment par STEERS ET SEVAG¹⁸, et qui correspondrait à 4 à 5 résidus de tryptophane par molécule de lysozyme, est donc manifestement trop faible.

Variations du spectre du lysozyme en fonction du pH. Pour l'étude des variations du spectre du lysozyme en fonction du pH, les solutions tampons utilisées sont constituées par des mélanges glycocolle 0.1 M + NaCl 0.1 M + NaOH 0.1 M, d'après SÖRENSEN¹⁹. Nous admettons en outre que le pH de NaOH 0.1 M est sensiblement 13. Les courbes obtenues se placent évidemment entre celles des Fig. 8 et 9. Elles présentent trois

parties: une première, correspondant à $\lambda < 270 \text{ m}\mu$ dont les fortes variations sous l'influence du pH sont dues à des facteurs complexes^{2, 20} qu'il ne nous est pas possible d'analyser ici. Une seconde, comprise entre $\lambda = 270 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 286 \text{ m}\mu$, qui n'est guère modifiée par le pH; dans cette seconde zone d'absorption, due essentiellement au tryptophane et à la tyrosine, l'influence des variations du spectre de cette dernière ne se fait guère sentir; enfin, une troisième partie, située entre $\lambda = 286 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 300 \text{ m}\mu$, où les variations de l'absorption, de nouveau importantes, sont dues essentiellement à celles du spectre de la tyrosine, c'est-à-dire à la dissociation du groupe OH de cette dernière. Comme l'ont fait déjà CRAMMER ET NEUBERGER⁶ pour d'autres protéines, il est possible d'étudier la dissociation du groupe OH de la tyrosine constituant le lysozyme à partir des variations du spectre d'absorption, en fonction du pH. Pour ce faire, nous utilisons ici les variations à $\lambda = 285, 290$ et $295 \text{ m}\mu$. Soit a le degré de dissociation du groupe OH; supposant a nul aux $\text{pH} \leq 8$, il est facile d'obtenir, à partir des données spectrales, la courbe représentant les variations de a en fonction du pH. C'est la courbe IV de la Fig. 2. Négligeant l'influence de la concentration ionique extérieure, la valeur de pK cherchée se montre voisine de 10.8; c'est-à-dire que, en apparence tout au moins, le groupement OH de la tyrosine engagée dans le lysozyme se dissocie un peu moins facilement que celui de la tyrosine libre. Si on rapproche ce résultat de ceux qui ont été obtenus plus haut avec les peptides de la tyrosine, on voit qu'il leur correspond tout à fait: ce léger retard de la dissociation est un phénomène banal. Il convient à ce point de vue de remarquer que le décalage de la valeur du pK en question est le même au point isoélectrique du lysozyme, c'est-à-dire aux environs de 11, qu'à des pH inférieurs ou supérieurs. On peut donc conclure que, à l'intérieur de la molécule de lysozyme, le groupe OH de la tyrosine est libre.

Réversibilité des variations du spectre du lysozyme sous l'action du pH. Les variations du spectre du lysozyme se montrent parfaitement réversibles à la condition qu'aucune oxydation de la protéine n'ait eu lieu en milieu alcalin. Les expériences concernant cette réversibilité sont faites de la façon suivante:

Des solutions contenant 112 µg d'azote protéique/ml sont maintenues dans NaOH 0.1 M, à 18°, pendant des temps variant de 2 heures à 4 jours; après quoi ces solutions sont additionnées du même volume de HCl 0.2 N. D'autre part, on dispose d'une solution de lysozyme, à même concentration en protéine, dans HCl 0.1 N + NaCl 0.05 N. Les spectres de ces diverses solutions acides sont les mêmes (Fig. 8), que le lysozyme ait été ou non soumis à l'action préalable de la soude. On obtient d'ailleurs des résultats identiques en utilisant des concentrations en soude et en HCl 10 fois plus fortes.

RÉSUMÉ

L'étude des spectres d'absorption dans l'ultra-violet, à divers pH, des acides aminés suivants: tyrosine, tryptophane, phénylalanine, cystine et cystéine, et de quelques-uns de leurs peptides, a précisément les données acquises antérieurement sur ces spectres.

L'étude du spectre du lysozyme a montré que, en milieu acide comme en milieu alcalin, ce spectre, calculé pour un poids moléculaire de 14 700 et une teneur en azote de 18.6%, correspond à celui d'un mélange de 6 mol. tryptophane + 3 mol. tyrosine + 5 mol. cystine (les 2 ou 3 mol. de phénylalanine n'intervenant guère). D'autre part, les variations du spectre ultra-violet du lysozyme pour $\lambda = 288 \text{ m}\mu$ à $292 \text{ m}\mu$, en fonction du pH, ont permis de calculer que le groupe OH de la tyrosine dans le lysozyme possède un pK de 10.8, peu différent de celui de la tyrosine libre, de $\text{pK} = 10.1$. Les variations du spectre d'absorption du lysozyme en fonction du pH sont réversibles, à condition d'éviter l'oxydation de la protéine lorsqu'elle est en milieu alcalin.

SUMMARY

The investigation of the ultra-violet absorption spectra of the following amino-acids: tyrosine, tryptophan, phenylalanine, cystine, and cysteine and some of their peptides at various pH, has confirmed the spectroscopic results previously obtained.

It has been shown that the spectrum of lysozyme in acid as well as in alkaline solution, calculated for a molecular weight of 14 700 and a nitrogen content of 18.6%, corresponds to that of a mixture of 6 mols of tryptophan + 3 mols of tyrosine + 5 mols of cystine, (the 2 to 3 mols of phenylalanine have practically no influence). On the other hand, it has proved possible to calculate, from the variations of the ultra-violet spectrum of lysozyme at $\lambda = 288 - 292 \text{ m}\mu$ as a function of the pH, the value $p_K = 10.8$ for the OH group of the tyrosine in the lysozyme, differing only slightly from that of free tyrosine which has $p_K = 10.1$. The variations of the absorption spectrum of lysozyme as a function of pH are reversible, provided the oxidation of the protein in an alkaline medium is avoided.

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der Untersuchung der U. V.-Absorptionsspektren der folgenden Aminosäuren: Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Cystin und Cystein und einiger ihrer Peptide bei verschiedenem pH, konnten die Ergebnisse früherer Arbeiten genauer angegeben werden.

Es wurde gezeigt, dass das Spektrum des Lysozyms in saurer wie in alkalischer Lösung, berechnet für ein Molekulargewicht von 14 700 und einen Stickstoffgehalt von 18.6%, dem Spektrum einer Mischung von 6 Mol. Tryptophan + 3 Mol. Tyrosin + 5 Mol. Cystin entspricht (während die 2 bis 3 Mol. Phenylalanin sozusagen keinen Einfluss haben). Andererseits konnte auf Grund der Änderungen des U. V.-Spektrums von Lysozym für $\lambda = 288 \text{ m}\mu$ bis $\lambda = 292 \text{ m}\mu$ in Funktion des pH, das p_K der OH-Gruppe des Tyrosins im Lysozym berechnet werden. Es beträgt 10.8, ist also wenig verschieden von dem p_K des freien Tyrosins, 10.1. Die Änderungen des Absorptionsspektrums von Lysozym sind reversibel, wenn man eine Oxydation des Proteins in alkalischer Lösung vermeidet.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. R. HOLIDAY, *Biochem. J.*, 30 (1935) 1795.
- 2 G. A. ANSLOW ET S. A. NASSAR, *J. Opt. Soc. Am.*, 31 (1941) 118.
- 3 T. W. GOODWIN ET R. A. MORTON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 628.
- 4 C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 509.
- 5 M. S. DUNN ET L. B. ROCKLAND, *Advances in Protein Chemistry*, 3 (1947) 296.
- 6 J. L. CRAMMER ET A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 37 (1943) 302.
- 7 I. W. SIZER ET A. C. PEACOCK, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 767.
- 8 K. FERAUD, M. S. DUNN ET J. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 112 (1935) 323.
- 9 K. FERAUD, M. S. DUNN ET J. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 665.
- 10 E. ABDERHALDEN ET R. HAAS, *Z. physiol. Chem.*, 166 (1927) 78.
- 11 M. BERGMAN, L. ZEWAR, L. SALZMANN ET H. SCHLEICH, *Z. physiol. Chem.*, 224 (1934) 17.
- 12 M. BERGMAN ET J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 405.
- 13 J. S. FRUTON ET M. BERGMAN, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 627.
- 14 M. M. RAPPORTE, A. A. GREEN ET I. H. PAGE, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 1243.
- 15 B. G. EDWARDS, *Arch. Biochem.*, 21 (1949) 103.
- 16 M. A. MAGILL, R. E. STEIGER ET A. J. ALLEN, *Biochem. J.*, 31 (1937) 588.
- 17 G. A. ANSLOW ET M. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 97 (1936) 37.
- 18 E. STEERS ET M. G. SEVAG, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 641.
- 19 S. P. L. SØRENSEN, *Biochem. Z.*, 21 (1909) 535.
- 20 U. JONES ET K. J. GREECH, *J. Opt. Soc. Am.*, 33 (1943) 209.

Reçu le 30 mars 1950