

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DU LYSOZYME D'OEUF DE POULE. PEPTIDES AROMATIQUES OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

par

ROGER ACHER, ULLA-RIITTA LAURILA ET CLAUDE FROMAGEOT

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

On sait que les acides aminés aromatiques proprement dits ne sont présents dans la molécule du lysozyme d'oeuf de poule qu'en petit nombre: trois résidus de phénylalanine et trois résidus de tyrosine¹. Il est donc intéressant d'isoler et d'étudier les peptides provenant d'hydrolyses partielles de la protéine et contenant ces résidus aromatiques; ces peptides sont alors marqués par les résidus en question. Des notes précédentes ont décrit brièvement quelques peptides contenant de la tyrosine, de la phénylalanine et de la proline obtenus par hydrolyse partielle acide^{2,3,4}. Le présent travail d'une part donne les détails de l'étude de ces peptides, d'autre part fournit des résultats nouveaux obtenus au moyen des hydrolyses chymotrypsique et pepsique du lysozyme. Il apporte, à cette occasion, quelques renseignements complémentaires sur la spécificité des protéases utilisées.

Il convient de rappeler ici que la molécule de lysozyme renferme huit résidus de tryptophane¹: étant donné la fragilité de cet acide aminé, son absence dans les enchaînements établis a fait l'objet d'un contrôle rigoureux.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes

Dégradation de la protéine

Le lysozyme utilisé est du carbonate de lysozyme d'oeuf de poule cristallisé (Armour Laboratories, Chicago, Ill.).

Hydrolyse partielle acide. L'hydrolyse du lysozyme est effectuée au moyen de l'acide chlorhydrique concentré dans les conditions décrites antérieurement (HCl 11.2 N; 37°; 4 jours)⁴.

Hydrolyse chymotrypsique. Le lysozyme "natif" étant difficilement attaqué par les enzymes protéolytiques⁵, la protéine est au préalable dénaturée: 500 mg de carbonate de lysozyme dissous dans 10 ml d'eau sont chauffés en tube scellé, 1 heure à 105°. On ajoute à la solution précédente 5 mg de chymotrypsine cristallisée Worthington, on ajuste le pH à 7.6 par addition d'ammoniaque 0.01 N (environ 10 ml), et on porte le volume à 25 ml avec de l'eau de façon à avoir une concentration finale de 2% en carbonate de lysozyme. La solution est maintenue à 37° pendant 18 heures, puis la chymotrypsine est inactivée en plaçant le récipient au bain-marie bouillant pendant 5 minutes.

Hydrolyse pepsique. Le lysozyme est préalablement dénaturé comme il vient d'être dit; à 500 mg de carbonate de lysozyme, dissous dans 10 ml d'eau, on ajoute 10 mg de pepsine cristallisée Worthington et on ajuste le pH à 3 avec de l'acide acétique à 20%. Le volume est alors porté à 25 ml (concentration finale de 2% en carbonate de lysozyme) et la solution est placée à 37° pendant

Bibliographie p. 109.

24 heures. On inactive la pepsine en chauffant 5 minutes au bain-marie bouillant. Le pH est alors amené à 7 avec de l'ammoniaque concentrée.

Isolement des peptides

Précipitation par l'alcool. Cette opération est effectuée seulement dans le cas des hydrolysats enzymatiques; les grands peptides et éventuellement la protéine non attaquée sont éliminés par précipitation par l'alcool à 70% de la façon suivante: à l'hydrolysat à pH 7 (concentration en protéine initiale de 2%), on ajoute 3 volumes d'alcool à 95% et on laisse une nuit en glacière. Le précipité est séparé par centrifugation et lavé trois fois avec de l'alcool à 70%; le liquide surnageant et les solutions de lavage sont réunis. La solution finale est évaporée à sec à 40° sous vide et le résidu soumis à la chromatographie sur charbon.

Chromatographie sur charbon. Les peptides aromatiques sont séparés par adsorption sur charbon. La séparation des peptides aromatiques provenant des hydrolysats acides a été antérieurement décrite⁴. La fraction soluble dans l'alcool des hydrolysats enzymatiques (500 mg de protéine initiale) est passée sur une colonne (2 × 1 cm) de charbon (1 g d'Activit 50 X P*). Les opérations d'adsorption et d'élution se font ici de la façon suivante: le charbon lavé au préalable avec de l'acide acétique à 20% bouillant est lavé une deuxième fois sur la colonne avec de l'eau (60 ml) puis de l'acide acétique à 5% (30 ml), les liquides étant saturés de SH₂. La solution des peptides dans l'acide acétique à 5% (20 ml) est alors passée sur la colonne et les peptides non fixés sont entraînés par un lavage avec de l'acide acétique à 5% (50 ml). L'élution des peptides retenus est effectuée par un mélange (100 ml) constitué d'acide acétique, d'acétate d'éthyle et d'eau (20:15:65).

Ionophorèse. Les peptides aromatiques sont séparés en peptides acides, neutres et basiques en utilisant un appareil d'ionophorèse à 4 compartiments du type décrit par SYNGE⁶ suivant le procédé de SANGER ET TUPPY⁷; le pH de la solution des peptides est maintenu à 6 pendant l'opération. Les solutions des compartiments préanodique (peptides acides), central (peptides neutres) et cathodique (peptides basiques) sont recueillies et évaporées à sec.

Chromatographie sur papier. Les peptides de chaque fraction sont purifiés par plusieurs chromatographies monodimensionnelles sur papier Whatman No. 1. Les solvants sont les mélanges: I: *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10); II: pyridine-collidine-eau (60:20:20); III: phénol-eau (80:20); IV: phénol et butanol tamponnés à pH 4 ou à pH 10 suivant MCFARREN⁸.

Les peptides sont révélés sur des bandes témoins par la ninhydrine. La présence de certains acides aminés dans les peptides est décelée au moyen de réactions spécifiques concernant respectivement l'arginine⁹, la tyrosine⁹, la méthionine¹⁰ et le tryptophane¹¹. Après une première chromatographie dans le solvant I, les peptides sont élués du papier et purifiés dans le solvant II ou le solvant III, puis éventuellement dans un troisième solvant. Un peptide est considéré comme pur lorsqu'il ne donne qu'une seule tache après chromatographie dans trois solvants différents.

Structure des peptides

La composition en acides aminés des peptides est établie après hydrolyse totale en tube scellé au moyen de l'acide chlorhydrique 6 N, 20 heures à 105°. Les acides aminés constituants sont identifiés par chromatographie sur papier, en présence de témoins, successivement avec le solvant I puis avec le phénol tamponné à pH 10. La séparation des leucines est effectuée dans le butanol à pH 4, celle de la lysine et de l'histidine dans le phénol à pH 4⁸. Il convient de souligner ici que au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique des éluats du papier, la tyrosine est partiellement détruite et la méthionine l'est complètement. Pour étudier les peptides contenant la méthionine, on a transformé celle-ci en méthionine sulfone par oxydation performique¹². D'autre part, en ce qui concerne le tryptophane, également détruit par hydrolyse acide, cet acide aminé a été recherché soit après hydrolyse des peptides par la baryte (solution saturée de baryte, à 105°, pendant 48 heures), soit directement sur les peptides intacts à l'aide du réactif d'Ehrlich¹¹. La composition quantitative des peptides est établie en comparant les taches fournies par l'hydrolysats à celles de gammes d'acides aminés en proportions croissantes selon POLSON, MOSLEY ET WYCKOFF¹³.

Acides aminés N-terminaux. Les acides aminés N-terminaux des peptides ont été déterminés par désamination à l'aide des vapeurs nitreuses selon CONSDEN *et al*¹⁴, par réaction avec le dinitrofluorobenzène selon SANGER ET THOMPSON¹⁵ et par réaction avec le phénylisothoniocyanate selon EDMAN^{16,17}. Les dinitrophényl-aminoacides (DNP aminoacides) ont été identifiés par chromatographie sur papier en utilisant comme solvant soit le mélange phénol-alcool isoamylique suivant BISERTE ET OSTEUX¹⁸, soit un tampon citrate à pH 6.2 suivant ROVERY ET FABRE¹⁹. La technique d'Edman a été mise en oeuvre sur des microquantités de la façon suivante: le peptide (0.5 à 1 μ M) dissous dans une solution de triméthylamine (0.1 ml de triméthylamine à 5%) est laissé deux heures en contact avec le phénylisothoniocyanate (0.1 ml de phénylisothoniocyanate à 1% dans la pyridine contenant 0.3% de bleu de bromothymol), la température étant de 37°. On vérifie que la solution reste alcaline pendant l'opération, puis on extrait l'excès de réactif avec du benzène

* Cie Activit, 66, rue d'Auteuil, Paris XVIème.

(3 fois avec 0.2 ml). On évapore ensuite à sec et le phénylthiocarbamyl-peptide (PTC-peptide) est repris par 0.1 ml d'un mélange constitué d'une partie d'acide chlorhydrique concentré et de 5 parties d'acide acétique glacial¹⁷. On laisse 30 minutes à 37°. Le PTC-peptide est scindé spécifiquement en la phénylthiohydantoïne de l'acide aminé N-terminal (PTH aminoacide) qui est extraite à l'éther et le reste de la chaîne intacte qui demeure en phase aqueuse. L'hydrolyse barytique du PTH aminoacide (baryte saturée, 48 heures, 140°) permet la régénération de l'acide aminé et son identification.

Acides aminés C-terminaux. Les acides aminés C-terminaux ont été déterminés au moyen de la carboxypeptidase (Worthington) avec les précautions habituelles. On laisse agir l'enzyme (0.01 ml d'une solution saturée dans C1Na M) sur le peptide (0.5 μ M dans 0.1 ml d'eau) pendant une durée variant de 5 minutes à 24 heures, le pH étant amené à 7.5 avec de la triméthylamine et la température étant maintenue à 37°. Le ou les acides aminés détachés sont identifiés par chromatographie sur papier.

Résultats

Peptides provenant de l'hydrolysat chlorhydrique

Les peptides aromatiques sont séparés par adsorption sur charbon et fractionnés en peptides acides, neutres et basiques (*A*, *N*, *B*) par ionophorèse. Chaque fraction est chromatographiée sur papier en utilisant le mélange I. On hydrolyse tous les peptides fournis par cette première chromatographie et on ne conserve que ceux renfermant de la phénylalanine ou de la tyrosine. Ces peptides sont purifiés par une deuxième chromatographie sur papier dans le mélange II. Le peptide basique *B*₁ donnant une traînée dans ce mélange, le phénol tamponné à pH 4 a été utilisé comme deuxième solvant. Pour éliminer les sels provenant de ce solvant, le peptide a été adsorbé sur une microcolonne de charbon et élué comme décrit antérieurement. Dans le cas des

Acides aminés	Peptides acides			Peptide basique	Peptides neutres		
	Phé Asp	Phé Glu	Sér Phé Asp	Lys Val Phé	Val Phé	Leu Pro	Thr Pro
	(A ₁)	(A ₂)	(A ₃)	(B ₁)	(N ₁)	(F ₁)	(F ₂)
(CyS) ₂							
Lys							
His							
Arg							
Sér							
Gly							
Asp							
Glu							
Thr							
Ala							
Pro							
Tyr							
Val							
Phé							
Leu							
Ileu							

Fig. 1. Emplacements dans le mélange butanol - acide formique des peptides isolés après hydrolyse acide.

Acides aminés	Peptides acides			Peptide basique	Peptides neutres		
	Phé Asp	Phé Glu	Sér Phé Asp	Lys Val Phé	Val Phe	Leu Pro	Thr Pro
	(A ₁)	(A ₂)	(A ₃)	(B ₁)	(N ₁)	(F ₁)	(F ₂)
(CyS) ₂							
Arg							
Lys							
Asp							
Glu							
Sér							
Gly							
Ala							
Pro							
Val							
Phé							
Leu							
Tyr							

Fig. 2. Emplacements dans le mélange collidine - pyridine des peptides isolés après hydrolyse acide.

peptides A_1 et A_2 , une troisième chromatographie préparative sur papier dans le phénol tamponné à pH 4 a été nécessaire pour les séparer l'un de l'autre.

Dans le filtrat du charbon, deux peptides de la proline ont été directement purifiés par chromatographie sur papier: ce sont les peptides F_1 (un seul solvant: solvant I) et F_2 (trois solvants: solvants I, II et III). Les figures 1 et 2 indiquent les emplacements des peptides dans les solvants ayant servi à la purification. La pureté des peptides isolés après chromatographie dans les solvants I et II est toujours vérifiée par chromatographie dans le phénol tamponné à pH 4.

La composition et la structure des peptides ont été déterminées par les méthodes décrites. Le Tableau I résume les résultats obtenus.

TABLEAU I
STRUCTURE DES PEPTIDES DE LA PHÉNYLALANINE ET DE LA PROLINE
ISOLÉS APRES HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

Composition	Acide aminé N-terminal		Acide aminé C-terminal Carboxypeptidase	Structure
	Désamination	DNFB		
A_1 = (Phé, Asp)	Phé	Phé	—	Phé·Asp
A_2 = (Phé, Glu)	Phé	Phé	—	Phé·Glu
A_3 = (Phé, Asp, Sér)	Sér	Sér	Asp	Sér·Phé·Asp
B_1 = (Phé, Lys, Val)	—	Lys	Phé	Lys·Val·Phé
N_1 = (Phé, Val)	Val	Val	—	Val·Phé
F_1 = (Pro, Leu)	Leu	—	—	Leu·Pro
F_2 = (Pro, Thr)	Thr	—	—	Thr·Pro

En utilisant des procédés de purification et d'analyse identiques, des peptides de la tyrosine: Asp·Arg, Tyr·Arg, Asp·Tyr·Arg, Gly·Tyr et Tyr·Gly ont été caractérisés dans les hydrolysats acides du lysozyme²⁰.

Peptides provenant de l'hydrolysat chymotrypsique

La purification des peptides aromatiques de l'hydrolysat chymotrypsique (CA, CN, CB) a été effectuée de la façon antérieurement décrite, la purification ultime se faisant par chromatographie sur papier à l'aide des solvants I et II. Dans le filtrat du charbon un peptide de la méthionine (CF₁) a été également purifié. Les peptides CA₁ et CF₁ ont pu être purifiés par une seule chromatographie dans le solvant I dans le cas du peptide basique CB₁, le deuxième solvant utilisé a été du phénol tamponné à pH 4. Les Figs. 3 et 4 indiquent les emplacements des peptides après chromatographie dans les deux solvants de purification.

La composition en acides aminés des peptides a été déterminée après hydrolyse totale (HCl 6N, 20 heures, 105°) au moyen de la chromatographie sur papier dans les conditions déjà indiquées. La détermination de l'enchaînement des acides aminés ayant exigé des opérations particulières pour chaque peptide, nous décrirons successivement les expériences effectuées sur chacun d'eux.

Peptide acide CA₁: La composition en acides aminés est (Glu,Sér,Phé,Asp), l'absence du tryptophane ayant été vérifié au moyen d'une hydrolyse barytique particulière. Les techniques de Sanger et d'Edman permettent d'assigner à l'acide

Acides aminés	Peptides "chymotrypsiques"						Peptides "pepsiques"		
	CA ₁ (PA ₁)	CB ₁	CB ₂	CN ₁ (PN ₁)	CN ₂	CF ₁	PB ₁	PB ₂	PN ₂
(CyS) ₂ } 0									
Lys } 0									
His } 0									
Arg } 0									
Gly } 0									
Asp } 0									
Sér } 0	0		0				0	0	0
Glu } 0									
Thr } 0									
Ala } 0									
Pro } 0									
Tyr } 0		0			0				
Val } 0									
Phé } 0									
Leu } 0									
Ileu } 0									

Fig. 3. Emplacements dans le mélange butanol-acide formique des peptides isolés après hydrolyse enzymatique. Peptides CA, CB, CN ou PA, PB, PN, peptides aromatiques (retenus sur charbon) acides, basiques ou neutres, provenant respectivement des hydrolysats chymotrypsiques ou pepsiques. Peptide CF peptide non aromatique provenant d'un hydrolysat chymotrypsique.

Acides amines		Peptides "chymotrypsiques"						Peptides "pepsiques"		
		CA ₁ (PA ₁)	CB ₁	CB ₂	CN ₁ (PN ₁)	CN ₂	CF ₁	PB ₁	PB ₂	PN ₂
(CyS) ₂										
Arg										
Lys										
Asp										
Glu										
Sér										
Gly										
Ala										
Pro										
Val										
Phe										
Leu										
Tyr										

Fig. 4. Emplacements dans le mélange pyridine - collidine des peptides isolés après hydrolyse enzymatique. Peptides *CA*, *CB*, *CN* ou *PA*, *PB*, *PN*, peptides aromatiques (retenus sur charbon) acides, basiques ou neutres, provenant respectivement des hydrolysats chymotrypsiques ou pepsiques. Peptide *CF* peptide non aromatique provenant d'un hydrolysats chymotrypsique.

glutamique la position N-terminale. Toutefois les rendements en DNP-acide glutamique et PTH-acide glutamique sont anormalement faibles et après hydrolyse totale, on retrouve beaucoup d'acide glutamique n'ayant pas réagi. La formation d'un cycle pyrrolidone à partir d'un résidu de glutamine situé en position N-terminale pourrait expliquer cette anomalie²¹. Lorsque la carboxypeptidase agit sur le tétra-peptide, on observe après 5 minutes une libération pratiquement simultanée de phénylalanine et d'acide aspartique: ces résultats indiquent que la sérine se trouve en deuxième position dans le peptide et que le résidu d'acide aspartique n'est pas amidé. Toutefois il n'est pas possible de déterminer directement quel est le résidu C-terminal. On effectue alors l'hydrolyse partielle acide du tétra-peptide (HCl 11.2 N, 4 jours, 37°) et par chromatographie sur papier on peut isoler un tripeptide de composition (Sér,Phé,Asp) et un dipeptide de composition (Phé,Asp) qui occupent sur les chromatogrammes les emplacements respectivement du tripeptide Sér·Phé·Asp et du dipeptide Phé·Asp caractérisés après hydrolyse partielle acide du lysozyme. En faisant agir la carboxypeptidase pendant 30 minutes sur le tripeptide (Sér,Phé,Asp), seul l'acide aspartique est libéré ce qui indique que ce résidu occupait la position C-terminale dans le tétra-peptide initial. En conséquence, la structure de ce dernier est Glu·Sér·Phé·Asp ou Glu(NH₂)·Sér·Phé·Asp.

Peptides basiques CB₁ et CB₂: Ces peptides ont été isolés dans la fraction basique de l'éluat du charbon. La composition du peptide *CB₁* est (Lys,Val,Phé) et celle du peptide *CB₂* (Arg,Gly,Tyr). La technique du dinitrofluorobenzène appliquée au

peptide CB_1 indique que la lysine occupe la position N-terminale et l'emploi de la carboxypeptidase (45 min) permet de constater que la phénylalanine occupe la position C-terminale. La structure du peptide CB_1 est donc Lys·Val·Phé. Ce peptide occupe au cours des chromatographies sur papier les mêmes emplacements que le peptide $B_1 = \text{Lys} \cdot \text{Val} \cdot \text{Phé}$ isolé à partir de l'hydrolysate acide du lysozyme. La technique de Sanger appliquée au peptide CB_2 indique que l'arginine occupe la position N-terminale et l'emploi de la carboxypeptidase (1 heure) permet de constater que la tyrosine occupe la position C-terminale. La structure du peptide CB_2 est donc Arg·Gly·Tyr. Une confirmation de cette structure a été obtenue par l'emploi de la trypsine. On sait en effet que cet enzyme coupe les liaisons peptidiques au niveau des carboxyles de l'arginine ou de la lysine^{22, 23}. Le peptide (0.5 micromolécule) dissous dans 0.1 ml de bicarbonate de soude à 0.02 % (pH 7.5) est hydrolysé avec 0.01 mg de trypsine cristallisée Worthington (trypsine contenant 50 % de SO_4Mg). On laisse 24 h à 37°, puis l'enzyme est détruit par ébullition pendant quelques minutes, et l'hydrolysate est chromatographié sur papier dans le mélange butanol-acide formique. On observe une forte libération d'arginine et d'un peptide occupant l'emplacement du peptide synthétique Gly·Tyr. Ce résultat est donc en accord avec la structure Arg·Gly·Tyr attribuée au peptide CB_2 et permet en même temps d'exclure la possibilité d'un résidu de tryptophane qui aurait échappé à l'analyse.

Peptides neutres CN_1 et CN_2 : ces peptides ont été isolés dans la fraction neutre de l'éluat de charbon. La composition du peptide CN_1 est (Gly, Tyr, Ileu, Leu). On vérifie l'absence de tryptophane au moyen de l'hydrolyse barytique et en effectuant la réaction spécifique du tryptophane qui est négative sur le peptide intact. Au moyen des techniques de Sanger et de Edman, on détermine que la glycine occupe la position N-terminale. D'autre part, on fait agir la carboxypeptidase sur le térapeptide et des fractions de l'hydrolysate sont prélevées après 15 min, 30 min, 1 heure, 1 heure 30 min et 2 heures. Ces fractions sont chromatographiées dans le butanol à pH 4 qui permet la séparation des leucines. On constate une libération de leucine après 15 min qui progresse jusqu'à 1 heure 30 minutes; après 2 heures, la quantité de leucine n'a pas augmenté, mais une très petite quantité d'isoleucine est apparue. On chromatographie alors dans le mélange butanol-acide formique un hydrolysate de 2 heures et on isole le tripeptide restant Gly·(Tyr, Ileu); on fait à nouveau agir la carboxypeptidase pendant 24 heures. Après chromatographie on peut constater une forte libération d'isoleucine, et la présence d'un peptide qui occupe les emplacements du peptide synthétique Gly·Tyr dans le mélange butanol-acide formique et dans le butanol tamponné à pH 4. L'hydrolyse partielle acide au moyen de HCl 11.2 N permet également de caractériser la libération du peptide Gly·Tyr à partir du térapeptide étudié. Ce dernier a donc la structure Gly·Tyr·Ileu·Leu.

La composition du peptide CN_2 est (Asp, Ala, Tyr). La technique de Sanger permet de déterminer que l'acide aspartique occupe la position N-terminale et l'emploi de la carboxypeptidase (1 heure) permet de constater que la tyrosine occupe la position C-terminale. La structure du peptide est donc Asp·Ala·Tyr. Cette structure a été confirmée par l'emploi de la technique d'hydrolyse récurrente de Edman: après une première copulation avec le phénylthiocyanate et la libération de la phénylthiohydantoïne au moyen du mélange acide acétique-acide chlorhydrique, on peut caractériser l'acide aspartique après hydrolyse barytique de cette phénylthiohydantoïne. En répétant cette opération sur le peptide restant, on obtient d'une

part une phénylthiohydantoïne qui donne de l'alanine après hydrolyse barytique, d'autre part de la tyrosine libre que l'on caractérise par chromatographie sur papier. De deux façons différentes la structure du peptide Asp·Ala·Tyr est donc établie. En outre, la dégradation de Edman s'étant effectuée régulièrement, ceci permet d'exclure la possibilité de la présence d'un résidu de tryptophane. Le peptide Asp·Ala·Tyr ayant été isolé dans la fraction neutre de l'ionophorèse (pH = 6), le résidu d'acide aspartique est très probablement amidé. Ceci est confirmé par l'ionophorèse sur papier: à pH 7, le peptide se déplace légèrement vers la cathode comme la glycine utilisée comme témoin (tension 10 volts/cm; 5 heures 30). La structure complète du peptide est donc Asp(NH₂)·Ala·Tyr.

Peptide neutre du filtrat du charbon CF₁: Le peptide de la méthionine CF₁ a été décelé après chromatographie sur papier dans le mélange butanol-acide formique grâce à la réaction spécifique de l'iodoplatinate¹⁰. On a pu constater ainsi que ce peptide était partiellement retenu sur le charbon; toutefois c'est à partir du filtrat qu'il a été isolé car il pouvait être obtenu pur uniquement par une chromatographie sur papier de cette fraction dans le mélange butanol-acide formique. L'hydrolyse totale (HCl 6 N, 20 heures, 105°) ne permet d'identifier que de l'alanine, la méthionine étant détruite. Nous avons constaté cependant que lorsque la méthionine est oxydée en méthionine sulfone par action de l'acide performique selon TOENNIES ET HOMILLER¹², cette dernière ne subit pas de destruction au cours de l'hydrolyse acide. Environ 0.1 μ M de peptide est oxydé au moyen de 0.1 ml d'acide performique (10 volumes d'acide formique pour 1 volume d'eau oxygénée à 30 %); on laisse une demi-heure à la température du laboratoire, on ajoute 0.1 ml d'eau et on évapore à sec au dessiccateur sur soude. On effectue une nouvelle évaporation après addition d'eau. Parallèlement une gamme équimoléculaire d'alanine et de méthionine est oxydée dans les mêmes conditions. Après hydrolyse du peptide oxydé, on effectue la chromatographie sur papier dans le mélange butanol-acide formique de l'hydrolysate et de la gamme. On constate ainsi que le rapport moléculaire alanine/méthionine sulfone est de 2:1 dans le peptide. La composition de ce dernier est donc (Ala,Ala,Mét).

La structure du peptide CF₁ a été établie de deux façons différentes qui ont donné des résultats concordants. La technique de Sanger permet de déterminer qu'un résidu d'alanine occupe la position N-terminale et l'emploi de la carboxypeptidase (1 heure) permet de déterminer que le résidu de méthionine occupe la position C-terminale. La structure du peptide est donc Ala·Ala·Mét. L'emploi de la technique d'hydrolyse récurrente de Edman permet de confirmer cette structure: deux dégradations successives permettent d'obtenir chaque fois la phénylthiohydantoïne de l'alanine; d'autre part la deuxième dégradation donne, à côté de la PTH-alanine, de la méthionine libre que l'on caractérise par chromatographie sur papier. La dégradation de Edman s'étant effectuée régulièrement, la possibilité d'un résidu de tryptophane dans le peptide est éliminée. La structure du peptide CF₁ est donc bien Ala·Ala·Mét.

Peptides provenant de l'hydrolysate pepsique

Les peptides aromatiques de l'hydrolysate pepsique (PA, PN, PB) ont été purifiés par les procédés antérieurement décrits, la purification ultime se faisant par chromatographie sur papier à l'aide des solvants butanol-acide formique et pyridine-collidine.

Bibliographie p. 109.

Les Figs. 3 et 4 indiquent les emplacements des peptides après chromatographie dans les deux solvants de purification.

La composition en acides aminés des peptides a été déterminée après hydrolyse totale (HCl 6 N, 20 heures, 105°) dans les conditions déjà indiquées. Les opérations particulières effectuées afin de déterminer la structure de chaque peptide seront successivement décrites.

Peptide acide PA₁. Ce peptide isolé dans la fraction acide possède le même comportement chromatographique que le peptide CA₁ provenant de l'hydrolysats chymotrypsique; l'étude de sa structure effectuée à l'aide des méthodes utilisées dans le cas de CA₁ montre qu'il s'agit bien du peptide Glu·Sér·Phé·Asp.

Peptides basiques PB₁ et PB₂. Dans la fraction basique ont été isolés deux tripeptides PB₁ et PB₂. La composition du peptide PB₁ est (Ala,Lys,Phé). Le peptide intact ne donne pas la réaction spécifique du tryptophane, et l'absence de cet acide aminé est confirmée par hydrolyse barytique. La technique de Sanger permet de déterminer que l'alanine occupe la position N-terminale et l'emploi de la carboxypeptidase (45 min) permet de déterminer que la phénylalanine occupe la position C-terminale. La structure du tripeptide est donc Ala·Lys·Phé. Si on laisse agir la carboxypeptidase pendant 24 heures sur le peptide, on observe par chromatographie sur papier dans le mélange butanol-acide formique seulement 2 taches, l'une au niveau de la phénylalanine, l'autre au niveau de la lysine. Après élution des produits et hydrolyse, on constate que la première correspond à la phénylalanine libre, et la seconde à un dipeptide contenant de l'alanine et de la lysine. L'enzyme a donc détaché totalement la phénylalanine terminale mais a été incapable de scinder le dipeptide Ala·Lys. Lorsque l'on fait agir la trypsine (0.01 mg de trypsine cristallisée Worthington) sur le tripeptide (environ 0.5 μ M dissous dans 0.1 ml de bicarbonate de soude à 0.02 %, pH 7.5) on ne constate pas de scission après 24 heures à 37°.

La composition du peptide PB₂ est (Tyr,Arg,Gly). Le peptide intact ne donne pas la réaction spécifique du tryptophane et l'absence de cet acide aminé est confirmée par hydrolyse barytique. Ce peptide a la même composition que le tripeptide Arg·Gly·Tyr isolé après hydrolyse chymotrypsique mais n'a pas la même structure. En effet par l'emploi de la technique de Sanger, on constate que la tyrosine occupe la position N-terminale, et en faisant agir la carboxypeptidase (24 heures) on observe une libération de glycine. La structure du peptide est donc Tyr·Arg·Gly. La trypsine (0.01 mg) agissant sur le tripeptide (environ 0.5 μ M, pH 7.5, 37°) pendant 24 heures n'effectue pas de scission. Il est intéressant de noter que le tripeptide Arg·Gly·Tyr est scindé par la trypsine, alors que le tripeptide Tyr·Arg·Gly ne l'est pas.

Peptides neutres PN₁ et PN₂. Dans la fraction neutre ont été isolés deux peptides PN₁ et PN₂. Le peptide PN₁ paraît identique au peptide CN₁ isolé à partir de l'hydrolysats chymotrypsique lorsqu'on les compare par chromatographie sur papier. L'étude de la structure confirme qu'il s'agit bien du peptide Gly·Tyr·Ileu·Leu. Le peptide PN₂ possède la composition (Tyr,Gly,Sér,Leu,Asp), l'absence de tryptophane étant constatée après hydrolyse barytique. La technique de Sanger permet de déterminer que la tyrosine occupe la position N-terminale. D'autre part, on fait agir la carboxypeptidase pendant des temps variables: 10 minutes, 25 minutes, 1 heure, 1 heure 30 et 4 heures. Les hydrolysats sont passés sur charbon afin d'éliminer le peptide non attaqué et les peptides résultants (la tyrosine occupe la position N-terminale dans le peptide original) et on recueille dans le filtrat les acides aminés

libérés, non adsorbés sur le charbon. Après 10 minutes, on observe une très forte libération d'asparagine et une libération moindre de leucine. La proportion de leucine augmente avec le temps; après 25 minutes on peut constater l'apparition de la sérine et en quantité plus faible de la glycine. La structure Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂) a été confirmée au moyen de l'hydrolyse partielle acide. Le peptide (1 μ M) est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 11 N (0.2 ml) pendant 4 jours à 37°. Les produits de l'hydrolyse sont fractionnés sur une microcolonne de charbon. La fraction retenue sur le charbon renferme de la tyrosine libre et un dipeptide contenant de la tyrosine et de la glycine. Comme la tyrosine occupe la position N-terminale dans le pentapeptide, ce peptide a la structure Tyr·Gly. La fraction non retenue sur le charbon renferme, à côté des acides aminés libres, un dipeptide contenant de la sérine et de la leucine. Ce peptide est Sér·Leu puisque la leucine occupe l'avant dernière position devant l'asparagine. L'ensemble des résultats permet d'attribuer la structure Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂) au peptide PN₂.

A côté des deux peptides étudiés, la fraction neutre aromatique renferme des quantités appréciables de phénylalanine et de tryptophane libres.

DISCUSSION

L'enchaînement des acides aminés au voisinage de l'unique résidu d'histidine, Arg·His·Lys est déjà connu². Les recherches actuelles permettent de caractériser les deux résidus de proline puisque les peptides Thr·Pro et Leu·Pro ont été isolés. D'autre part, un résidu de méthionine sur les deux que contient le lysozyme est caractérisé par l'isolement du peptide Ala·Ala·Mét.

Les peptides de la phénylalanine et de la tyrosine ont fait l'objet d'une recherche systématique. Les Tableaux II et III récapitulent les résultats obtenus dans notre laboratoire au moyen des hydrolyses chlorhydrique, chymotrypsique et pepsique.

TABLEAU II
PEPTIDES DE LA PHÉNYLALANINE

Hydrolyse acide:	Val·Phé	Phé·Asp	Phé·Glu
	Lys·Val·Phé	Sér·Phé·Asp	
Hydrolyse chymotrypsique:	Lys·Val·Phé	Glu·Sér·Phé·Asp	
Hydrolyse pepsique:		Glu·Sér·Phé·Asp	Ala·Lys·Phé
Peptides:	Lys·Val·Phé	Glu·Sér·Phé·Asp	Ala·Lys·Phé·Glu

TABLEAU III
PEPTIDES DE LA TYROSINE

	Asp·Tyr	Gly·Tyr	Tyr·Gly
Hydrolyse acide:	Tyr·Arg		
	Asp·Tyr·Arg		
Hydrolyse		Arg·Gly·Tyr	Asp(NH ₂)·Ala·Tyr
chymotrypsique:		Gly·Tyr·Ileu·Leu	
Hydrolyse pepsique:	Tyr·Arg·Gly	Gly·Tyr·Ileu·Leu	Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH ₂)
Peptides:	Asp·Tyr·Arg·Gly	Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu	Asp(NH ₂)·Ala·Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH ₂)

On constate que tous les peptides de la phénylalanine isolés ont pu être groupés en trois enchaînements: Lys·Val·Phé, Glu·Sér·Phé·Asp et Ala·Lys·Phé·Glu et qu'il existe une bonne concordance entre les structures des peptides obtenus par des procédés de dégradation différents. L'enchaînement Ala·Lys·Phé·Glu a été déduit des peptides Ala·Lys·Phé et Phé·Glu puisqu'il n'existe que trois résidus de phénylalanine par molécule de lysozyme et que deux résidus se trouvent dans les enchaînements Lys·Val·Phé·Gly et Glu·Sér·Phé·Asp. Le peptide Lys·Val·Phé appartient certainement à l'enchaînement N-terminal du lysozyme, Lys·Val·Phé·Gly·Arg établi par SCHROEDER²⁴ et ACHER, LAURILA, THAUREAUX ET FROMAGEOT³. Il n'a pas été établi si les résidus de l'acide glutamique sont amidés ou non dans la protéine.

Les peptides de la tyrosine ont été groupés dans le Tableau III. Ici également les structures des peptides concordent pour donner trois enchaînements: Asp·Tyr·Arg·Gly, Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu· et Asp(NH₂)·Ala·Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂). L'enchaînement Asp(NH₂)·Ala·Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂) a été déduit des peptides Asp(NH₂)·Ala·Tyr et Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂) puisqu'il n'existe que trois résidus de tyrosine dans le lysozyme et que deux résidus se trouvent dans les peptides Asp·Tyr·Arg et Gly·Tyr·Ileu·Leu. Il n'a pas été établi si le résidu d'acide aspartique du peptide Asp·Tyr·Arg est amidé ou non dans le lysozyme.

THOMPSON^{25, 26} a effectué l'hydrolyse partielle acide du lysozyme oxydé et a établi plusieurs enchaînements. Les enchaînements Phé·Glu, Phé·Asp, Thr·Pro et Ala·Mét concordent avec les nôtres. L'enchaînement Gly·Phé·Glu toutefois ne concorde pas avec l'enchaînement Lys·Phé·Glu que nous avons trouvé mais cet auteur a obtenu depuis des résultats conformes aux nôtres (communication personnelle).

La chymotrypsine a la réputation de couper les liaisons peptides au niveau des carboxyles des acides aminés aromatiques et de la méthionine^{27, 28}. On peut constater sur le Tableau IV que cet enzyme a coupé au niveau du carboxyle de la tyrosine au moins dans deux cas sur trois (la coupure a pu se faire au niveau du carboxyle du troisième résidu mais l'élimination des grands peptides ne permet pas de le constater). En ce qui concerne la phénylalanine, la chymotrypsine a coupé une fois au niveau du carboxyle d'un résidu mais dans un cas (peptide Glu·Sér·Phé·Asp) cette coupure

TABLEAU IV

SCISSIONS EFFECTUÉES PAR LA CHYMOTRYPSINE ET LA PEPSINE SUR LE LYSOZYME

C = Scissions effectuées par la chymotrypsine; P = Scissions effectuées par la pepsine

$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Asp}^* \cdot \text{Tyr} \cdot \text{Arg} \cdot \text{Gly} \cdots \end{array}$		$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Arg} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{Ileu} \cdot \text{Leu} \cdots \end{array}$		$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Asp}(\text{NH}_2) \cdot \text{Ala} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Sér} \cdot \text{Leu} \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2) \cdots \end{array}$	
	$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Glu}^* \cdot \text{Sér} \cdot \text{Phé} \cdot \text{Asp} \cdots \end{array}$	$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Ala} \cdot \text{Lys} \cdot \text{Phé} \cdot \text{Glu}^* \cdots \end{array}$	$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \text{Lys} \cdot \text{Val} \cdot \text{Phé} \cdots \end{array}$	$\begin{array}{c} P \\ \downarrow \\ \cdots \text{Ala} \cdot \text{Ala} \cdot \text{Mét} \cdots \end{array}$	
	$\begin{array}{c} \uparrow \\ C \end{array}$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ C \end{array}$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ C \end{array}$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ C \end{array}$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ C \end{array}$

* Il n'a pas été déterminé si le résidu aspartique ou glutamique est amidé ou non.

** Coupure peut-être due à de la trypsine contaminant éventuellement la chymotrypsine.

n'a pas été effectuée. Il est possible que le carboxyle libre en β du résidu d'acide aspartique gêne l'action de l'enzyme. Enfin dans un cas, l'enzyme a coupé au niveau du carboxyle de la méthionine. SANGER et coll.^{29, 30} ont observé que la chymotrypsine coupait au niveau des carboxyles des quatre résidus de la tyrosine que contient la molécule d'insuline, et BELL³¹ a constaté que l'enzyme coupait au niveau du carboxyle d'un résidu de tyrosine sur les deux que contient la molécule de β -corticotropine, le carboxyle du deuxième étant toutefois engagé dans la liaison -Tyr·Pro-. En ce qui concerne la phénylalanine, la chymotrypsine a coupé la liaison -Phé·Tyr- mais pas les liaisons -Phé·Val- et -Phé·Phé- de l'insuline, et l'enzyme a coupé la liaison -Phé·Arg- mais pas la liaison -Phé·Pro- de la β -corticotropine. Enfin, la liaison -Mét·Glu- n'a pas été coupée dans la β -corticotropine. Il semble donc que la chymotrypsine coupe assez régulièrement au niveau du carboxyle de la tyrosine mais moins régulièrement au niveau du carboxyle de la phénylalanine et de la méthionine. Agissant sur le lysozyme la chymotrypsine a coupé au niveau du carboxyle de la leucine et de l'acide aspartique. Une scission des liaisons -Leu·Tyr- de l'insuline³⁰ et -Leu·Glu- de la β -corticotropine³¹ a déjà été observée. Il est intéressant de noter que GOLDENBERG, GOLDENBERG ET McLAREN ont constaté que la chymotrypsine scinde le leucylethylester³². Enfin, la scission de la liaison -Arg·Gly- est anormale et est due peut-être à un peu de trypsin contaminant la chymotrypsine.

La pepsine a la réputation de couper au niveau du groupe aminé des résidus aromatiques³³. Cette spécificité ne paraît pas rigoureuse. Dans deux cas sur trois l'enzyme a coupé au niveau du groupe aminé de la tyrosine et dans aucun cas au niveau du groupe aminé de la phénylalanine. Par contre la pepsine a coupé au niveau des groupes aminés de certains résidus d'acide glutamique, d'alanine et de glycine. La phénylalanine et le tryptophane libres ayant été observés dans les hydrolysats pepsiques du lysozyme, il faut admettre que la pepsine peut couper de part et d'autre de ces acides aminés.

RÉSUMÉ

Les peptides de la proline, de la méthionine, de la phénylalanine et de la tyrosine obtenus par hydrolyse acide et enzymatique du lysozyme ont été spécialement étudiés parce que la molécule du lysozyme ne contient respectivement que 2, 2, 3 et 3 résidus de ces acides aminés. Aux trois résidus de phénylalanine correspondent les enchaînements Lys·Val·Phé·Gly·Arg, Glu·Sér·Phé·Asp et Ala·Lys·Phé·Glu, et aux trois résidus de tyrosine correspondent les enchaînements Asp·Tyr·Arg·Gly, Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu et Asp(NH₂)·Ala·Tyr·Gly·Sér·Leu·Asp(NH₂). D'autre part, les deux résidus de proline sont engagés dans les liaisons Thr·Pro et Leu·Pro tandis que un des résidus de méthionine participe à l'enchaînement Ala·Ala·Mét. Les spécificités de la chymotrypsine et de la pepsine sont discutées en fonction des résultats obtenus.

SUMMARY

The peptides of proline, methionine, phenylalanine and tyrosine, obtained by acid and enzymic hydrolysis of lysozyme, have been specially studied since the lysozyme molecule contains only 2, 2, 3 and 3 residues respectively of these amino acids. The linkages Lys·Val·Phe·Gly·Arg, Glu·Ser·Phe·Asp and Ala·Lys·Phe·Glu, correspond to the three phenylalanine residues and the linkages Asp·Tyr·Arg·Gly, Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu and Asp(NH₂)·Ala·Tyr·Gly·Ser·Leu·Asp(NH₂) correspond to the three tyrosine residues. On the other hand, the two proline residues take part in the Thr·Pro and Leu·Pro bonds, while one of the methionine residues participates in the Ala·Ala·Met linkage. The specificity of chymotrypsin and pepsin is discussed in view of the results obtained.

ZUSAMMENFASSUNG

Die durch saure und enzymatische Hydrolyse des Lysozyms erhaltenen Peptide von Prolin Methionin, Phenylalanin und Tyrosin wurden besonders untersucht, da das Lysozymmolekül nur respective 2, 2, 3 und 3 Reste dieser Aminosäuren enthält. Den drei Phenylalaninresten entsprechen die Verknüpfungen Lys·Val·Phe·Gly·Arg, Glu·Ser·Phe·Asp und Ala·Lys·Phe·Glu, während den drei Tyrosinresten die folgenden Verknüpfungen entsprechen: Asp·Tyr·Arg·Gly, Arg·Gly·Tyr·Ileu·Leu und Asp(NH₂)·Ala·Tyr·Gly·Ser·Leu·Asp(NH₂). Andererseits nehmen die zwei Prolinreste an den Bindungen Thr·Pro und Leu·Pro teil, während einer der Methioninreste an der Verknüpfung Ala·Ala·Met beteiligt ist. Die Spezifität des Chymotrypsins und des Pepsins werden an Hand der erzielten Ergebnisse erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. L. FEVOLD, *Advances in Protein Chem.*, VI (1951) 222.
- ² R. ACHER, J. THAUREAUX, C. CROCKER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 339.
- ³ R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 151.
- ⁴ R. ACHER, J. CHAUVET, C. CROCKER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 167.
- ⁵ G. ALDERTON, W. H. WARD ET H. L. FEVOLD, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 43.
- ⁶ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 49 (1951) 642.
- ⁷ F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
- ⁸ E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- ⁹ R. ACHER ET C. CROCKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 704.
- ¹⁰ G. TOENNIES ET J. J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- ¹¹ J. TABONE, D. ROBERT, S. THOMASSEY ET N. MAMOUNAS, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 529.
- ¹² G. TOENNIES ET R. P. HOMILLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 3054.
- ¹³ A. POLSON, V. M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1948) 603.
- ¹⁴ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ¹⁵ F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 353.
- ¹⁶ P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 283.
- ¹⁷ P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 700.
- ¹⁸ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- ¹⁹ M. ROVERY ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 541.
- ²⁰ C. CROCKER, *Thèse de Doctorat de l'Université de Paris*, 1954.
- ²¹ F. SANGER, E. O. P. THOMPSON ET R. KITAI, *Biochem. J.*, 59 (1955) 509.
- ²² M. BERGMANN, J. S. FRUTON ET H. POLLOK, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 643.
- ²³ K. HOFMANN ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 81.
- ²⁴ W. A. SCHROEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5118.
- ²⁵ A. R. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 581.
- ²⁶ A. R. THOMPSON, *Biochem. J.*, 60 (1955) 507.
- ²⁷ M. BERGMANN ET J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 405.
- ²⁸ H. NEURATH ET G. W. SCHWERT, *Chem. Revs.*, 46 (1950) 69.
- ²⁹ F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 481.
- ³⁰ F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 366.
- ³¹ B. H. BELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5565.
- ³² H. GOLDENBERG, V. GOLDENBERG ET A. D. McLAREN, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 110.
- ³³ J. S. FRUTON ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 627.

Reçu le 28 septembre 1955