

## STRUCTURE DU LYSOZYME D'OEUF DE POULE. ETUDE DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE\*

J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT

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

Le lysozyme d'oeuf de poule contient 11 résidus d'arginine et 6 résidus de lysine<sup>1,2</sup>. On sait que la trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de ces deux acides aminés. La spécificité de cet enzyme est maintenant bien établie et laissait prévoir que le nombre maximum des peptides différents que l'on pouvait obtenir à partir du lysozyme était de 17 ou 18. Mais la présence, dans la protéine, d'une série de boucles dues à l'existence de ponts -S-S- fait que certains des peptides détachés par l'action de la trypsine doivent avoir une structure compliquée et risquent de ne pas pouvoir être séparés convenablement par chromatographie. Aussi l'action de la trypsine a-t-elle été appliquée ici, non seulement sur le lysozyme n'ayant pas subi de traitement autre qu'une dénaturation par la chaleur, mais aussi sur du lysozyme dont les ponts -S-S- ont été rompus par oxydation et transformés ainsi en un nombre double de groupements sulfoniques.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le lysozyme utilisé est un échantillon (lot no. 381-187) provenant des laboratoires Armour de Chicago.

Plusieurs observations<sup>3,4</sup> ont montré que, comme d'autres protéines, le lysozyme "natif", c'est-à-dire obtenu dans des conditions telles qu'il ait conservé toute son activité enzymatique, est à peu près complètement résistant à l'action de la trypsine, tout au moins dans les conditions habituelles. Pour que la protéine puisse être attaquée par cet enzyme, il convient donc de la dénaturer, ce que l'on obtient facilement par chauffage pendant une heure à 100° C d'une solution aqueuse (pH 5.4) à 5%. Un dosage de l'azote aminé selon van SLYKE-NEILL<sup>5</sup> a permis de constater que ce traitement n'avait rompu aucune liaison peptidique. La transformation des ponts -S-S- du lysozyme en groupes sulfoniques a été faite ici au moyen de l'acide performique, dans les conditions particulièrement douces décrites par du VIGNEAUD *et col.*<sup>6</sup>. On doit toutefois remarquer qu'il est pratiquement impossible d'éviter, lors de l'oxydation en question, la destruction de la majeure partie du tryptophane. Or, l'on ignore à l'heure actuelle quels sont les produits d'oxydation de cette substance; il semble toutefois que, au moins dans la majorité des cas, la transformation subie par les résidus de tryptophane n'entraîne pas la rupture des liaisons peptidiques auxquelles ils prennent part<sup>7</sup>. D'autre part, il semble également que, dans les conditions actuelles, la destruction des résidus de tyrosine soit à peu près complètement évitée.

La trypsine est un échantillon recristallisé deux fois et provenant des laboratoires Worthington, Freehold, N.J., (lot TR 324, contenant 50% de sulfate de Mg).

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

\*\* Le tryptophane oxydé dans ces conditions donne après chromatographie sur papier dans le solvant A (voir plus loin) principalement une substance de  $R_F = 0.43$ , fluorescente, réagissant mal à la ninhydrine, donnant une coloration orange avec le réactif d'EHRlich, stable à l'hydrolyse acide. La kynurénine présente tous ces caractères<sup>8</sup>. Des observations analogues ont été faites à partir des produits d'hydrolyse du dipeptide Gly.Try oxydé. L'oxydation performique n'avait pas rompu la liaison peptidique.

### *Hydrolyse trypsique*

Elle est faite à 37° C et à pH 7.8. Le lysozyme dénaturé par la chaleur ou oxydé est dissous dans l'eau distillée (concentration en substrat: 1%). Le pH est ajusté à 7.8 par addition d'une solution de bicarbonate à 5% (concentration finale en bicarbonate: 0.025 M). Le rapport enzyme/substrat est 1/100. Le cours de l'hydrolyse est suivi par un dosage à la ninhydrine<sup>7</sup>. Pour arrêter l'action enzymatique, le pH de l'hydrolysate est amené à 2.2 avec HCl 2 N.

### *Chromatographie des peptides*

Les peptides contenus dans l'hydrolysate trypsique sont séparés par chromatographie sur colonne de résine échangeur d'ions Dowex-50 X 2, telle qu'elle a été décrite par HIRS, MOORE ET STEIN<sup>9</sup>. Les colonnes (135 × 2 cm) contiennent un mélange de 50% de résine de 120-200 mesh et de 50% de résine de 200-400 mesh. La vitesse d'écoulement au début de l'opération est de 20 ml par heure à 35° C. Les solutions tampon utilisées sont celles décrites par MOORE ET STEIN<sup>10</sup>; elles contiennent du Brij 35, mais pas de thiodiglycol. Les chromatographies sont effectuées à température constante (35° C et 50° C). Le volume de la chambre de mélange est de 2 litres, mais en fin d'opération il est ramené à 1 litre ou à 0.5 litre afin de faire croître plus rapidement la molarité de la solution tampon passant sur la résine.

### *Analyse des fractions*

La colonne de chromatographie est disposée sur un collecteur automatique de fractions et l'on recueille des portions de 5 ml. Pour repérer la place des peptides, une partie aliquote (0.3 ml) prélevée dans un tube sur deux est soumise à un dosage à la ninhydrine (ninhydrine directe)<sup>7</sup>. Un grand nombre de peptides réagissant mal à ce réactif risquaient d'échapper: aussi un deuxième dosage à la ninhydrine est-il fait sur une nouvelle fraction aliquote (0.3 ml) soumise préalablement à une hydrolyse alcaline de 2.5 heures à 90° C<sup>9</sup>. Les fractions correspondant à un pic donné sont ensuite réunies.

### *Dessalification*

Deux modes de dessalification ont été employés: (a) la dessalification des pics élués avec la solution tampon pH 3.1 et 0.2 N (voir Figs. 4 et 5) est faite sur Dowex 2 (120 mesh) selon DRÈZE ET DE BOECK<sup>11</sup>. 50 ml peuvent être dessalifiés sur une colonne de 25 × 1.8 cm. (b) La dessalification des pics élués après la mise en route du gradient est faite sur Dowex-50 X 2 (120-200 mesh). 50 ml d'une solution dont la concentration en sels peut atteindre 2 N peuvent être dessalifiés sur une colonne de 25 × 2 cm. La résine est lavée avec NH<sub>4</sub>OH 2 N jusqu'à alcalinité, puis avec de l'eau, enfin avec de l'acide citrique 0.1 M jusqu'à pH 3. La fraction à dessalifier est alors chargée, puis la résine est lavée avec 100 ml d'eau. L'élution des peptides est faite avec NH<sub>4</sub>OH N ou avec de l'acétate d'ammonium 0.2 N et la colonne est régénérée par lavage avec HCl 4 N, de l'eau, NH<sub>4</sub>OH 2 N, etc.

Les peptides dessalifiés sont amenés à sec (au dessiccateur ou par lyophilisation) et conservés à -20° C.

### *Purification des peptides*

Nous avons vérifié la pureté des peptides dessalifiés en les soumettant à une chromatographie sur papier Whatman No. 1 dans le solvant A (en volumes): *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10), et par ionophorèses sur papier Whatman No. 1 à deux pH différents, selon la méthode de KUNKEL ET TISELIUS<sup>12</sup>, en utilisant les solvants<sup>13</sup>: pyridine-eau-acide acétique (100:900:4 à pH 6.5; 10:890:100 à pH 3.6). Les révélations sur papier sont faites avec le réactif à la ninhydrine. Une fraction contenant deux substances est purifiée en la soumettant à une chromatographie préparative sur papier ou à une ionophorèse préparative sur papier.

### *Analyse des peptides*

L'analyse quantitative est faite après hydrolyse acide totale (24 heures; HCl 6 N; 110° C) (a) pour les peptides courts, par chromatographie sur papier successivement dans les solvants A et le phénol tamponné à pH 10<sup>14</sup>. Tous les chromatogrammes comportent une gamme d'acides aminés en proportion croissante selon POLSON<sup>15</sup>, la comparaison des taches après révélation à la ninhydrine permettant de déterminer si les résidus présents dans un peptide sont dans le rapport 1:1 ou 1:2. La séparation des leucines est faite dans le *n*-butanol tamponné à pH 4 et celle des acides aminés basiques dans le phénol tamponné à pH 4<sup>14</sup>. (b) pour les peptides longs, par chromatographie sur une colonne (150 × 0.9 cm) de Dowex-50 X 4 suivant la méthode de MOORE ET STEIN<sup>10</sup>.

Le tryptophane est détruit par hydrolyse acide; il est transformé par oxydation performique en des dérivés non encore entièrement déterminés, dont sans doute la kynurénine. Sa présence a été recherchée à l'aide du réactif d'EHRlich<sup>8</sup> dans les peptides entiers provenant de l'hydrolyse enzymatique du lysozyme dénaturé par la chaleur.

### Structure des peptides

**Acides aminés N-terminaux.** Les acides aminés N-terminaux sont déterminés: (a) soit par la méthode de SANGER<sup>16</sup>; les dinitrophényl-acides aminés (DNP-acides aminés) sont identifiés par chromatographie sur papier en utilisant le mélange (en volumes) phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1)<sup>17</sup> ou une solution tampon de citrates à pH 6.2 et 1 M<sup>18</sup>; (b) soit par la méthode d'EDMAN<sup>19</sup>; dans ce dernier cas, la technique que nous avons utilisée est la suivante: 1  $\mu$ mole de peptide dissous dans 0.2 ml de pyridine à 50% est traité avec 0.2 ml d'une solution de phénylisothiocyanate à 1% dans l'alcool à 95°. Le pH est ajusté à 9.5 avec une solution à 5% de triméthylamine. On laisse reposer 30 minutes à 40° C en agitant de temps en temps: l'excès de réactif est extrait avec du benzène et le phénylthiocarbamylpeptide (PTC-peptide), et amené à sec dans un dessiccateur sur acide sulfurique. On reprend par 0.2 ml d'un mélange: acide acétique-HCl (5:1 en volumes), et on laisse reposer 15 minutes à température ordinaire. Ce temps est suffisant pour que se détache, après cyclisation, le phénylthiohydantoïne-acide aminé (PTH-acide aminé). L'acide aminé est régénéré par hydrolyse barytique ( $\text{Ba(OH)}_2$  0.2 N; 48 heures; 110° C) ou par hydrolyse acide (HCl 6 N; 16 heures; 150° en tube scellé sous vide) et caractérisé par chromatographie sur papier.

**Acides aminés C-terminaux.** Les acides aminés C-terminaux sont déterminés au moyen de la carboxypeptidase Worthington utilisée en suspension dans l'eau distillée; on laisse agir l'enzyme en présence de diisopropylfluorophosphate à 37° C pendant une durée variant de 5 minutes à 2 heures, la solution étant ajustée à pH 7.5 avec de la triméthylamine.

**Hydrolyse acide partielle.** La plupart des peptides sont soumis, en vue de l'étude de leur structure, à une hydrolyse acide partielle dans HCl 11.7 N, à 37° C et pendant 24 heures. Les produits qui en résultent sont isolés par ionophorèse préparative à pH 6.5, puis éventuellement purifiés par chromatographie dans le solvant A. Ils sont alors analysés et leurs acides aminés terminaux déterminés. L'ensemble des résultats ainsi obtenus permet habituellement d'établir la structure du peptide initial.

### RÉSULTATS

#### Action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé par la chaleur

L'évolution en fonction du temps de l'hydrolyse trypsique du lysozyme dénaturé par la chaleur est montrée dans la Fig. 1. L'action de l'enzyme est à peu près complète au bout de 6 heures. Un hydrolysats obtenu dans ces conditions à partir de 25  $\mu$ mole de lysozyme a été chromatographié sur une colonne de Dowex-50 X 2. La Fig. 2

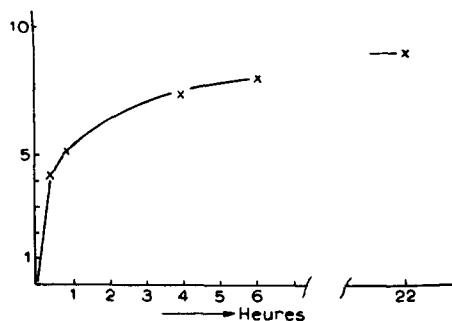


Fig. 1. Nombres de coupures obtenues par action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé par la chaleur.

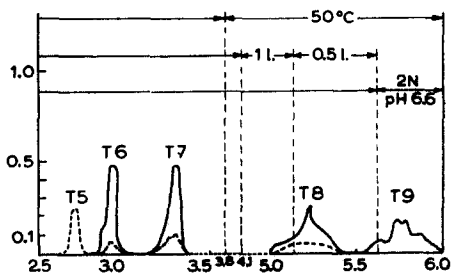
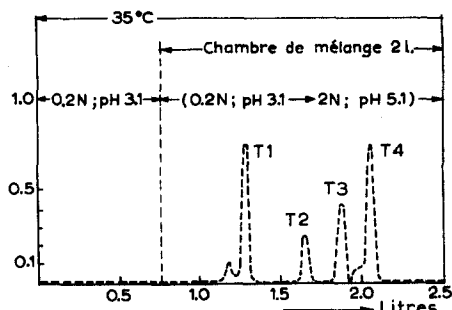


Fig. 2. Séparation des produits obtenus par action de la trypsine sur 25  $\mu$ moles de lysozyme, dénaturé par la chaleur. — coloration de la réaction à la ninhydrine après hydrolyse alcaline. ---- coloration de la réaction à la ninhydrine effectuée directement, exprimées en concentration mM d'équivalents de leucine.

montre la courbe de séparation des différents pics; les pics sont déterminés par un dosage à la ninhydrine avant et après hydrolyse alcaline. Le gradient a été mis en route après passage de 0.75 l de solution tampon (pH 3.1; 0.2 *N*). Après avoir augmenté plus rapidement la molarité de la solution tampon en diminuant le volume de la chambre de mélange, la colonne est éluée avec une solution tampon d'acétate de sodium (pH 6.6; 2 *N*). On constate la présence de 9 seulement des 17 ou 18 pics que l'on pouvait espérer obtenir<sup>20</sup>. La différence correspond à des peptides fortement adsorbés sur la résine et qui peuvent être élués par NaOH 0.2 *N*. Les fractions ainsi isolées se sont révélées pures, comme l'indique le Tableau I. Il a été possible d'étudier de façon précise chacune des substances constituant les pics représentés par la Fig. 2. La nature des acides aminés et la composition des peptides ainsi que les rendements sont donnés dans le Tableau II. En plus des acides aminés libres (leucine, lysine, arginine) et de l'ammoniac, quatre peptides seulement, T6 à T9, ont été obtenus avec un rendement supérieur à 10%. Leur structure a été établie.

TABLEAU I

COMPORTEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE ET IONOPHORÈSE SUR PAPIER DES PICS ISOLÉS APRÈS HYDROLYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME DÉNATURÉ PAR LA CHALEUR

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	$m^*(pH\ 3.6)$
T 1	0.71	0	0
T 2		-0.4	0
T 3	pic $NH_3$		
T 4	0.05	+1	+1
T 5	0.08	+1	+1
T 6	0.03	+0.7	+0.85
T 7	0.05	+0.6	+0.65
T 8	0.04	+0.05	+0.7
T 9	0.01	0	+0.3

\*  $m$  = mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine égale à +1 et par rapport à celle de l'acide cystéique égale à -1;  $m$  = 0 pour le glucose.

TABLEAU II

COMPOSITION QUANTITATIVE ET RENDEMENT DES FRAGMENTS OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME DÉNATURÉ PAR LA CHALEUR

Residus	T1	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Gly					1	1	
Ala						1	1
Ser					1	1	1
Thr					1		1
Pro					1		
Leu	1					1	
Phe							2
Tyr						2	
Asp				1		3	2
Glu						1	2
Lys		1				1	
Arg			1	1	1	1	1
His						1	
Total	1	1	1	2	5	13	10
rendement (%)	50	92	40	45	36	17	25

### Structure des peptides T6, T7, T8, T9<sup>§</sup>

T6. L'acide aminé N-terminal, Asp, est obtenu par la méthode de SANGER. La fraction acidosoluble contient uniquement de l'arginine. La structure du peptide est donc: Asp.Arg. Pour déterminer si Asp est amidé ou non, on étudie le comportement du peptide par ionophorèse à pH 6.5. Sa mobilité par rapport à l'arginine est +0.7 et correspond à celle d'un dipeptide basique. La structure du peptide initial est donc: Asp(NH<sub>2</sub>).Arg.

T7. L'acide aminé N-terminal, Thr, est déterminé par la méthode de SANGER. L'hydrolyse acide partielle du pentapeptide a donné naissance à trois peptides principaux (peptides 1 à 3, Tableau III) et celle du tetrapeptide, obtenu par élimination de Thr par la méthode d'EDMAN, à deux autres peptides (peptides 4 et 5, Tableau III) dont la structure a été déterminée. L'ensemble des résultats du Tableau III permet de remonter facilement à la structure du peptide T7 initial: Thr.Pro.Gly.Ser.Arg.

T8. L'acide aminé N-terminal, His, a été déterminé par la méthode de SANGER en hydrolysant le DNP-peptide pendant 2 heures à 110° C dans HCl 11.7 N. Il est intéressant de noter qu'une hydrolyse acide ou trop prolongée ou effectuée dans HCl 6 N au lieu de 11.7 N transforme la di-DNP-histidine en imidazol-DNP-histidine. Par hydrolyse acide partielle, quatre peptides ont été caractérisés (Tableau IV), indiquant l'existence d'un enchaînement: Leu.Asp.Asp.Tyr.Arg. Or l'on sait que l'unique résidu d'histidine du lysozyme est suivi d'un résidu de lysine<sup>24</sup>; de plus en s'appuyant sur le fait que la protéine ne contient que 3 résidus de tyrosine, que l'un d'entre eux se trouve à l'extrémité C-terminale de T8 et que le deuxième appartient

TABLEAU III  
PEPTIDES ISOLÉS D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE T7

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0.07		Ser, Arg	
2	0.25		Gly, Thr, Pro	
3	0.31		Thr, Pro	
4		0	Gly, Pro	Pro.Gly**
5	0.07	+0.7	Ser, Arg	Ser.Arg***

\*  $m$ : voir Tableau I.

\*\* La proline N-terminale a été déterminée grâce au réactif à l'isatine<sup>22</sup>.

\*\*\* La sérine N-terminale a été déterminée grâce au réactif des hydroxyaminoacides<sup>23</sup>.

TABLEAU IV  
PEPTIDES ISOLÉS D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE T8

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0.05	+0.4	Leu, Tyr, Asp <sub>2</sub> , Arg	
2	0.17	+0.4	Tyr, Asp, Arg	Asp.Tyr.Arg
3	0.17	+0.5	Tyr, Arg	Tyr.Arg
4	0.55	-0.65	Leu, Asp	Leu.Asp

\*  $m$ : voir Tableau I.

§ L'établissement de la structure de certains peptides a fait l'objet d'une note préliminaire<sup>21</sup>.

au peptide T<sub>011</sub> (voir plus loin) qui ne contient pas d'alanine, le résidu de tyrosine non encore placé dans ce peptide doit appartenir à l'enchaînement: Asp.Ala.Tyr.Gly.Ser.Leu.Asp<sup>25</sup>. Enfin, dans l'hydrolysats pepsique du lysozyme<sup>26</sup>, deux peptides (PA<sub>14</sub> et PA<sub>15</sub>) ont permis de préciser que le résidu aspartique précédant l'enchaînement Tyr.Arg était amidé. De tous ces résultats, il ressort que la structure de T<sub>8</sub> est: His.Lys.Glu.Asp\*.Ala.Tyr.Gly.Ser.Leu.Asp.Asp.(NH<sub>2</sub>).Tyr.Arg.

T<sub>9</sub>. L'acide aminé N-terminal, Phe, est déterminé par la méthode d'EDMAN. Le peptide ainsi raccourci est traité par le réactif de SANGER. Glu a été caractérisé de cette façon et l'enchaînement N-terminal est donc: Phe.Glu. Par hydrolyse acide partielle quatre peptides (peptides 1 à 4, Tableau V) ont été obtenus et étudiés. Par hydrolyse chymotrypsique (29 heures; pH 7.5; 37° C; rapport enzyme/substrat: 1/50) du peptide raccourci de son acide aminé N-terminal, quatre autres peptides ont été caractérisés (peptides 5 à 8, Tableau V). L'enchaînement Glu.Ser.Phe.Asp étant connu<sup>25</sup>, la structure du peptide T<sub>9</sub> se trouve donc déterminée: Phe.Glu.\*Ser.Phe.Asp.Glu\*.Ala.Thr.Asp\*.Arg.

TABLEAU V

PEPTIDES ISOLÉS À PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL (PEPTIDES 1 À 4)  
OU CHYMOTRYPSIQUE (PEPTIDES 5 À 8) DE T<sub>9</sub>

Peptides	R <sub>F</sub> (A)	Composition	Résidu N-terminal
1	0.05	Asp, Arg	Asp
2	0.27	Ala, Glu	
3	0.43	Ser, Phe, Asp	Ser
4	0.63	Phe, Glu	Phe
5	0.03	Ala, Thr, Asp <sub>2</sub> , Glu, Arg	Asp
6	0.07	Ala, Thr, Asp, Glu, Arg	Glu
7	0.15	Ala, Asp, Glu	
8	0.27	Ala, Phe, Asp, Glu	Phe

Les quatre peptides isolés après action de la trypsine sur le lysozyme simplement dénaturé par la chaleur présentent tous l'arginine comme acide aminé C-terminal. Aucun ne contient de cystine; un seul renferme de la lysine. On peut donc s'attendre à ce que ce soient les peptides contenant de la cystine et retenus pour cette raison, dans les conditions actuelles sur la colonne, qui possèdent la lysine comme acide aminé C-terminal.

#### *Action de la trypsine sur le lysozyme oxydé*

L'évolution en fonction du temps de l'hydrolyse trypsique du lysozyme oxydé est montrée dans la Fig. 3. Ici encore, elle est complète au bout de 6 heures. Cependant deux hydrolysats ont été chromatographiés sur une colonne de Dowex-50 X 2, l'un obtenu par action de la trypsine pendant 6 heures (Fig. 4) et l'autre obtenu après 24 heures (Fig. 5). Le nombre de peptides que l'on pouvait séparer ici est sensiblement supérieur à celui obtenu dans le cas du lysozyme non oxydé par suite de la présence des peptides contenant des résidus d'acide cystéique. Aussi le gradient utilisé est-il plus doux. Dans le cas de l'hydrolysats de 6 heures, une solution tampon pH 4.2 et 1.0 N a précédé l'addition de la solution pH 5.1 et 2.0 N. Dans le cas de l'hydrolysats

\* Il n'a pas été déterminé si ce résidu est amidé ou non.

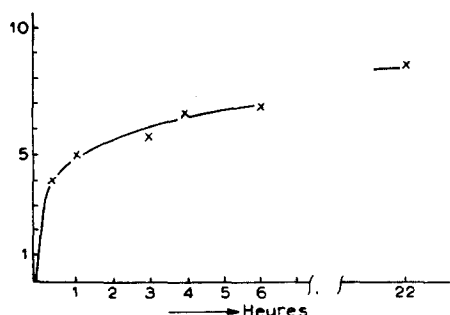


Fig. 3. Nombre de coupures obtenues par action de la trypsine sur le lysozyme oxydé par l'acide performique.

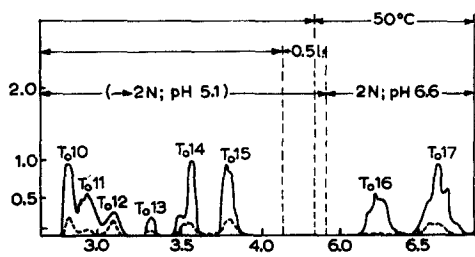
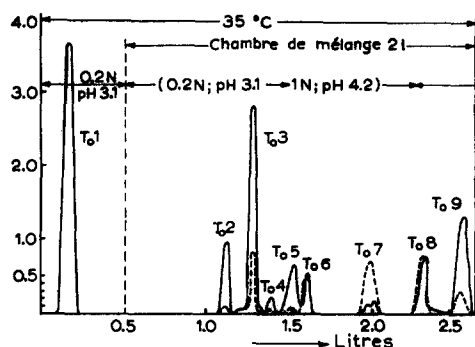


Fig. 4. Séparation des produits obtenus par action de la trypsine pendant 6 heures sur 25  $\mu$ moles de lysozyme oxydé. — coloration de la réaction à la ninhydrine après hydrolyse alcaline. ---- coloration de la réaction à la ninhydrine effectuée directement, exprimées en concentration mM d'équivalents de leucine.

Fig. 5. Séparation des produits obtenus par action de la trypsine pendant 24 heures sur 25  $\mu$ moles de lysozyme oxydé. — coloration de la réaction à la ninhydrine après hydrolyse alcaline. ---- coloration de la réaction à la ninhydrine effectuée directement, exprimées en concentration mM d'équivalents de leucine.

de 24 heures, on a fait précéder la solution tampon pH 4.2 et 1.0 N d'une solution pH 4.2 et 0.5 N. Cependant dans les deux cas, 17 pics ont été séparés<sup>20</sup>. Un dix-huitième ( $T_{018}$  ou  $T_{0A18}$ ) est obtenu en éluant la colonne avec une solution tampon de phosphates pH 7 et 0.5 N. Enfin une certaine quantité de matériel reste fortement adsorbé sur la résine et n'est éluée qu'avec NaOH 0.2 N; cette quantité est cinq fois moins importante que dans le cas du lysozyme dénaturé non oxydé. Il est intéressant de noter que la prolongation de l'action de la trypsine de 6 à 24 heures n'a permis d'isoler aucun nouveau pic; seuls les rendements de certains d'entre eux sont changés.

Les 18 fractions ont été étudiées par chromatographie et par ionophorèse sur papier (Tableau VI): quatre d'entre elles se sont révélées être un mélange de deux substances.

La composition des peptides est donnée dans le Tableau VII. En plus des acides aminés libres (leucine, lysine, arginine) et de l'ammoniac, 12 peptides ont été obtenus

TABLEAU VI

COMPORTEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE ET IONOPHORÈSE SUR PAPIER DES PICS ISOLÉS APRÈS  
HYDROLYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME OXYDÉ

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	$m^*(pH\ 3.6)$
$T_{01}$ ( $T_{0A1}$ ) a	0.02	—0.3	
b	0.06	—0.5	—0.15
$T_{02}$ ( $T_{0A2}$ )	0.02	—0.3	—0.1
$T_{03}$ ( $T_{0A3}$ ) a	0.07	—0.5	0
b	0.71	0	0
$T_{04}$ ( $T_{0A4}$ )	0	—0.35	
$T_{05}$ ( $T_{0A5}$ )	0.11	0	
$T_{06}$ ( $T_{0A6}$ )	0	—0.23	+0.18
$T_{07}$ ( $T_{0A7}$ )	pic $NH_3$		
$T_{08}$ ( $T_{0A8}$ )	0.05	+1	+1
$T_{09}$ ( $T_{0A9}$ )	0.06	0	+0.4
$T_{010}$ ( $T_{0A10}$ )	0.03	0	+0.6
$T_{011}$ ( $T_{0A11}$ )	0.015	—0.45	0
$T_{012}$ ( $T_{0A12}$ )	0.30	+0.45	+0.5
$T_{013}$ ( $T_{0A13}$ )	0.03	+0.4	
$T_{014}$ ( $T_{0A14}$ ) a	0.03	+0.7	+0.85
b	0.08	+1	+1
$T_{015}$ ( $T_{0A15}$ ) a	0.05	+0.6	+0.65
b		+0.7	
$T_{016}$ ( $T_{0A16}$ )	0.04	+0.05	+0.7
$T_{017}$ ( $T_{0A17}$ )	0.01	0	+0.3
$T_{018}$ ( $T_{0A18}$ )	0	—0.42	—0.2

\*  $m$ : voir Tableau I.

TABLEAU VII

COMPOSITION QUANTITATIVE ET RENDEMENT DES FRAGMENTS OBTENUS PAR  
HYDROLYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME OXYDÉ

Résidus	$T_0$ $3a$	$T_0$ $3b$	$T_0$ 5	$T_0$ 6	$T_0$ 8	$T_0$ 9	$T_0$ 10	$T_0$ 11	$T_0$ 12	$T_0$ 14a	$T_0$ 14b	$T_0$ 15a	$T_0$ 16	$T_0$ 17
Gly			2			I		2	I			I	I	
Ala	3						3						I	I
Ser			I					2				I	I	I
$CySO_3H$	I			I		I	I							
$MetO_2$	I						I							
Thr			I-2					I-2				I		I
Pro												I		
Val									I					
Leu	I	I	I			I	I	I					I	
Ileu			2					2						
Phe									I					2
Tyr			I					I					2	
Try														
Asp			2-3					4			I		3	2
Glu	I		I				I	I					I	2
Lys	I			I	I		I						I	
Arg						I	I	I	I	I	I	I	I	I
His													I	
Total	8	I	12	2	I	4	9	16	4	I	2	5	13	10
Rendement (%) 6 h	35	15	8	35	78	58	17	7	16	10	79	60	19	25
Rendement (%) 24 h	35	15	10	26	92	64	30	5	27	10	86	85	25	25



avec un rendement suffisant permettant l'étude de leurs structures. Ces structures ont été établies pour 9 d'entre eux.

*Structure des peptides  $T_{03a}$ ,  $T_{06}$ ,  $T_{09}$ ,  $T_{010}$ ,  $T_{012}$ ,  $T_{014b}$ ,  $T_{015a}$ ,  $T_{016}$ ,  $T_{017}$*

$T_{03a}$ . L'acide aminé N-terminal,  $\text{CySO}_3\text{H}$ , est déterminé par les méthodes de SANGER et d'EDMAN. Par hydrolyse acide partielle, six peptides ont été obtenus et étudiés (peptides 1 à 6, Tableau VIII). Après action de la carboxypeptidase sur le peptide 5, il a été établi qu'il se détache beaucoup de leucine et un peu moins d'alanine. La structure de ce peptide est donc:  $\text{CySO}_3\text{H.Glu.Ala.Leu}$ . La substance 4 donne naissance, après hydrolyse acide totale, uniquement à de l'alanine. Il ne s'agit pas ici de l'alanine libre ( $R_F = 0.35$  dans A) mais de la séquence Ala.Ala ( $R_F = 0.43$ ).

TABLEAU VIII  
PEPTIDES ISOLÉS À PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE  $T_{03a}$

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0.03	+0.5	Ala <sub>2</sub> , (MetO <sub>2</sub> ), Lys	(Ala <sub>2</sub> , MetO <sub>2</sub> ).Lys
2	0.05	+0.4	(MetO <sub>2</sub> ).Lys	MetO <sub>2</sub> .Lys
3	0.20	0	Ala <sub>2</sub> , (MetO <sub>2</sub> )	
4	0.43	0	Ala	Ala.Ala
5	0.25	—0.6	Ala, $\text{CySO}_3\text{H}$ , Leu, Glu	$\text{CySO}_3\text{H.Glu.Ala.Leu}$
6	0.05	—1.2	$\text{CySO}_3\text{H.Glu}$	$\text{CySO}_3\text{H.Glu}$

\*  $m$ : voir Tableau I.

Sous réserve de présence de tryptophane, dont toutefois aucun produit d'oxydation n'a pu être caractérisé, la structure complète de  $T_{03a}$  peut facilement être déduite des résultats indiqués dans le Tableau VIII:  $\text{CySO}_3\text{H.Glu}^\S\text{.Ala.Leu.Ala.Ala.MetO}_2\text{.Lys}$ .

$T_{06}$ . L'acide aminé N-terminal,  $\text{CySO}_3\text{H}$ , est déterminé par la méthode de SANGER. L'hydrolyse acide totale du DNP-peptide donne, à côté de l'acide DNP-cystéique, uniquement de l' $\epsilon$ -DNP-lysine. La structure de  $T_{06}$  est donc:  $\text{CySO}_3\text{H.Lys}$ .

$T_{09}$ . L'acide aminé N-terminal, Gly, est déterminé par la méthode de SANGER et l'acide aminé C-terminal, Leu, par action de la carboxypeptidase. Par hydrolyse acide partielle 4 peptides ont été isolés et étudiés (peptides 1 à 4, Tableau IX). La méthode de récurrence d'EDMAN a permis de constater qu'aucun acide aminé n'avait échappé à l'analyse. La structure de  $T_{09}$  est donc:  $\text{Gly.CySO}_3\text{H.Arg.Leu}$ . Ce peptide, par suite de la place qu'il occupe dans la molécule de lysozyme, a fait l'objet d'une étude détaillée<sup>21, 27</sup>.

TABLEAU IX  
PEPTIDES ISOLÉS À PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE  $T_{09}$

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0.02	—0.8	Gly, $\text{CySO}_3\text{H}$	Gly.CySO <sub>3</sub> H
2	0.02	—0.15	$\text{CySO}_3\text{H.Arg}$	$\text{CySO}_3\text{H.Arg}$
3	0.08	—0.15	$\text{CySO}_3\text{H.Leu.Arg}$	$\text{CySO}_3\text{H.Arg.Leu}$
4	0.36	+0.8	Leu, Arg	Arg.Leu

\*  $m$ : voir Tableau I.

§ Il n'a pas été déterminé si ce résidu est amidé ou non.

$T_{010}$ . L'acide aminé N-terminal,  $CySO_3H$ , est déterminé par la méthode de SANGER. Par hydrolyse acide partielle, 7 peptides ont été séparés et étudiés (peptides 1 à 7, Tableau X). Toujours sous réserve de présence de tryptophane, dont aucun produit d'oxydation n'a cependant pu être caractérisé, la structure de  $T_{010}$  peut facilement être déduite du Tableau X:  $CySO_3H.Glu^{\S}.Ala.Leu.Ala.Ala.MetO_2.Lys.Arg$ .

$T_{012}$ . L'acide aminé N-terminal, Val, est déterminé par la méthode de SANGER. Par hydrolyse acide partielle, 3 peptides ont été caractérisés (peptides 1 à 3, Tableau XI).

TABLEAU X  
PEPTIDES ISOLÉS À PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE  $T_{010}$

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0	+1.2	Lys, Arg	
2	0	+1	$Ala_2, (MetO_2), Lys, Arg$	
3	0	+0.7	$(MetO_2), Lys, Arg$	$MetO_2, (Lys, Arg)$
4	0.20	0	$Ala_2, (MetO_2)$	
5	0.43	0	Ala	Ala. Ala
6	0.25	-0.6	Ala, $CySO_3H, Leu, Glu$	$CySO_3H. Glu. Ala. Leu$
7	0.05	-1.2	$CySO_3H, Glu$	$CySO_3H. Glu$

\*  $m$ : voir Tableau I.

TABLEAU XI  
PEPTIDES ISOLÉS À PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE  $T_{012}$

Peptides	$R_F(A)$	$m^*(pH\ 6.5)$	Composition	Structure
1	0.07		Gly, Arg	Gly. Arg
2	0.71	0	Gly, Val, Phe	Val. (Gly, Phe)
3	0.80	0	Val, Phe	Val. Phe

\*  $m$ : voir Tableau I.

La présence de tryptophane ou d'un de ses produits d'oxydation a été exclue en déterminant la structure par la méthode de récurrence d'EDMAN: Val.Phe.Gly.Arg.

La structure des peptides  $T_{014b}$ ,  $T_{015a}$ ,  $T_{016}$  et  $T_{017}$  est identique à celle des peptides T6, T7, T8 et T9.

De même, les structures des peptides de la série  $T_0$  et de la série  $T_0A$  sont identiques.

#### DISCUSSION

Tous les acides aminés libres ou peptides isolés après hydrolyse trypsique du lysozyme dénaturé par la chaleur ont été retrouvés parmi les unités tryptiques isolées après hydrolyse du lysozyme oxydé. Parmi ces dernières, trois sont constituées par des acides aminés libres: la lysine ( $T_4$  ou  $T_{08}$ ) est l'acide aminé N-terminal de la protéine; la leucine ( $T_1$  ou  $T_{03b}$ ) est l'acide aminé C-terminal; enfin l'arginine libre ( $T_5$  ou  $T_{014a}$ ) doit provenir d'une liaison Lys.Arg. ou Arg.Arg et semble pouvoir être localisée à la suite du peptide  $T_{03a}$  ( $T_{03a} + T_{014a} = T_{010}$ ). En effet, en établissant les structures des peptides  $T_{03a}$  et  $T_{010}$  on s'est aperçu qu'elles sont identiques, à

<sup>§</sup> Il n'a pas été déterminé si ce résidu est amidé ou non.

la présence d'un résidu d'arginine C-terminal près. Or, il est impossible que ce même enchaînement se retrouve deux fois dans la molécule, puisque le lysozyme ne contient que deux résidus de méthionine et que le deuxième est localisé dans un autre peptide encore à l'étude.

Ce peptide  $T_{010}$ , correspondant à l'enchaînement Cys.Glu.Ala.Leu.Ala.Ala.Met.Lys.Arg, est en bon accord avec le tripeptide Ala.Ala.Met<sup>25</sup>, mais il est en contradiction avec l'enchaînement Asp.Ala.Met.Lys.Cys.Arg proposé par THOMPSON<sup>28</sup>. D'autres contradictions se présentent entre les résultats de cet auteur et ceux du présent travail. L'enchaînement Phe.Glu.Ser.Phe.Asp n'est pas compatible avec l'enchaînement Lys.Phe.Glu.Gly<sup>28</sup> et l'enchaînement Thr.Pro.Gly.Ser.Arg ( $T_7$  ou  $T_{015a}$ ) n'est pas compatible non plus avec l'enchaînement Val.Thr.Pro.Gly.Ala<sup>28</sup>. Pour expliquer partiellement les contradictions qui viennent d'être signalées, on peut remarquer que les peptides étudiés ici ont été obtenus par voie enzymatique, alors que THOMPSON a obtenu, après hydrolyse acide partielle, un mélange complexe de di- et tripeptides dont la position à l'intérieur de la molécule est très difficile à fixer avec certitude.

Le lysozyme ne contient que trois résidus de tyrosine. Or deux d'entre eux sont situés dans le peptide  $T_8$  (ou  $T_{016}$ ) ; il en résulte que  $T_{05}$  n'est qu'une partie de  $T_{011}$  : il ne contient aucun acide aminé basique et son acide aminé C-terminal, Ileu, a été déterminé par action de la carboxypeptidase : sa production correspond donc à une coupure aberrante, peut-être due à la présence d'un enzyme protéolytique étranger dans l'échantillon de trypsine utilisé. Son rendement est toutefois faible.

L'enchaînement N-terminal de la protéine : Lys.Val.Phe.Gly.Arg<sup>29</sup> est constitué, comme il était à prévoir par les deux unités tryptiques : Lys ( $T_4$  ou  $T_{08}$ ) et Val.Phe.Gly.Arg. ( $T_{012}$ ).

Enfin l'enchaînement C-terminal est constitué par l'unité  $T_{09}$  : Gly.Cys.Arg.Leu, et non par l'enchaînement donné par OHNO<sup>30</sup>. Parmi les nombreux arguments qui le démontrent et qui ont déjà été exposés<sup>21, 27</sup>, on peut rappeler : (a) la leucine C-terminale dans le lysozyme est immédiatement précédée d'un résidu d'acide aminé basique, étant donné la spécificité de la trypsine. (b) Le peptide  $T_{09}$  obtenu avec un rendement de 60% est le seul peptide qui possède la leucine comme acide aminé C-terminal, cette leucine étant immédiatement précédée par l'arginine. (c) L'action de la carboxypeptidase sur le DNP-lysozyme conduit, après un temps suffisamment long, à la libération d'une quantité faible mais nette d'arginine, alors que la leucine terminale a déjà été détachée.

La présence d'un résidu d'arginine précédant la leucine C-terminale a été confirmée récemment par THOMPSON<sup>31</sup>.

Les peptides obtenus par hydrolyse tryptique du lysozyme et étudiés dans ce travail ne rendent pas compte de l'ensemble des résidus d'acides aminés de la protéine. D'une part la structure de certaines unités tryptiques n'a pas encore été déterminée et d'autre part les fragments qui contiennent 7 des 8 résidus de tryptophane manquent encore. Il est intéressant à ce sujet de noter qu'il a été possible d'isoler sur papier, après action de la trypsine sur le lysozyme non oxydé, un peptide dont la structure est : Val.Ala.Try.Arg. Ce peptide ne se retrouve pas après chromatographie de l'hydrolysate tryptique sur Dowex-50 X 2 ; comme probablement les autres peptides renfermant le tryptophane (ou ses produits d'oxydation), il reste fortement adsorbé sur la résine et ne pourrait être élué qu'en milieu alcalin.

*Remarques sur la spécificité de la trypsine*

L'action de la trypsine a permis d'isoler un certain nombre de peptides dont la structure a pu être déterminée; en outre, l'étude de cette action a permis de préciser certaines particularités concernant la spécificité de l'enzyme. Tous les peptides obtenus avec un fort rendement présentent un acide aminé basique (lysine ou arginine) comme acide aminé C-terminal, à l'exception du peptide T<sub>0</sub>9. Il convient ici de souligner les différences dans les rendements de leucine libre (leucine C-terminale) provenant de ce peptide; le rendement obtenu après hydrolyse du lysozyme simplement dénaturé est de 50%; ce rendement tombe à 15% dans le cas du lysozyme oxydé. Ce fait peut être expliqué par la présence, à côté de l'arginine, du groupement sulfonique du résidu d'acide cystéique qui par sa forte acidité doit inhiber l'action de la trypsine. De même, on peut sans doute attribuer à l'acidité du groupement carboxylique de l'acide glutamique la résistance à la trypsine de la liaison Lys.Glu dans l'enchaînement du peptide T<sub>0</sub>8 (ou T<sub>0</sub>16); cette même résistance vis-à-vis de la trypsine de la liaison Lys.Glu a été signalée dans la ribonucléase<sup>9</sup>. Il est également intéressant de noter que l'enchaînement Arg.His.Lys<sup>24</sup> a été scindé par la trypsine uniquement entre Arg et His. On pourrait toutefois penser que si le résidu de lysine dont il s'agit ici n'avait pas été engagé dans la liaison Lys.Glu difficile à rompre, une certaine quantité du peptide His.Lys eut été trouvée. En tout cas, on n'a pas décelé la présence de histidine libre. Le peptide T<sub>0</sub>10 contient deux résidus basiques, l'enchaînement C-terminal étant Lys.Arg. Au cours de l'étude de la structure de l'ACTH<sup>32</sup> il a été également constaté que la trypsine a quelque difficulté à couper les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de la lysine ou de l'arginine, si ces deux acides aminés sont suivis d'un autre acide aminé basique.

Enfin on peut noter qu'aucune réaction de transpeptidation ne semble avoir eu lieu au cours de l'hydrolyse trypsique telle qu'elle a été décrite, bien que ces réactions soient à craindre dans toute expérience faisant appel aux enzymes protéolytiques. D'une part, presque tous les peptides sont obtenus avec un rendement d'au moins 10%; il semble peu probable qu'un peptide résultant d'une réaction de transpeptidation soit obtenu avec un tel rendement; de plus si l'on prolonge l'hydrolyse trypsique jusqu'à 24 heures, on retrouve les mêmes produits, et les mêmes seulement, que dans le cas d'une hydrolyse de 6 heures. D'autre part, une transpeptidation par la trypsine conduirait très probablement à la formation de peptides ayant plus d'un résidu d'acide aminé basique par molécule. Or parmi le grand nombre de peptides étudiés, deux seulement contiennent deux acides aminés basiques. Les deux fois, il s'agit de liaisons que la trypsine hydrolyse difficilement non seulement dans le cas du lysozyme, mais aussi dans le cas d'autres protéines. Il semble donc improbable qu'elles puissent être facilement synthétisées par action de l'enzyme.

## RÉSUMÉ

L'hydrolysats trypsique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule dénaturé par la chaleur a été fractionné en 9 pics sur une colonne de Dowex-50  $\times$  2. Chaque pic est dessaliné, purifié et analysé. A côté de trois acides aminés libres (leucine, lysine et arginine), quatre peptides ont été obtenus avec un fort rendement et leur structure chimique a été déterminée.

L'hydrolysats trypsique du lysozyme oxydé par l'acide performique a été fractionné en 18 pics. La structure chimique de neuf peptides ainsi caractérisés a été établie, l'enchaînement C-terminal en faisant partie.

La spécificité de la trypsine dans le cas du lysozyme est discutée à la lumière de ces résultats.

## SUMMARY

The tryptic hydrolysate of egg-white lysozyme denatured by heating has been fractionated into nine units on a Dowex-50 X 2 column. Each unit has been desalted, purified and analysed. Along with three free amino acids (leucine, lysine and arginine), four peptides have been obtained in a high yield and their chemical structure has been established.

The tryptic hydrolysate of lysozyme oxidized by performic acid has been fractionated into 18 units. The chemical structure of nine of these peptides, one of them containing the C-terminal chain of the original protein, has been established.

The specificity of trypsin, in the case of lysozyme, is discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. L. FEVOLD, *Advances in Protein Chem.*, 6 (1951) 187.
- <sup>2</sup> A. R. THOMPSON, *Biochem. J.*, 60 (1955) 507.
- <sup>3</sup> G. ALDERTON, H. WARD ET H. L. FEVOLD, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 43.
- <sup>4</sup> L. GORINI, F. FÉLIX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 283.
- <sup>5</sup> D. D. VAN SLYKE ET J. M. NEILL, *J. Biol. Chem.*, 61 (1924) 523.
- <sup>6</sup> J. M. MUELLER, J. G. PIERCE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 857.
- <sup>7</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- <sup>8</sup> C. E. DALGLIESH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 3.
- <sup>9</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
- <sup>10</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 893.
- <sup>11</sup> A. DRÈZE ET A. DE BOECK, *Arch. intern. physiol.*, 60 (1952) 201.
- <sup>12</sup> H. G. KUNKEL ET A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
- <sup>13</sup> A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH ET R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 541.
- <sup>14</sup> E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- <sup>15</sup> A. POLSON, V. M. MOSLEY ET R. W. G. WYCKOFF, *Science*, 105 (1948) 603.
- <sup>16</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 511.
- <sup>17</sup> G. BIZERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- <sup>18</sup> M. ROVERY ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 541.
- <sup>19</sup> P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 283, 700.
- <sup>20</sup> P. JOLLÈS ET J. THAUREAUX, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1685.
- <sup>21</sup> J. THAUREAUX ET P. JOLLÈS, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1926.
- <sup>22</sup> R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- <sup>23</sup> U. R. LAURILA, *Thèse d'Ing.-Doct.*, Paris, 1955.
- <sup>24</sup> R. ACHER, J. THAUREAUX, C. CROCKER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 339.
- <sup>25</sup> R. ACHER, U. R. LAURILA ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 97.
- <sup>26</sup> P. JOLLÈS, J. JOLLÈS-THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- <sup>27</sup> P. JOLLÈS, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 290.
- <sup>28</sup> A. R. THOMPSON, *Biochem. J.*, 61 (1955) 253.
- <sup>29</sup> R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 151.
- <sup>30</sup> K. OHNO, *J. Biochem. (Japan)*, 42 (1955) 615.
- <sup>31</sup> E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 210.
- <sup>32</sup> P. H. BELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5565.

Reçu de 29 juillet, 1957