

SUR LA STRUCTURE DU LYSOZYME.
QUELQUES PEPTIDES DE L'HISTIDINE ET DE LA TYROSINE
RÉSULTANT D'UNE HYDROLYSE MÉNAGÉE*

par

R. ACHER, J. THAUREAUX, C. CROCKER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT

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

Les peptides de l'histidine et de la tyrosine fournis par hydrolyse partielle du lysozyme sont particulièrement intéressants pour l'étude de la structure de cette protéine: en effet, elle ne renferme que un et trois résidus, respectivement, de ces acides aminés par molécule¹; en outre, le caractère basique de l'un et le caractère aromatique de l'autre, ainsi que leur aptitude à donner des réactions colorées sensibles et spécifiques, réalisables après chromatographie sur papier, facilite l'étude de leurs peptides.

Peptides de l'histidine. Le lysozyme cristallisé est hydrolysé pendant 8 jours à 37° avec HCl 11.2 N². On prélève avant tout fractionnement une goutte de l'hydrolysate que l'on chromatographie sur papier (Whatman n° 1; solvant I: *n*-butanol 75 + acide formique 15 + eau 10) et on révèle par le réactif de PAULY modifié³. On distingue trois taches H₁, H₂, H₃, par ordre de R_F croissants. L'hydrolysate, débarrassé de l'ammoniac et des sels, est passé sur une colonne de silice pour retenir les peptides basiques⁴; la totalité de H₁ et de H₂ et la majeure partie de H₃ sont retenues sur la silice. La séparation complète de H₁ et H₂ d'une part et de H₃ d'autre part est effectuée par l'amberlite IRC 50; la séparation de H₁ de H₂ est faite par chromatographies sur papier dans différents solvants (solvant I: solvant II: pyridine 60 + collidine 20 + eau 20; solvant III: phénol saturé d'eau + 0.1% ammoniac; solvant IV: phénol saturé par une solution tampon formiate d'ammonium 0.05 M à pH 4.1). La pureté des produits isolés est contrôlée par chromatographies sur papier dans trois solvants (solvant I; solvant II; solvant V: phénol saturé par une solution tampon phosphate-citrate 0.067 M à pH 4.0⁵) puis par électrophorèse sur papier à pH 4.0 et à pH 8.6. Le comportement de H₃ au cours de tous ces essais est identique à celui de l'histidine libre. H₁ et H₂, purifiés, sont hydrolysés 20 heures en tubes scellés, à 110°. La composition qualitative établie dans trois solvants (I, II et V), dont deux séparent parfaitement les bases (II et V), est pour H₁: Arg., His., Lys., et pour H₂: Arg., His. Des dosages colorimétriques de l'arginine⁶ et de l'histidine⁷ ont établi que H₁ et H₂ contiennent respectivement 1.2 et 0.95 résidus d'arginine pour 1.0 d'histidine; la comparaison avec une gamme chromatographiée parallèlement⁸ permet de constater que la lysine existe en proportion 1:1 par rapport à l'histidine.

La structure de ces peptides a été déterminée à l'aide du 2,4 dinitrofluorobenzène⁹. La DNP-arginine et l'imidazol-DNP histidine ayant été identifiées par chromatographie sur papier dans le cas de H₂, ce peptide est donc l'*arginyl-histidine*. La DNP-arginine, l'imidazol-DNP histidine et l' ϵ -DNP lysine ayant été identifiés d'une façon analogue dans le cas de H₁, en tenant compte du résultat précédent, ce peptide est l'*arginyl-histidyl-lysine*.

Une étude quantitative de ces peptides a montré qu'après 8 jours d'hydrolyse 49% de l'histidine totale du lysozyme se trouvent à l'état libre, 30% à l'état d'arginyl-histidine et 12% à l'état d'arginyl-histidyl-lysine. Ce bilan de 91%, corrigé d'un facteur expérimental de 13% correspondant aux pertes au cours des séparations précédant les dosages, permet d'affirmer qu'il n'existe pas d'enchaînement différent dans le lysozyme, et que cette protéine est bien homogène, au moins dans cette partie de la molécule.

Peptides de la tyrosine. Le filtrat de la silice est d'abord passé sur alumine retenir les peptides acides, puis le filtrat de l'alumine est passé sur charbon pour retenir les peptides neutres aromatiques¹⁰. Les peptides neutres de la tyrosine, après élution, sont purifiés par chromatographies sur papier dans les solvants I et II, en se basant sur la coloration rose spécifique que donne la tyrosine avec l' α -nitroso- β -naphthol. L'étude de la composition et de la structure, puis la comparaison avec les peptides synthétiques par chromatographies sur papier dans trois solvants (I, II et V) permettent d'affirmer que les enchaînements *glycyl-tyrosine* et *tyrosyl-glycine* sont présents dans la molécule du lysozyme. Une étude générale des peptides de la tyrosine est actuellement en cours.

* Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apportée à l'exécution de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 509.
- ² R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 493.
- ³ F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
- ⁴ R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 442.
- ⁵ E. F. MCFARREN, *Analyt. Chem.*, 23 (1951) 168.
- ⁶ S. SAKAGUCHI, *Japan. Med. J.*, 1 (1948) 278.
- ⁷ H. T. MCPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- ⁸ A. POLSON, V. M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1947) 603.
- ⁹ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ¹⁰ C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.

Reçu le 4 août 1952

TRANSAMINATION ET DÉSULFINATION DE L'ACIDE L-CYSTÉINESULFINIQUE*

par

FERNANDE CHATAGNER, BERNADETTE BERGERET,
THÉRÈSE SÉJOURNÉ ET CLAUDE FROMAGEOT*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

On a vu¹ que le fonctionnement de la désulfurase nécessite la présence d'un facteur organique facilement dialysable existant en particulier abondamment dans des extraits de levure. Aucun coenzyme connu n'avait pu jusqu'ici remplacer ce facteur. Nous avons constaté que l'addition d'acide α -cétoglutarique à une préparation d'enzyme (extrait aqueux de poudre acétonique de foie, précipité par le sulfate d'ammonium à saturation, le précipité étant redissous et dialysé à 4° pendant 24 heures, contre une solution de bicarbonate de sodium à 0.1 %) soigneusement débarrassée du facteur en question et par conséquent inactive, lui rend une activité du même ordre de grandeur que l'activité maximum obtenue par addition d'extrait de levure (Tableau I). L'addition d'acide pyruvique détermine aussi une activité notable, mais toujours inférieure à celle due à l'acide α -cétoglutarique.

TABLEAU I

PRODUCTION DE SO₂ À PARTIR D'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE

Volume total 25 ml; solution phosphate tampon M/30, pH 7.3; Mg. 10⁻³ M; Atmosphère N₂; 35° C; durée 2 heures.

L'addition de pyridoxalphosphate (25 μ g) n'exerce ici aucune influence.

Essai No.	Préparation enzymatique ml	Extrait de levure ml	Ac. α -cétoglutarique μ mol	Ac. pyruvique μ mol	Ac. cystéine-sulfinique μ mol	SO ₂ formé μ mol
I	10	0	0	0	0	0
II	0	9	0	0	250	0
III	10	0	0	0	250	5
IV	10	2	0	0	250	75
V	10	9	0	0	250	96
VI	10	0	25	0	250	51
VII	10	0	250	0	250	80
VIII	10	0	0	250	250	46

* Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apportée à l'exécution de ce travail, ainsi que Dr NISMAN auquel nous devons l'acide α -cétoglutarique.