

ACTION COMPARÉE DE TROIS LYSOZYMES D'ORIGINE
DIFFÉRENTE SUR DES SUBSTRATS GLYCOPEPTIDIQUES ISOLÉS DE
MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS

PIERRE JOLLÈS

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

(Reçu le 30 juillet, 1962)

SUMMARY

*Comparative action of three lysozymes of different origin on two glycopeptidic substrates isolated from *Micrococcus lysodeikticus**

Two soluble purified glycopeptidic substrates of lysozyme were isolated and analyzed. Hen's egg-white lysozyme, duck's egg-white lysozyme and human milk lysozyme hydrolyze these substrates: this fact seems to confirm that the three lysozymes which are analogous but not identical substances are β -glucosaminidases (*N*-acetylmuramide glycanohydrolases). Their kinetics of action are, however, different. Duck's egg-white lysozyme is the most active one: chromatographic experiments and amino acid analyses have shown that this last enzyme has a higher content of basic amino acids than the others. These basic amino acids seem to play an important role in the biological activity of lysozymes.

INTRODUCTION

Il est actuellement admis que le lysozyme de blanc d'oeuf de poule est une glucosaminidase ou *N*-acetylmuramide glycanohydrolase, scindant la liaison β ($1 \rightarrow 4$) entre l'acide *N*-acetylmuramique et la *N*-acetylglucosamine¹⁻³. Récemment, COLOBERT ET DIRHEIMER⁴ ont étudié la cinétique d'hydrolyse par le lysozyme de blanc d'oeuf de poule d'un substrat soluble hautement purifié qu'ils ont préparé à partir de *Micrococcus lysodeikticus*. Or, un grand nombre de lysozymes avaient été isolés à partir d'organes ou de liquides d'origines diverses et certains d'entre eux avaient été préparés à l'état chromatographiquement pur⁵. Tous ces lysozymes ont en commun les propriétés suivantes: ce sont des protéines basiques, stables en milieu acide même à température élevée pendant un temps très court, labiles en milieu alcalin, lysant des suspensions de *M. lysodeikticus*. Par contre, leur composition quantitative en acides aminés varie d'un lysozyme à l'autre, ce qui doit entraîner des différences dans leur structure^{5,6}. Le but du présent travail était de montrer que malgré ces différences, des lysozymes d'origine différente, ont un comportement comparable non seulement vis-à-vis d'une suspension de bactéries, mais aussi vis-à-vis d'un substrat hautement purifié, et que tous ces enzymes peuvent être classés parmi les β -glucosaminidases.

Pour cette étude comparée, on a choisi à côté du lysozyme de blanc d'œuf de poule, un lysozyme d'origine très voisine: le lysozyme de blanc d'œuf de cane⁷ et un lysozyme d'origine très différente, le lysozyme de lait de femme⁸.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Les lysozymes

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule provient de la Maison Armour, Kankakee, Ill. (U.S.A.). Le lysozyme de blanc d'œuf de cane a été préparé à l'état chromatographiquement pur par passage sur Amberlite CG-50 par JOLLÈS ET SPOTORNO⁷. La préparation du lysozyme de lait de femme a été décrite par JOLLÈS ET JOLLÈS⁸.

Dosage de l'activité enzymatique

La réaction enzymatique a été suivie par l'augmentation du pouvoir réducteur. Celui-ci a été dosé par la méthode de SOMOGYI⁹. 1 ml de mélange réactionnel contient 7 mg de substrat dans 0.5 ml d'eau, 0.25 ml d'une solution tampon de phosphates 0.2 M (pH 5.8) et 0.25 ml de solution de lysozyme dans l'eau à la concentration de 48 µg azote/ml. La concentration finale en NaCl est de 0.066 M (ou de 0.12 M). L'hydrolyse est suivie à 37° en prélevant des échantillons de 0.2 ou 0.3 ml à des instants déterminés. Le pH choisi (5.8) correspond au pH optimum du lysozyme de blanc d'œuf de poule, du lysozyme de lait de femme et du lysozyme de rate de chien.

Préparation du substrat

Le substrat a été préparé à partir de *Micrococcus lysodeikticus* suivant COLOBERT⁴.

Les acides aminés ont été dosés avec un Autoanalyseur Technicon suivant la méthode de PIEZ ET MORRIS¹⁰.

Les glucides ont été dosés par la méthode de SCHULTZE¹¹ après une hydrolyse de 2 h à 110° avec 1 N HCl.

Les sucres aminés ont été dosés globalement par la méthode de MORGAN ET ELSON modifiée par RIMINGTON¹² après une hydrolyse de 4 h à 110°, avec 2 N HCl. Pour séparer quantitativement les divers sucres aminés, l'hydrolysat a été soumis à une chromatographie sur colonne d'Amberlite CG-120 de 20 × 1 cm. L'élution est d'abord effectuée par fractions de 1 ml, avec 0.2 N HCl. La glucosamine est élue entre le 80ème et le 90ème millilitre; la galactosamine le serait entre le 90ème et le 100ème millilitre. L'acide muramique peut ensuite être immédiatement élue avec N HCl. Les diverses fractions sont dosées par le réactif de MORGAN ET ELSON. Dans un mélange témoin 95 % de la glucosamine hydrolysée et chromatographiée ont été récupérés.

RÉSULTATS

Purification du substrat

A partir de 10 g de poudre acétonique de *Micrococcus lysodeikticus*, 500 mg de substrat ont été obtenus. Comme l'ont indiqué COLOBERT ET DIRHEIMER⁴, ce substrat peut être séparé en deux fractions grâce à une chromatographie sur DEAE-cellulose. Mais, contrairement à ce que ces auteurs ont affirmé, les deux fractions sont sensibles à l'action du lysozyme de blanc d'œuf de poule. 200 mg de substrat ont été chromatographiés sur une colonne de DEAE-cellulose de 30 × 1 cm tamponnée à pH 7.2, avec une solution tampon de phosphates 0.066 M; la première fraction sensible au lysozyme

(Substrat 1) est éluée avec cette solution tampon, la deuxième fraction sensible au lysozyme (Substrat 2) est éluée avec une solution tampon citrate de sodium-HCl 0.1 M de pH 2.8. Les deux substrats ont été caractérisés par le dosage de SCHULTZE sans que l'on ait besoin de procéder à une hydrolyse préalable. A partir de 200 mg de substrat brut, on obtient après une dialyse de 48 h à + 2° contre de l'eau distillée environ 50 mg de substrat 1 et 50 mg de substrat 2. La dialyse prolongée augmente sensiblement le pourcentage des acides aminés et des sucres aminés des deux substrats.

Analyse chimique des substrats No. 1 et No. 2.

Les deux substrats contiennent qualitativement les mêmes constituants, à savoir: l'acide glutamique, le glycocolle, l'alanine et la lysine comme acides aminés, avec des traces d'acide aspartique et de thréonine; la glucosamine et l'acide muramique comme sucres aminés; le glucose comme seul glucide présent en quantité importante. Les pourcentages et rapports moléculaires de tous ces constituants sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I
POURCENTAGE ET RAPPORT MOLÉCULAIRE DES CONSTITUANTS DES SUBSTRATS
1 ET 2 ISOLÉS DE *Micrococcus lysodeikticus*

Acide aminé ou sucre	Substrat 1		Substrat 2	
	Pourcentage	Rapport moléculaire	Pourcentage	Rapport moléculaire
Glu	3.15	1.75	1.72	1.6
Gly	0.92	1.0	0.55	1.0
Ala	3.45	3.0	1.87	2.9
Lys	5.22	3.0	4.78	4.6
Glucosamine	6.5	3.0	4.55	3.7
Acide muramique	9.25	3.0	6.65	3.7
Osamines (totales)	(5.05)		(6.7)	
Glucides (Schultze)	25.0		18.0	

Le substrat 1 contient un pourcentage plus élevé d'acides aminés et de sucres aminés; les rapports moléculaires des divers constituants sont sensiblement les mêmes dans les deux substrats, à l'exception de ceux concernant les sucres aminés relativement plus abondants dans le substrat 2. Les résultats indiqués pour les glucides totaux n'ont qu'une valeur indicative et sont sans doute très inférieurs à la réalité. Comme l'a montré GHUYSEN¹³, il est extrêmement difficile d'obtenir par voie chimique seule, des valeurs définitives.

Activité comparée à un même pH des lysozymes sur les substrats 1 et 2.

Colobert a établi que la vitesse de lyse de *M. lysodeikticus* par le lysozyme dépend de la force ionique du milieu réactionnel¹⁴. Pour la présente étude comparée, les conditions optima établies dans le cas du lysozyme de blanc d'œuf de poule⁴ pour une rapide augmentation du pouvoir réducteur ont été choisies. La Fig. 1 montre la cinétique de l'hydrolyse des deux substrats, par les trois lysozymes à pH 5.8: en l'absence de lysozyme, aucune apparition de groupements réducteurs n'a pu être mise en évidence. Par contre, chaque lysozyme hydrolyse chacun des deux substrats, très rapidement, et de façon similaire. Les trois lysozymes semblent donc bien appartenir

à la famille des β -glucosaminidases. Leurs vitesses d'action sont cependant différentes. Cela ressort de l'allure des courbes de la Fig. 1; en effet, les trois lysozymes utilisés ont un poids moléculaire et une teneur en azote voisins, respectivement 15000 et 18%, et la même quantité d'enzyme exprimée en azote agit sur la même quantité de substrat.

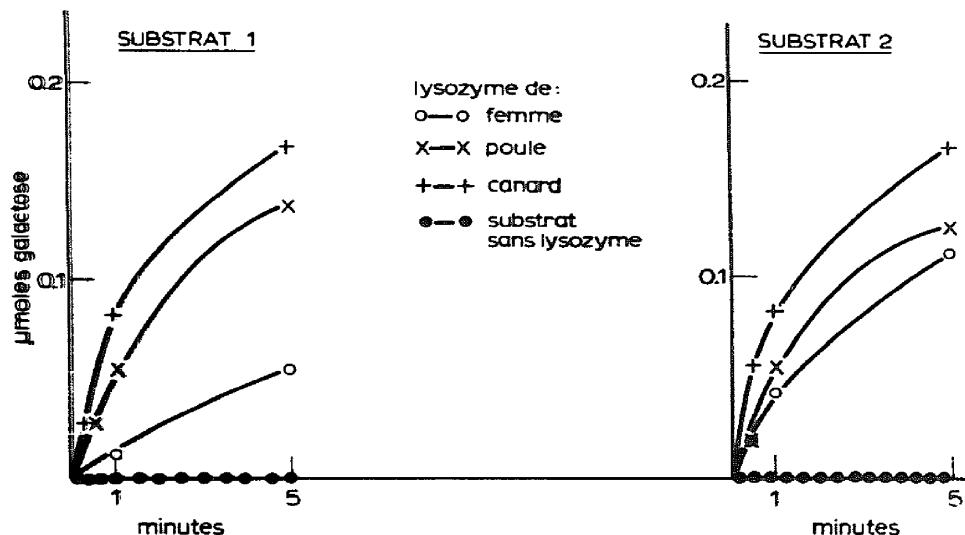


Fig. 1. Cinétique de l'hydrolyse des substrats par trois lysozymes d'origine différente.

Lorsqu'on augmente de 0.066 M à 0.12 M la concentration en NaCl de la solution tampon servant de milieu réactionnel à l'action des lysozymes sur les substrats, on aboutit au même résultat: le lysozyme de blanc d'œuf de cane a toujours la vitesse d'action la plus grande et celui du lait de femme la plus petite.

Enfin l'augmentation du pouvoir réducteur est proportionnelle à la quantité de lysozyme exprimée en μ g d'azote mise en jeu.

DISCUSSION

Les substrats isolés de *M. lysodeikticus* et décrits dans ce travail sont plus riches en acides aminés que le substrat analysé par COLOBERT; les rapports moléculaires sont les mêmes, sauf en ce qui concerne la lysine. Les substrats 1 et 2 ont des teneurs égales en glucosamine et en acide muramique: ce résultat est en accord avec ce que l'on sait de la spécificité d'action du lysozyme³. Il serait intéressant dans un travail ultérieur de préparer, à partir des substances décrites ici, des substrats moins riches en acides aminés ou même n'en contenant pas du tout.

En effet, pendant une courte période (50 sec), la cinétique d'hydrolyse (Fig. 1) est d'ordre zéro, puis la vitesse se ralentit beaucoup plus rapidement que dans une cinétique d'ordre 1. Il semble bien cependant que dans les conditions où nous nous sommes placés, il n'y ait pas formation de complexes électrostatiques entre les trois lysozymes et les produits de dégradation des deux substrats capables de limiter les vitesses initiales d'hydrolyse: les expériences faisant appel à des solutions tampons avec différentes teneurs en NaCl ne modifient pas en effet celles-ci. Les différences

d'activité enzymatique observées semblent donc bien des différences intrinsèques et non pas la conséquence de l'intervention de réactions secondaires.

Il est remarquable d'autre part que l'activité des trois lysozymes étudiés varie dans le même sens que leur basicité. Les analyses quantitatives ont montré que le lysozyme de blanc d'œuf de cane⁷ qui est le plus actif est le plus riche en acides aminés basiques; le lysozyme de lait de femme¹⁵ est le moins actif des trois et il est le moins basique.

Enfin, et dans le même ordre d'idées, au cours de la chromatographie vraie⁸ sur colonne d'Amberlite CG-50, le lysozyme de cane se chromatographie à pH 7.58, le lysozyme de poule à pH 7.18 et le lysozyme de femme à pH 6.98 quand on utilise des colonnes de même grandeur et des solutions tampons de phosphates 0.2 M; à nouveau, le lysozyme de cane se comporte comme l'enzyme le plus basique.

Un quatrième lysozyme, celui de rate de chien, se chromatographie¹⁶ dans les conditions précédentes à pH 6.50; son point isoélectrique (9.5-10) n'est pas aussi élevé que celui du lysozyme de blanc d'œuf de poule (10.5-11). Une étude préliminaire utilisant non pas un substrat purifié mais soit la poudre acétonique de *M. lysodeikticus*, soit des parois de *B. megaterium* avait montré que là encore, le lysozyme le plus basique -- celui de blanc d'œuf de poule -- agissait le plus rapidement¹⁷.

Comme dans la zone des pH utilisés le substrat se comporte comme une substance acide, on pouvait s'attendre à ce que la basicité d'un lysozyme -- propriété commune à tous les lysozymes actuellement étudiés -- favorise la formation du complexe enzyme -- substrat et intervienne dans la vitesse d'action initiale. Ce caractère de plus ou moins grande basicité d'un lysozyme pourrait être localisé dans une portion restreinte de la molécule -- sorte de centre actif basique, facilement accessible, qui serait responsable du comportement chromatographique d'un lysozyme sur la résine Amberlite CG-50 et aussi de la vitesse d'action vis-à-vis d'un substrat. Mais, en l'état actuel de nos recherches, l'intervention d'un autre facteur différent de la basicité et déterminant le rendement final de l'hydrolyse enzymatique est probable. L'étude de la spécificité des différents lysozymes vis-à-vis d'un même substrat purifié est en cours. Un travail préliminaire a montré que qualitativement ils peuvent tous donner naissance à un disaccharide contenant de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylmuramique¹⁸.

Notons enfin qu'à côté de la basicité un deuxième facteur est nécessaire à l'activité des lysozymes qui résistent à un chauffage de courte durée à 100°: il s'agit de la présence et du maintien d'au moins deux ponts ..S-S.. formés par des résidus de cystine¹⁵.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention accordée par le U.S. Department of Agriculture (grant FG-Fr-106).

L'auteur est aussi heureux de remercier Madame J. CALMETTES de sa précieuse collaboration technique.

RÉSUMÉ

1. L'isolement à partir de *Micrococcus lysodeikticus* de deux substrats solubles du lysozyme est décrit. L'analyse de ces substrats est rapportée.

2. Trois lysozymes d'origine différente (lysozyme de blanc d'œuf de poule, de blanc d'œuf de cane, de lait de femme) hydrolysent ces substrats. Bien que leurs

compositions en acides aminés soient différentes, ils se comportent de manière analogue sur ces substrats, ce qui permet de penser qu'ils sont tous les trois des β -glucosaminidases (N -acétyl-muramide glycanohydrolases). En revanche, leurs vitesses d'action sont différentes.

3. La richesse en acides aminés basiques semble jouer un rôle essentiel dans l'activité d'un lysozyme. Pour un même pH (5.8), plus un lysozyme est basique, plus grande est sa vitesse d'action initiale.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. R. BERGER ET R. S. WEISER, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 517.
- ² W. BRUMFITT, A. C. WARDLAW ET J. I. PARK, *Nature*, 181 (1958) 1783.
- ³ M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 552.
- ⁴ L. COLOBERT ET G. DIRHEIMER, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 455.
- ⁵ P. JOLLÈS, IN P. D. BOYER, H. LARDY AND K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 4, Academic Press, New York, 1960, p. 431.
- ⁶ P. JOLLÈS ET S. ZUILI, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 212.
- ⁷ P. JOLLÈS ET G. SPOTORNO, résultats inédits.
- ⁸ P. JOLLÈS ET J. JOLLÈS, *Nature*, 192 (1961) 1187.
- ⁹ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 61.
- ¹⁰ K. A. PIEZ ET L. MORRIS, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 187.
- ¹¹ H. E. SCHULTZE, R. SCHMIEDTBERGER ET R. HAUPT, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 490.
- ¹² C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 931.
- ¹³ J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 413.
- ¹⁴ L. COLOBERT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 1155.
- ¹⁵ P. JOLLÈS ET J. JOLLÈS, expériences inédites.
- ¹⁶ P. JOLLÈS ET M. LEDIEU, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 100.
- ¹⁷ S. ZUILI ET P. JOLLÈS, *Compt. Rend.*, 250 (1960) 3521.

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 505-510