

68. Nouvelles données concernant le lysozyme de blanc d'œuf d'Oie: teneur en tryptophane, stabilité et spécificité¹⁾

par Anne-Christine Dianoux et Pierre Jollès

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 96, Bd. Raspail, Paris 6^e

(24 I 69)

Summary. New data concerning the tryptophan content, the stability, and the specificity of goose egg-white lysozyme are reported. This enzyme occupies a special place among the mammalian lysozymes already studied and the general definition of a lysozyme had to be modified. The mechanism of action is discussed.

Introduction. – Les différents lysozymes (EC 3.2.1.17) de vertébrés étudiés jusqu'à ce jour par le groupe de JOLLÈS (lysozymes de blancs d'œuf d'Oiseaux; lysozymes de rate et de rein de Vertébrés; une dizaine de lysozymes de différents tissus ou organes d'origine humaine) [2] possédaient les propriétés suivantes: 1) poids moléculaire d'environ 15.000; 2) pH isoélectrique élevé; 3) stabilité en milieu acide, même à 100°, pendant un temps court; 4) labilité en milieu alcalin; 5) faculté de lyser un nombre restreint de bactéries dont *Micrococcus lysodeikticus* est le représentant classique; 6) digestion à pH 6,2 de différents saccharides (exemples: le tétrasaccharide acide N-acétyl- β -D-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-N-acétyl- β -muraminyl-(1 \rightarrow 4)-N-acétyl- β -D-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-N-acétylmuramique, NAG–NAM–NAG–NAM; le tétrasaccharide chitotétraose, NAG–NAG–NAG–NAG) avec formation de produits de transglycosylation. Récemment DIANOUX & JOLLÈS [3] avaient décrit le lysozyme de blanc d'œuf d'Oie qui ne possédait pas toutes les propriétés rencontrées jusqu'à ce jour chez tous les autres lysozymes. Il lysait très rapidement les substrats de haut poids moléculaire comme les cellules de *M. lysodeikticus*, mais son action s'arrêtait rapidement et les substrats classiques de faible poids moléculaire comme les tétrasaccharides mentionnés ci-dessus, n'étaient pas digérés à pH 6,2. De plus ce lysozyme n'était pas stable à température élevée pendant un temps court comme l'étaient les autres lysozymes de blanc d'œuf d'oiseaux ou d'origine humaine. Sa faible teneur en cystine en était très probablement responsable. De plus la détermination de la teneur en tryptophane (2–3 résidus/molécule [3]) avait été particulièrement difficile; elle était d'autant plus importante que PHILLIPS [4] avait signalé la présence de trois résidus de tryptophane dans le site actif du lysozyme de blanc d'œuf de Poule. Dans le présent mémoire nous allons rapporter les résultats d'une nouvelle série d'expériences ayant trait à la teneur en tryptophane, à la stabilité et à la spécificité du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie.

Matériel et méthodes. – Le lysozyme de blanc d'œuf d'Oie a été préparé suivant le procédé décrit par DIANOUX & JOLLÈS [3]. L'activité lysante a été déterminée vis-à-vis d'une suspension de *M. lysodeikticus* selon la méthode de JOLLÈS et col. [5]: le lysozyme de blanc d'œuf de Poule (ARMOUR, Kankakee, Ill., USA, lot 642) a servi comme lysozyme témoin tout au long de ces recherches. Le tryptophane a été déterminé soit par la méthode d'EDELHOCH [6] soit par la comparaison des spectres UV. (dans l'acide acétique 0,1M) de l'enzyme et de solutions d'acides aminés

¹⁾ 66^{me} communication sur les lysozymes; 65^{me} communication [1].

contenant la même quantité de tyrosine et de phénylalanine que le lysozyme d'Oie et une quantité de tryptophane variable.

La stabilité de l'enzyme dans l'acide acétique 0,1M a été étudiée en fonction du temps (0 à 6 h) à différentes températures (37° à 80°) par des dosages de l'activité lysante (prélèvements contenant au départ environ 8 μ g de lysozyme). D'autres essais ont été effectués à différents pH (5 à 9) et à 20°.

La spécificité de l'enzyme a été étudiée à différents pH vis-à-vis de cellules de *M. lysodeikticus* (poudre acétonique; cultures effectuées au laboratoire). On prépare autant d'échantillons que l'on veut mesurer de temps d'incubation. A 2 mg de *M. lysodeikticus* (poudre acétonique) dans 0,3 ml d'acétate d'ammonium 0,1M, on ajoute 0,3 ml d'acide acétique 0,1M ou d'eau contenant la quantité de lysozyme nécessaire pour obtenir un rapport enzyme/substrat égal à $1/20$ ou $1/100$. Le pH du milieu peut être légèrement modifié par addition de pyridine ou d'acide acétique. Le milieu réactionnel est ensuite incubé à 37° pendant des temps variant de 0 à 24 h en présence d'une goutte de toluène. Après centrifugation de l'hydrolysat enzymatique, le surnageant est lyophilisé. La séparation des produits de la réaction est effectuée par chromatographie descendante sur papier WHATMAN N° 1 pendant 40 h dans le solvant: *n*-butanol-acide acétique-eau (25:6:25, *v/v*). Le chromatogramme est révélé par trempage dans une solution composée de 20 ml d'eau contenant 20 g de soude caustique, 600 ml d'alcool et 400 ml de *n*-propanol. Après séchage au four pendant 10 min, des taches fluorescentes sont observées en lumière ultraviolette [7].

Résultats

Teneur en tryptophane du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie. – Méthode de EDELHOCH. Par cette méthode, il a été possible de déterminer la présence de 2,75 résidus de tryptophane par molécule de poids moléculaire 14.300. Un dosage effectué en même temps avec le lysozyme de blanc d'œuf de Poule a permis de caractériser 5,63 résidus par molécule (valeur théorique: 6 résidus [2]).

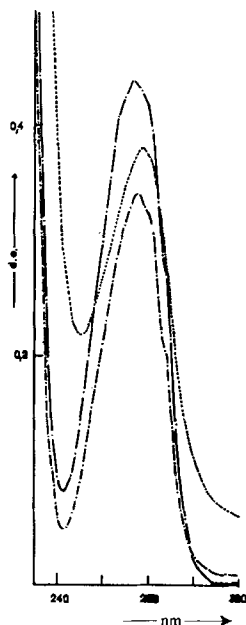


Fig.1. Spectres ultra-violet du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie $1,6 \cdot 10^{-5}$ M (.....) et de solutions contenant des quantités de Tyr et de Phe équivalentes à celles du lysozyme d'Oie et des quantités de Trp égales à 2 résidus (---) et à 3 résidus (—) par mole de 14,300

Par spectrométrie ultra-violette. La figure 1 indique le spectre ultra-violet du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie (Tyr/Phe: 6/2) et deux autres spectres de solutions

contenant des quantités de tyrosine et de phénylalanine équivalentes à celles rencontrées dans le lysozyme d'Oie et des quantités de tryptophane correspondant respectivement à 2 et 3 résidus par molécule (quantité calculée pour un poids moléculaire de 14.300). Il apparaît clairement que la teneur en tryptophane du lysozyme d'Oie est supérieure à 2 résidus par molécule. Cette méthode de dosage des résidus de tryptophane s'est révélée parfaitement valable dans le cas de tous les lysozymes étudiés jusqu'à ce jour, en dépit du fait que les résidus de tryptophane engagés dans une chaîne peptidique doivent avoir un comportement différent de celui de l'acide aminé libre.

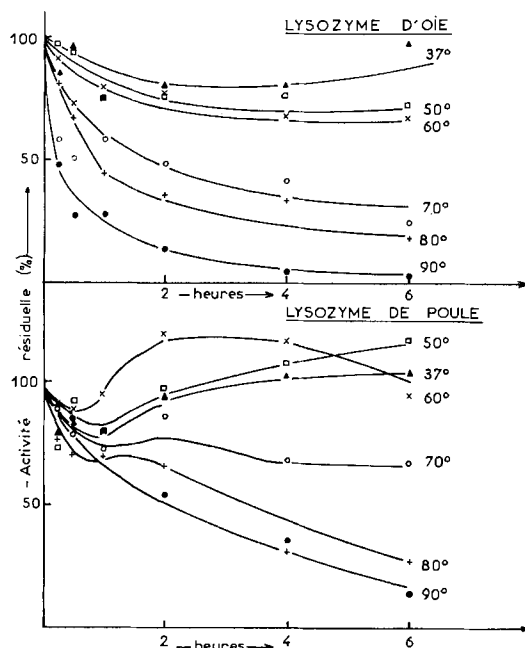


Fig. 2. Stabilité à différentes températures et en fonction du temps des lysozymes de blanc d'œuf d'Oie et de blanc d'œuf de Poule dans l'acide acétique 0,1 M

Stabilité du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie à la chaleur en milieu acide. La figure 2 montre qu'au delà de 60° le lysozyme d'Oie est peu stable à la chaleur en milieu acide (acide acétique 0,1M). Ce comportement ne cadre pas avec la définition d'un lysozyme telle qu'elle a été admise jusqu'ici (voir introduction): elle sera discutée plus loin.

Comportement du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie à 20° en fonction du temps et du pH. A 20° et à pH 5 (solution tampon d'acétate de sodium 0,05M), l'activité reste stable pendant 24 h et même au-delà (72 h). A pH 6 (solution tampon de phosphates 0,05M), l'activité diminue de 25% en une heure puis se maintient constante jusqu'à 72 h. A pH 7,5 (solution tampon de phosphates 0,05M), la diminution de l'activité est d'environ 40% après 24 h. Par contre, l'activité lysante est presque complètement perdue à pH 9 (solution tampon TRIS-HCl 0,05M): pertes de 60% après 6 h, 75% après 24 h, 80% après 72 h.

Spécificité du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie vis-à-vis de cellules de Micrococcus lysodeikticus. Lors de l'action du lysozyme de Poule sur des cellules de *M. lysodeikticus* à pH 6,2, le disaccharide NAG-NAM et le tétrasaccharide NAG-NAM-NAG-NAM se forment rapidement.

Avec le lysozyme d'Oie, la situation est tout différente. A pH 6,2, les cellules sont attaquées puisque c'est ainsi que l'on dose quantitativement cet enzyme; mais les saccharides NAG-NAM et NAG-NAM-NAG-NAM ne se forment pas. Aussi, nous avons essayé de digérer le substrat à des pH plus acides. Comme le montre la figure 3, à pH 4,7 on n'obtient que des traces de NAG-NAM-NAG-NAM, et pas de NAG-NAM;

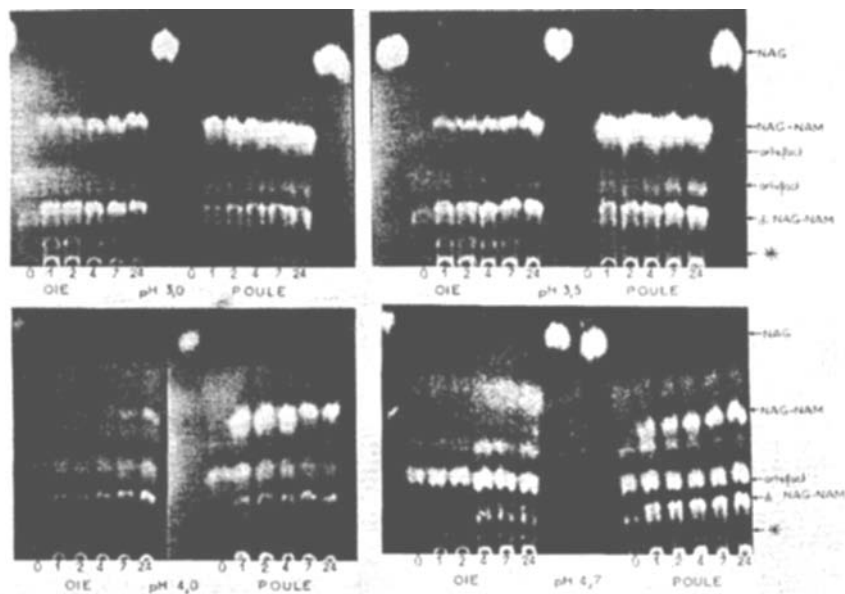


Fig. 3. Caractérisation par chromatographie sur papier (voir partie expérimentale) des substances obtenues à différents pH par action des lysozymes de blanc d'œuf d'Oie et de Poule sur des cellules de *Micrococcus lysodeikticus*

(di-NAG-NAM: tétrasaccharide NAG-NAM-NAG-NAM; *: produits de transglycosylation ou saccharides comportant plus de 4 sucres)

des produits de haut poids moléculaire sont visibles près du point de départ. Lorsqu'on abaisse le pH de la digestion (successivement 4; 3,5; 3) on voit croître la formation du tétrasaccharide et apparaître à pH 3,5 le disaccharide; les produits de haut poids moléculaire (produits de transglycosylation?) sont toujours présents.

Discussion. — La définition d'un lysozyme telle qu'elle figure dans l'Introduction a été établie il y a plusieurs années. Elle paraît aujourd'hui trop vaste non seulement lorsque l'on considère les différents types de lysozymes qui viennent d'être caractérisés (lysozymes de vertébrés [2], lysozymes de phages [8], lysozymes de plantes comme de *Papaya latex* [9] ou de navet [10], lysozymes d'invertébrés [11]) mais aussi lorsque l'on compare les lysozymes à l'intérieur d'un même type. Le présent mémoire montre, en effet, que le lysozyme de blanc d'œuf d'Oie occupe une place spéciale parmi les lyso-

zymes de vertébrés: il n'est pas stable à la chaleur même en milieu acide, probablement à cause de sa faible teneur en cystine [12], et ne digère pratiquement pas les courts saccharides mentionnés plus haut [3] [13] qui sont des substrats pour les autres lysozymes de vertébrés isolés jusqu'à ce jour; enfin, il ne semble pas donner naissance à des produits de transglycosylation. De plus, la lyse de ce lysozyme d'Oie n'est pas inhibée par la N-acétylglucosamine, comme c'est le cas pour les autres lysozymes de vertébrés [14].

A la lumière de ces faits, nous suggérons qu'un enzyme pour être rangé parmi les lysozymes doit posséder en premier lieu la propriété de lyser facilement, et sans traitement préalable, un certain nombre de bactéries parmi lesquelles il faut ranger en première ligne *Micrococcus lysodeikticus* (rupture de liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre deux résidus de sucres aminés dans les substrats de poids moléculaire élevé); il doit se comporter, en outre, comme une faible chitinase (EC 3.2.1.14). Cet enzyme, par ailleurs, a le plus souvent un poids moléculaire compris entre 14.500 et 25.000, ainsi qu'un caractère plutôt basique et il est labile en milieu alcalin. L'utilisation d'un substrat de faible poids moléculaire pour la recherche d'un lysozyme dans un milieu non encore étudié peut donc être la cause d'erreurs, que ce substrat provienne des bactéries comme le tétrasaccharide NAG-NAM-NAG-NAM ou de la chitine comme les polymères de la N-acétylglucosamine (chitotétraose).

En dépit de son comportement spécial, le lysozyme de blanc d'œuf d'Oie semble posséder un site actif assez semblable à celui des autres lysozymes de Vertébrés étudiés jusqu'à ce jour. D'une part il possède trois résidus de tryptophane, et PHILLIPS [4] avait signalé la présence de trois résidus de cet acide aminé dans le site actif du lysozyme de blanc d'œuf de Poule. D'autre part l'étude de l'influence du pH sur la lyse de *M. lysodeikticus* [15] a montré que le mécanisme d'action doit être semblable à celui proposé par PHILLIPS pour le lysozyme de blanc d'œuf de Poule (participation des résidus d'acide aspartique N° 52 et d'acide glutamique N° 35 dans l'attaque du substrat polysaccharidique). Cependant le site actif du lysozyme de blanc d'œuf d'Oie doit présenter certaines particularités; en effet la N-acétylglucosamine, qui est un inhibiteur de tous les autres lysozymes de vertébrés étudiés jusqu'à ce jour, est sans effet vis-à-vis de notre enzyme [14]. Signalons enfin sa grande labilité non seulement à température élevée ou en milieu alcalin, mais aussi au cours de certains traitements comme une concentration à pH 3, ainsi que cela a pu être entrevu au cours de quelques essais de détermination de la constante de sédimentation.

Ce travail a été effectué dans le cadre de l'équipe de recherche N° 17 du C.N.R.S. Les auteurs sont heureux de remercier Monsieur G. MONACHON, I.N.R.A., Artiguères par Benquet, Landes (France), des œufs d'Oie qu'il a mis à leur disposition, et la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE, Bâle, de son aide généreuse. Ces recherches constituent une partie de la thèse de Doctorat ès Sciences (Université de Paris) de l'un des auteurs (A.-C.D.) (N° AO 2783).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. JOLLÈS, Soumis à Biochem. Biophys. Res. Commun. (1969).
- [2] P. JOLLÈS, Angew. Chem. intern. Ed. 3, 28 (1964); Exp. ann. Biochimie méd. 27, 1 (1966); Bull. Soc. Chim. biol. 49, 1001 (1967). Angew. Chem. 81 (1969), sous presse.
- [3] A.-C. DIANOUX & P. JOLLÈS, Biochim. biophys. Acta 133, 472 (1967).
- [4] D.C. PHILLIPS, Scient. Amer. 215, 78 (1966).
- [5] P. JOLLÈS, D. CHARLEMAGNE, J.-F. PETIT, A.-C. MAIRE & J. JOLLÈS, Bull. Soc. Chim. biol. 47, 2241 (1965).

- [6] H. EDELHOCH, *Biochemistry* **6**, 1948 (1967).
- [7] N. SHARON & S. SEIFTER, *J. biol. Chemistry* **239**, 2398 P (1964).
- [8] A. TSUGITA, M. INOUE, E. TERZAGHI & G. STREISINGER, *J. biol. Chemistry* **243**, 391 (1968).
- [9] J. B. HOWARD & A. N. GLAZER, *J. biol. Chemistry* **242**, 5715 (1967).
- [10] P. JOLLÈS, M. HORISBERGER & E. VAN LEEMPUTTEN, expériences inédites (1968).
- [11] P. JOLLÈS, J. JOLLÈS-THAUREAUX & C. FROMAGEOT, *Compt. rend. Soc. biol.* **151**, 1368 (1957); P. JOLLÈS, B. NIEMANN & J. JOLLÈS, expériences inédites (1968).
- [12] J. JOLLÈS, A.-C. DIANOUX, J. HERMANN, B. NIEMANN & P. JOLLÈS, *Biochim. biophys. Acta* **128**, 568 (1966).
- [13] D. CHARLEMAGNE & P. JOLLÈS, *Bull. Soc. Chim. biol.* **49**, 1103 (1967).
- [14] P. JOLLÈS, J. SAINT-BLANCARD, D. CHARLEMAGNE, A.-C. DIANOUX, J. JOLLÈS & J. L. LEBARON, *Biochim. biophys. Acta* **151**, 532 (1968).
- [15] J. SAINT-BLANCARD, & P. JOLLÈS, soumis à *J. mol. Biol.* (1969).

69. Sarverogenin, vermutliche Struktur

Glykoside und Aglykone, 314. Mitteilung¹⁾

von **H. Fuhrer**, **R. F. Zürcher** und **T. Reichstein**

Physiklabor der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, und
Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(30. I. 69)

Summary. Sarverogenin is most probably a $3\beta, 11\alpha, 14\beta$ -trihydroxy-7,8 β -epoxy-12-oxo-5 β -card-(20:22)-onolide (3). This follows from IR., NMR., and mass spectra together with former chemical results.

Bisherige Befunde. – Eine grosse Anzahl natürlicher Glykoside enthalten als gemeinsames Aglykon das Sarverogenin. Solche Glykoside sind vor allem in den Samen gewisser Sippen der Sammel-Art *Strophanthus sarmentosus* P. DC. [2] sowie in denjenigen der *S. intermedius*-Gruppe [3] enthalten. Von letzterer sind insbesondere *S. intermedius* PAX [4] [5] [6], *S. amboensis* (SCHINZ) ENGL. et PAX [5] [7] [8] [9] [10] sowie *S. schuchardtii* PAX [11] chemisch untersucht. Teilweise gleiche Glykoside fanden sich auch in *S. gerrardii* STAPF [12], *S. commontii* SACL. [13] und *S. congoensis* FRANCH. [14].

Sarverogenin ist erstmals von J. VON EUW *et al.* [15] beschrieben worden (vgl. auch [6] [16]). Die ursprünglich abgeleitete Bruttoformel $C_{23}H_{32}O_7$ wurde in $C_{23}H_{30}O_7$ korrigiert [9] [17]. Für die Struktur hat erstmals TAYLOR [17] einen hypothetischen Vorschlag **1** gemacht. Die darin postulierte Funktion und Lage der Sauerstoffatome konnte teilweise gut begründet werden [8] [18] (vgl. auch die Diskussion bei [14]). Besonders unsicher blieb jedoch die Lage des Epoxydringes, SCHINDLER [18] hat die Möglichkeit diskutiert, dass er von 9α nach 15α verlaufen könnte. HEGEDÜS *et al.* [9] haben mit Recht die vorliegenden Befunde im allgemeinen Formelvorschlag **2** zusammengefasst.

Neuer Formelvorschlag. – Die in den letzten Jahren zugänglichen Methoden der IR., NMR.- und Massen-Spektroskopie erlauben es, dem Sarverogenin die Formel **3**

¹⁾ 313. Mitteilung vgl. W. STÖCKLIN [1].