

SUR LA STRUCTURE DU LYSOZYME. ÉTUDE DE PEPTIDES BASIQUES RÉSULTANT D'UNE HYDROLYSE ACIDE MÉNAGÉE

par

ROGER ACHER, MARIAN JUTISZ ET CLAUDE FROMAGEOT,

(avec la collaboration de JACQUELINE CHAUVET)

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

Dans un travail précédent¹ nous avons constaté qu'en soumettant le lysozyme à l'action de HCl 10 N à 37° pendant huit jours, on obtient à côté d'acides aminés libres, un grand nombre de peptides courts. Parmi ces derniers, les peptides à caractère basique nous ont paru particulièrement intéressants à étudier. L'espoir de pouvoir les séparer spécifiquement sur silice², la facilité du dosage de l'arginine et de l'histidine³, la présence d'un seul résidu d'histidine par molécule de lysozyme, donc la possibilité d'obtenir des fragments peptidiques marqués par l'histidine, ont été autant de raisons qui ont guidé notre choix.

Dans le présent travail, nous séparons par adsorption sur silice² la fraction basique d'un hydrolysats partiel de lysozyme; nous étudions d'une part les caractères généraux de cette fraction et d'autre part les peptides basiques après leur isolement par chromatographie sur papier.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Comme précédemment, le lysozyme utilisé provient de Armour Laboratories, Chicago, et les résultats sont calculés pour du lysozyme isoélectrique, sec et sans cendres, de teneur en azote total de 18.6%. L'hydrolyse partielle est effectuée par HCl pur 10 N, à 37°, pendant huit jours, en tubes scellés, sous vide. Après arrêt de l'hydrolyse, l'excès de HCl est chassé par des évaporations répétées dans un dessiccateur sous vide.

La suite des opérations est schématisée dans le Tableau I.

L'élimination de l'ammoniac formé, qui correspond très régulièrement à 1.80 mg de N ammoniacal pour 100 mg de lysozyme, est faite après déplacement par la lithine, par distillation sous vide. La déminéralisation de l'hydrolysats, dont le volume est de 10 à 15 ml, s'effectue dans un appareil voisin de celui décrit par CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁴, mais modifié de telle sorte que soient assurés un refroidissement convenable de la cuve et une récupération facile de la solution; le détail du dispositif utilisé est donné par la Fig. 1. La déminéralisation est effectuée en 30 minutes, sous une intensité variant de 1 à 0.4 ampère. Des dosages d'azote total (Kjeldahl), d'azote aminé contigu aux groupes carboxyliques libres⁵, et des dosages colorimétriques spécifiques de l'arginine et de l'histidine effectués sur des mélanges témoins montrent qu'on récupère pratiquement la totalité des bases hexoniques après déminéralisation faite dans ces conditions; cette observation est d'autant plus importante que d'après STEIN ET MOORE⁶, il peut se produire au cours de la dessalification, dans certaines conditions, une destruction considérable de l'arginine avec formation d'ornithine.

L'hydrolysats déminéralisé et neutre est ensuite soumis à une chromatographie sur silice² en vue de la séparation des acides aminés et des peptides basiques. Initialement, ne disposant pas de la technique de déminéralisation, nous avons utilisé des colonnes de 35 g de silice pour 100 mg de

TABLEAU I

LYSOZYME

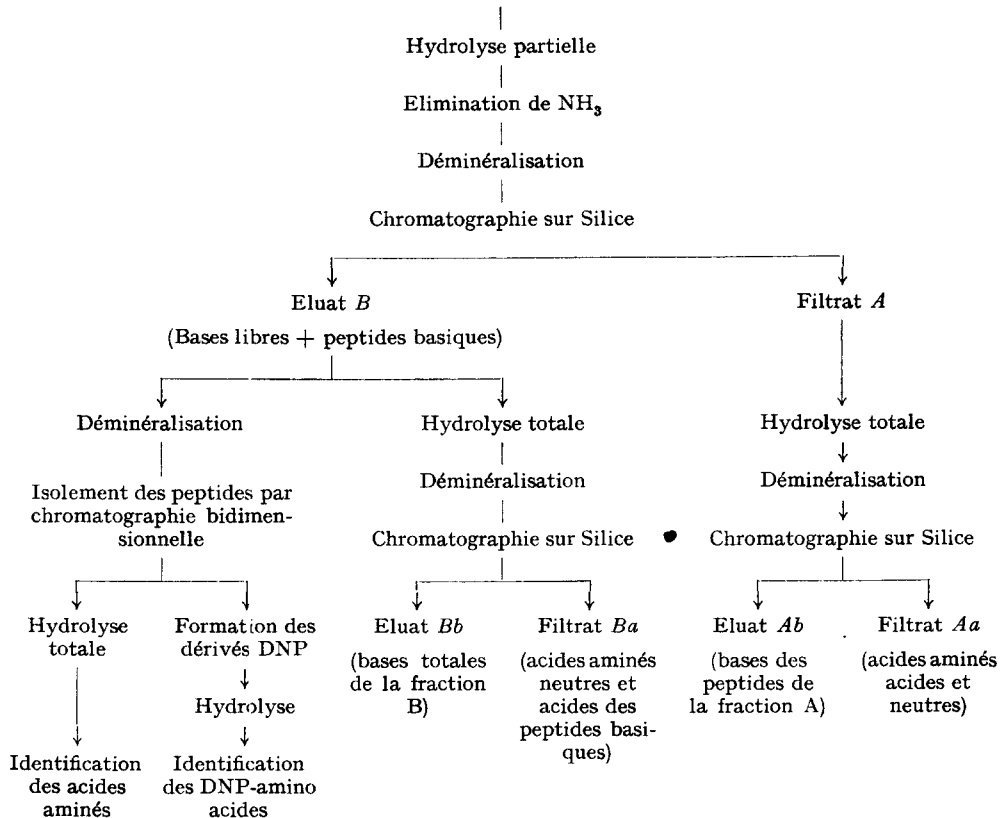
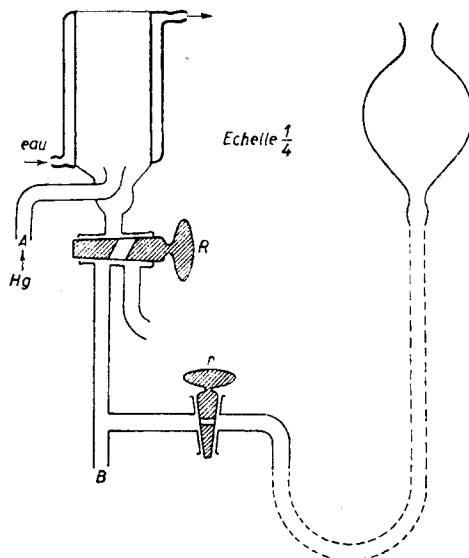


Fig. 1. Dispositif de récupération de l'appareil à déminéraliser*.

Des pinces à vis, placées en A et B, permettent d'isoler la cuve du circuit de Hg. Le robinet r est alors ouvert et le Hg amené par abaissement de la poire jusqu'au niveau du robinet R; r est fermé et la solution récupérée par la deuxième voie de R. La manière dont le mercure arrive dans la cuvette à électrolyse est telle que la surface du mercure s'y trouve rapidement renouvelée, sans former de tourbillons. Ainsi se trouve évitée l'existence d'une zone alcaline chaude, susceptible de provoquer des décompositions importantes dans les corps en solution.

* Cet appareil a été réalisé au laboratoire avec le concours de R. ESCANDE que nous sommes heureux de remercier ici.



protéine afin de compenser l'action éluante des sels². L'introduction du dessalage nous a permis de réduire la quantité de silice à 6 g pour 100 mg de protéine ainsi que les volumes des liqueurs de lavage: la durée de l'opération s'est trouvée diminuée de même que le risque de rétention de peptides non basiques par adsorption vraie. Cette rétention accidentelle, déjà observée pour les acides aminés neutres, adsorbés partiellement sur une colonne de 35 g de silice et en absence des sels² a été parfois constatée par nous avec les peptides neutres, surtout dans le cas des colonnes de 35 g.

L'hydrolysats est versé sur une colonne de 18 mm de diamètre contenant 6 g de silice dont le p_H a été préalablement amené à 5.5-6.0 par lavage à l'eau. On élimine la fraction neutre et la fraction acide en lavant la colonne avec 120 ml d'eau, et l'on élue les bases et les peptides basiques adsorbés par 90 ml d'HCl 0.1 N. L'étude ultérieure des peptides basiques ainsi adsorbés sur la silice nous a permis de constater que l'acide aminé initial de ces peptides est une base. L'hydrolysats se trouve ainsi fractionné en deux parties: le filtrat *A* contenant les acides aminés, les peptides neutres et acides, et des peptides, qui tout en contenant des bases, ont un caractère neutre ou acide par compensation, les bases se trouvant en position autre qu'en position initiale, et l'éluat *B* renfermant les bases hexoniques libres et les peptides basiques où la base, lysine ou arginine, se trouve en position initiale.

Les dosages de l'azote total, des acides aminés libres totaux⁵ et des groupements aminés libres selon VAN SLYKE-NEILL effectués sur chacune de ces deux fractions ont donné les résultats du Tableau II. Les chiffres obtenus montrent notamment que les bases hexoniques à l'état libre dans l'éluat *B* représentent environ un tiers des bases hexoniques totales.

TABLEAU II

RÉPARTITION DE L'AZOTE DANS LE FILTRAT *A* ET DANS L'ÉLUAT *B*

Moyenne des valeurs obtenues avec plusieurs hydrolysats différents. Résultats exprimés en mg de N pour 100 mg de lysozyme. La chromatographie a été précédée de l'élimination de NH_3 (1.8 mg N).

Forme d'Azote	Filtrat <i>A</i>	Eluat <i>B</i>
Azote total	10.54 \pm 0.30	6.36 \pm 0.30
Azote- NH_2	5.76	1.97 \pm 0.08
Azote-ninhydrine	3.79	0.65 \pm 0.10

Le filtrat *A* d'une part et l'éluat *B* d'autre part sont soumis à une hydrolyse totale suivie d'une dessalification puis d'une nouvelle chromatographie sur silice. Les dosages spécifiques de l'arginine et de l'histidine dans les éluats *Ab* et *Bb* de ces chromatographies ont permis de déterminer la teneur de chacune des fractions en arginine et en histidine. Les Tableaux III et IV indiquent la répartition des bases libres et combinées dans le filtrat *A* et dans l'éluat *B* de l'hydrolysats partiel initial.

L'examen des Tableaux III et IV montre que 81% de l'azote des bases se trouve dans l'éluat *B*: 34% sous forme de bases libres et 47% sous forme de bases combinées. 19% de l'azote basique est contenu dans le filtrat *A*, et ce uniquement sous forme de peptides.

Pour isoler les peptides de l'éluat *B*, celui-ci est évaporé plusieurs fois sous vide à 40° pour chasser HCl. Les dernières traces de substances minérales sont finalement éliminées dans l'appareil à dessalification. La solution est ensuite filtrée et amenée à sec; on reprend le résidu par l'eau de façon à avoir une concentration finale comprise entre 13 et 20 mg d'azote total par ml. La séparation des peptides s'effectue alors par chro-

TABLEAU III

RÉPARTITION DES BASES LIBRES ET COMBINÉES DANS LE FILTRAT A ET L'ÉLUAT B

		Pour cent du lysozyme	Pour cent des bases totales du lysozyme
1	Azote total des bases combinées dans A	1.28	20.4
2	Azote total des bases libres + bases combinées dans B	5.16	80.9
3	Azote-ninhydrine des bases libres dans B	0.64	34.4
4	Bases combinées dans B (2-3)	—	46.5

TABLEAU IV

RÉPARTITION DE L'ARGININE ET DE L'HISTIDINE, LIBRES ET COMBINÉES,
DÉTERMINÉES PAR DOSAGES SPÉCIFIQUES

Chiffres exprimés en pour cent de la valeur totale de chaque base.

	Filtrat A	Eluat B
Arginine	24.2	76.3
Histidine	22.1	79.5

matographie à deux dimensions sur papier, selon la technique de CONSDEN *et al.*⁴ On utilise dans tous les cas le papier Whatman No 1.

On dépose sur le papier 30 μ l de la solution, en quatre fois, en ayant soin de laisser sécher la gouttelette entre deux prises successives. On utilise le mélange *n*-butanol 75 + acide formique 15 + eau 10, en présence de HCN, pour la première dimension, et le mélange phénol saturé d'eau en présence de NH_3 , pour la seconde, l'opération complète durant 48 heures. L'élimination des solvants est faite par courant d'air chaud suivi, dans le cas du phénol, d'un passage de 3 minutes au four à 90°. Pour déterminer les emplacements des peptides, un chromatogramme témoin est révélé par une solution de ninhydrine à 0.2% dans le butanol contenant 1% d'acide acétique. D'autres chromatogrammes, développés dans des conditions semblables, sont révélés par une solution de ninhydrine à 0.025% pour localiser exactement sans les détruire, les peptides dont le nombre et les positions approximatives sont connus d'après le chromatogramme témoin. Le schéma de l'un des chromatogrammes témoins est présenté, à titre d'exemple, par la Fig. 2. On peut remarquer ici que dans le phénol la dispersion des peptides basiques se fait sur tout le parcours du solvant, alors que le mélange butanol-acide formique ne possède vis à vis de ces peptides qu'un pouvoir de résolution assez faible; ce phénomène correspond au comportement des bases libres qui ne se déplacent elles-mêmes que très peu dans ce dernier solvant.

Les taches décelées par la ninhydrine à faible concentration sont découpées et les peptides sont élués par l'eau, les éluats étant reçus dans de petits tubes où se feront toutes les opérations ultérieures. Ces éluats sont évaporés à sec dans un dessiccateur sous vide. L'hydrolyse des peptides ainsi séparés est faite par trois gouttes de HCl 6 N dans les tubes scellés et maintenus 24 heures à 110°. Après hydrolyse, l'excès de HCl est éliminé sous vide, les hydrolysats sont repris par quelques μ l d'eau et sont placés sur le papier. On rince plusieurs fois les tubes avec un très petit volume d'eau en laissant chaque fois sécher la gouttelette précédente sur le chromatogramme. L'identification

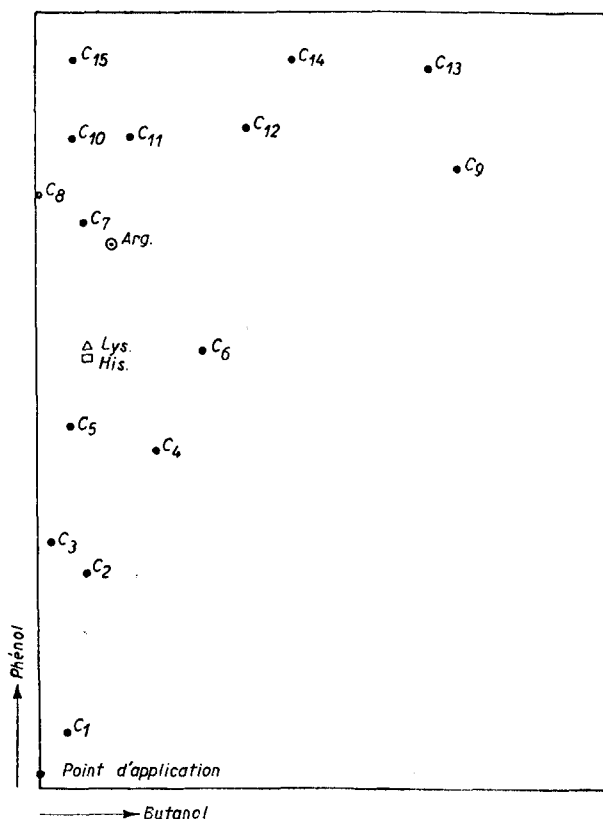


Fig. 2. Chromatogramme représentant les séparations des peptides de la fraction B obtenue par hydrolyse partielle

μ l d'acétone à 50% et identifiés par chromatographie sur papier⁸. Tous les peptides ainsi isolés de l'éluat B de la silice se sont montrés posséder soit l'arginine soit la lysine en tête de chaîne.

Les opérations qui viennent d'être décrites ont porté sur trois hydrolysats différents obtenus dans des conditions apparemment semblables; malgré cela, les produits isolés se sont montrés généralement différents d'un hydrolysat à l'autre; nous discutons plus loin les causes possibles de ce phénomène. Les peptides résultant des divers hydrolysats sont, dans le Tableau V, respectivement groupés sous les lettres A, B et C. Dans le cas des peptides isolés à partir de l'hydrolysat C, nous avons étudié également la composition quantitative de ces peptides* en leurs acides aminés, en utilisant la technique de chromatographie quantitative sur papier, proposée par POLSON, MOSLEY ET WYCKOFF⁹. Nous avons pu ainsi constater que sauf dans le cas du peptide C₁₀ contenant 2 résidus d'alanine, tous les autres peptides du groupe C ne renferment qu'un résidu de chaque acide aminé. D'autre part, dans les peptides A₆ et B₅, nous avons pu démontrer l'existence de DNP- ϵ -lysine qui constitue un résidu supplémentaire de cet acide aminé. Les Tableaux V et VI indiquent la base se trouvant en tête de chacun des peptides isolés, ainsi que la nature des autres acides aminés que ces peptides contiennent.

* à l'exclusion des peptides C₁₃ et C₁₄.

des acides aminés fournis par chaque peptide est faite à l'aide de mélanges témoins chromatographiés sur papier dans les mêmes conditions.

D'autre part, sur des échantillons des mêmes peptides, avant leur hydrolyse, on détermine l'acide aminé initial par la méthode de SANGER⁷. Les peptides élués du papier et amenés à sec, sont repris par 3 gouttes d'une solution aqueuse de CO₃NaH à 1%; on ajoute 3 gouttes d'une solution de dinitro-fluoro-benzène (DNFB) à 4% dans l'alcool à 95°, et on agite 2 heures. L'eau et l'alcool sont ensuite évaporés dans un dessiccateur sous vide; l'excès de DNFB est éliminé par épuisement au moyen de quelques gouttes d'éther, l'opération étant répétée deux fois. Puis les tubes reçoivent chacun 3 gouttes de HCl 6 N, sont scellés et maintenus 5 heures à l'étuve à 110°. Les DNP-aminoacides libérés par hydrolyse sont repris par quelques

TABLEAU V
COMPOSITION DES ARGINYL-PEPTIDES IDENTIFIÉS DANS L'ÉLUAT B
CyS = Cystine

A ₃ , B ₂ , C ₃ C ₄	CyS Asp
C ₁ B ₃ A ₇ , B ₄ C ₈ C ₁₁ A ₉	CyS Asp CyS Ser Ser Glu Ser Gly Ser Al Gly Thr
A ₁ B ₆ A ₄	CyS Ser Glu Gly Asp Ser Gly Thr Ser Glu Gly Thr
B ₁₂	Asp Ser Glu Gly Ala Val, Leu, Phé, Lys.

TABLEAU VI
COMPOSITION DES LYSYL-PEPTIDES IDENTIFIÉS DANS L'ÉLUAT B

A ₂ , B ₁ C ₂	Asp Gly
B ₈ A ₁₁ , C ₅	Asp Gly Gly Arg
A ₁₂ B ₁₀ A ₁₀ , C ₁₅ C ₆ C ₁₄	Asp Gly Arg Asp Arg Ser Asp Arg Glu Gly Arg Glu Gly Arg Thr
B ₇ , B ₉ A ₂ , A ₅ A ₁₃ C ₉ B ₁₁ , C ₇ B ₅	Asp Gly Arg Ser Asp Gly Ser Glu Asp Ser Glu Ala Gly Arg Ser Thr Gly Arg Ser Ala Gly Arg Ser Lys
A ₆ C ₁₀	Gly Arg Ser Glu Lys Gly Arg Ser Ala ₂
B ₁₃ C ₁₃ C ₁₄	Asp Gly Arg Ser Glu Ala Val, Leu, Phé. Gly Arg Glu Thr Ala Val, Leu, Phé. Gly Arg Ser Ala Val, Leu, Phé, Tyr.

Il convient de remarquer que l'histidine n'existant qu'en très faible quantité dans le lysozyme, et se révélant en outre mal par la ninhydrine, les histidyl-peptides éventuellement présents n'ont pu être décelés par les méthodes utilisées ici.

DISCUSSION

Les peptides isolés dans la fraction basique, et qui sont soit des arginyl-, soit des lysyl-peptides, ne contiennent, pour la plupart, que deux à six acides aminés. En ne considérant que ces peptides relativement simples, on constate que dans leur ensemble, ils ne renferment qu'un nombre limité d'espèces d'acides aminés: pour 28 peptides en effet, on ne trouve, en plus des bases, que 7 espèces différentes d'acides aminés; en particulier, on n'y rencontre ni les leucines, ni la valine, pourtant relativement abondantes dans le lysozyme, et dont on sait que dans cette protéine¹ comme dans d'autres, elles participent à des liaisons peptidiques particulièrement résistantes. En revanche, ces peptides contiennent des acides aminés qui, comme la sérine et la thréonine, forment des liaisons peptidiques fragiles. On est ainsi conduit à admettre que les peptides contenant les leucines et la valine sont détachés de telle sorte ou bien qu'ils n'entraînent avec eux aucune base, ou bien que si ils en contiennent une, cette base se trouve en une position telle qu'elle ne confère aux peptides aucune aptitude à être retenus par la silice; ce dernier cas est celui des peptides contenant des bases, et que l'on retrouve dans le filtrat initial (Tableau III).

En ce qui concerne les indications que l'on peut avoir sur la structure du lysozyme, il est permis déjà d'affirmer que cette protéine contient les enchaînements arginyl-cystine, arginyl-ac. aspartique, lysyl-ac. aspartique et lysyl-glycocolle. Mais, étant donné qu'il existe respectivement 11 et 6 résidus d'arginine et de lysine dans une molécule de lysozyme, il est encore impossible de connaître avec certitude l'ordre des acides aminés dans les peptides isolés, autres que les dipeptides. On peut remarquer tout au plus que la fréquence de certains acides aminés permet de classer les divers peptides en familles, ce qui tendrait à montrer que parmi les peptides isolés, plusieurs d'entre eux dérivent les uns des autres par suite de fragmentations successives.

RÉSUMÉ

La fraction basique de l'hydrolysate partiel du lysozyme (HCl 10 N, 37°, 8 jours) a été séparée par adsorption sur silice. Divers dosages (N "Kjeldahl", N "NH₃" et N "ninhydrine") faits sur l'éluat et sur le filtrat, montrent la constance de la composition globale de ces fractions obtenues dans différents essais effectués dans les mêmes conditions. L'éluat et le filtrat contiennent respectivement 80% des bases à l'état libre et combiné, et 20% des bases à l'état combiné.

Les peptides basiques de l'éluat (fraction adsorbée) ont été isolés par chromatographie à deux dimensions sur papier. L'étude de leurs dérivés DNP a montré qu'ils possèdent une base (arginine ou lysine) en tête de chaîne, ce qui confirme la spécificité de la silice dans l'isolement de certains groupes de substances basiques. Après hydrolyse totale, les acides aminés constituant chacun de ces peptides ont été identifiés. On a pu remarquer ainsi que:

1. On ne retrouve pas toujours tous les mêmes peptides au cours d'essais réalisés dans des conditions apparemment identiques, ce qui montre que la scission de la chaîne polypeptidique peut être sensiblement influencée par des changements imperceptibles de ces conditions.

2. Dans tous les cas étudiés, on obtient surtout des tri-, des tétra- et des penta-peptides, à côté de quelques peptides plus longs (9 résidus et plus).

3. Dans les peptides courts (di- à hexa-peptides), sept aminoacides: glycine, sérine, acide aspartique, acide glutamique thréonine, cystine, alanine, ont été identifiés en plus des bases alors que les peptides longs semblent contenir à peu près tous les acides aminés du lysozyme.

SUMMARY

The basic fraction of the partial hydrolysate of the lysozyme (10 N HCl, 37° C, 8 days) has been separated by adsorption on silica. Different determinations (N "Kjeldahl", N "NH₂", and N "ninhydrin") made on the eluate and on the filtrate, show the constancy of the general composition of these fractions obtained by several experiments but under the same conditions. The eluate and the filtrate contain respectively, 80 % free and combined bases, and 20 % combined bases. The basic peptides of the eluate (adsorbed fraction) have been isolated by two-dimensional paper chromatography. The study of their DNP derivatives has shown that they possess a base (arginine or lysine) at the beginning of the chain, which confirms the specificity of the silica in the isolating of certain groups of basic substances. After total hydrolysis the amino acids constituting each of these peptides have been identified. The following observations have been made.

1. The same peptides are not always obtained by methods carried out under apparently identical conditions, which shows that the breaking of the polypeptide chain can be influenced by imperceptible changes of conditions.

2. In all the cases studied, some tri-, tetra- and penta-peptides are obtained, together with some longer peptides (9 or more residues).

3. In the short peptides (di- to hexa-peptides) seven amino acids *viz.*, glycine, serine, aspartic acid, glutamic acid, threonine, cystine, and alanine, have been identified as well as the bases, while the long peptides seem to contain nearly all the amino acids of lysozyme.

ZUSAMMENFASSUNG

Die basische Fraktion des partiellen Hydrolysates von Lysozym (HCl 10 N, 37°, 8 Tage) wurde durch Adsorption an Silicagel getrennt. Verschiedene Bestimmungen ("Kjeldahl" N, "NH₂" N, "Ninhydrin" N), welche im Eluat und im Filtrat ausgeführt wurden, zeigten die Konstanz der Gesamtzusammensetzung dieser Fraktionen, welche aus verschiedenen, unter denselben Bedingungen ausgeführten Versuchen stammten. Das Eluat und das Filtrat enthalten respektive 80% der Basen (teilweise frei und teilweise gebunden) und 20% der Basen (gebunden).

Die basischen Peptide des Eluates wurden durch zweidimensionale Chromatographie auf Papier isoliert. Die Untersuchung ihrer DNP-Derivate hat ergeben, dass sie eine Base (Arginin, oder Lysin) am Beginn der Kette besitzen; dies bestätigt die spezifischen Eigenschaften des Silicagels bei der Isolierung gewisser Gruppen von basischen Substanzen. Nach vollständiger Hydrolyse wurden die Aminosäuren, aus denen jedes einzelne dieser Peptide zusammengesetzt ist, identifiziert.

Hierbei wurden die folgenden Beobachtungen gemacht:

1. Man findet nicht immer dieselben Peptide bei Versuchen, die scheinbar unter identischen Bedingungen ausgeführt worden waren; die Spaltung der Polypeptidkette kann also merklich durch nicht kontrollierbare Veränderungen dieser Bedingungen beeinflusst werden.

2. In allen untersuchten Fällen erhält man hauptsächlich Tri-, Tetra- und Pentapeptide, neben einigen längeren Peptiden (mit 9 und mehr Resten).

3. In den kurzen Peptiden (Di- bis Hexapeptide) wurden ausser den Basen, sieben Aminosäuren identifiziert, nämlich Glycin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Cystin, Alanin, während die langkettigen Peptide ungefähr alle Aminosäuren des Lysozyms zu enthalten scheinen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 493.
- ² C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ³ H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- ⁴ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ⁵ D. D. VAN SLYKE, D. A. MACFAYDEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- ⁶ W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 103.
- ⁷ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ⁸ R. MONIER ET L. PÉNASSE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1176.
- ⁹ A. POLSON, V. M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1947) 603.

Reçu le 21 juin 1951