

Il est redevable à Mademoiselle J. MAZZURCO (Ames Research Center) de nombreuses analyses d'acides aminés et à G. ROGERS et R. KREBSBACH (étudiants à l'Université de Santa Clara, Santa Clara, California) de leur collaboration technique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LXXXIIe Communication: *Helv.* **52**, 250 (1969).
- [2] A. I. OPARIN, «The Chemical Origin of Life», C. A. THOMAS éditeur, Chicago 1964; A. I. OPARIN *et al.* (eds.), «The Origin of Life on Earth» (Proceedings of the first international symposium, Moscou, 1956); «The origins of Prebiological Systems and their Molecular Matrices» (S. W. FOX, éditeur), Academic Press, New-York 1965, etc.
- [3] J. RABINOWITZ, J. FLORES, R. KREBSBACH & G. ROGERS, sous presse *Nature*, 1969.
- [4] W. D. MACELROY, Dr LUCA M. & J. TRAVIS, *Science* **157**, 150 (1967); «Biological Chemistry» par H. R. MAHLER & E. H. CORDES, Harper & Row, Publishers, New-York 1966.
- [5] M. PAECHT & A. KATCHALSKY, *Biochem. biophysica Acta* **90**, 260 (1963); P. BERG, *J. biol. Chemistry* **233**, 608 (1958); M. PAECHT-HOROWITZ & A. KATCHALSKY, *ibid.* **140**, 14 (1967); R. LEWINSON, M. PAECHT-HOROWITZ & A. KATCHALSKY, *ibid.* **140**, 24 (1967); A. KATCHALSKY & G. AILAM, *ibid.* **140**, 1 (1967); etc.
- [6] F. LIPMANN, «The Origin of Prebiological Systems» (éditeur S. W. FOX), Academic Press, Inc., New York 1965.
- [7] J. RABINOWITZ, F. WOELLER, J. FLORES & R. KREBSBACH, sous presse *Nature*, 1969.
- [8] I. GRUNZE, E. THILO & H. GRUNZE, *Chem. Ber.* **93**, 2361 (1960); J. M. VERDIER, CL. DORÉ-MIEUX-MORIN & A. BORILLE, *Compt. Rend.* **259**, 3773 (1964).
- [9] D. E. KOSHLAND, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 4103 (1951); G. DI SABATO & W. P. JENCKS, *ibid.* **83**, 4393 (1961).
- [10] E. THILO, *Angew. Chem.* **77**, 1056 (1965).
- [11] E. CHERBULIEZ, H. PROBST & J. RABINOWITZ, *Helv.* **43**, 464 (1960).
- [12] E. CHERBULIEZ, R. PRINCE & J. RABINOWITZ, *Helv.* **47**, 339 (1964).
- [13] E. CHERBULIEZ, SL. ČOLAK-ANTIĆ, G. WEBER & J. RABINOWITZ, *Helv.* **46**, 2996 (1963).
- [14] W. FELDMANN, *Chem. Ber.* **100**, 3850 (1967), etc.
- [15] E. CHERBULIEZ, H. WENIGER, *C. r. Soc. Physique Hist. nat. Genève* **63**, 122 (1946); E. CHERBULIEZ, SL. ČOLAK-ANTIĆ, A. GABBAY, F. HUNKELER, M. GOWHARI & J. RABINOWITZ, *Helv.* **46**, 1823 (1963).
- [16] E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, *Helv.* **41**, 1168 (1958).

---

#### 266. La structure chimique primaire du lysozyme du lait de Femme: établissement d'une formule développée provisoire<sup>1)</sup>

par Jacqueline Jollès et Pierre Jollès

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 96 Bd. Raspail, Paris 6<sup>e</sup>

(6 XI 69)

**Summary.** The detailed primary sequences of the N-terminal moiety (72 amino acid residues) and of the C-terminal end (23 amino acid residues) of human milk lysozyme (129 residues) are reported. A tentative complete structure of the enzyme is compared to hen and duck egg-white lysozymes which are very near related proteins despite many amino acid replacements (around 50), the insertion of an additional residue in the N-terminal and a deletion in the C-terminal moiety.

**Introduction.** — Après nos recherches consacrées à la détermination complète des structures primaires des lysozymes (EC 3.2.1.17) de blanc d'œuf de Poule [2] et de

<sup>1)</sup> 72me communication sur les lysozymes; 71me communication, LANDUREAU & P. JOLLES [1].

Cane [3], nous avons abordé l'étude des lysozymes d'origine humaine. Parmi les neuf lysozymes humains que nous avons isolés [4], l'enzyme contenu dans le lait de Femme s'est révélé comme le seul lysozyme *normal* pouvant être obtenu en quantités suffisamment grandes pour être soumis à des études détaillées de structure. Nous avons décrit la purification de l'enzyme dès 1961 [5] et plus récemment la séparation des peptides trypsiques par chromatographie ainsi que la structure chimique de quelques-uns d'entre eux [6]. Dans le présent mémoire, nous allons indiquer une formule partielle du lysozyme du lait de Femme comprenant l'enchaînement complet de la séquence N-terminale (72 acides aminés) ainsi que la séquence C-terminale (23 acides aminés). Le procédé classique de détermination des structures a été suivi: étude des peptides trypsiques (EC 3.4.4.4) réunis ensuite grâce aux peptides obtenus par hydrolyse avec la chymotrypsine (EC 3.4.4.5).

**Matériel et méthodes.** – Le lysozyme de lait humain a été préparé sous forme chromatographiquement pure (chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50, solution tampon de phosphates 0,2 M; pH 6,98) suivant le procédé de JOLLÈS [5]. La réduction, l'hydrolyse trypsique et la séparation des peptides trypsiques ont été effectuées comme indiqué précédemment [6]: 21 pics ont été caractérisés au cours de la chromatographie sur Dowex 1 X 2. Quatre procédés de purification des peptides contenus dans ces pics ont été utilisés: a) rechromatographie sur colonne de Dowex 50 X 2 tamponnée préalablement à pH 2,2 avec une solution tampon à base de pyridine (0,2 M)-acide acétique-HCl; elution avec des solutions tampons de pH et de molarité croissants; b) filtration sur Sephadex G-25 avec, comme éluant, l'acide acétique à 30%; c) chromatographie préparative sur papier WHATMAN N° 1 dans les solvants A: *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v) ou B: *n*-butanol-pyridine-acide acétique-eau (15:10:3:12, v/v); d) électrophorèse préparative sur papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b à pH 6,5 dans le solvant: pyridine-acide acétique-eau (100:3,5:900, v/v); aux mobilités *m* de Gly, Arg et CySO<sub>3</sub>H ont été attribuées respectivement les valeurs 0, +1 et -1.

La composition quantitative en acides aminés des peptides a été déterminée, après hydrolyse totale (HCl 6 N; 110°; 18 h; sous vide), à l'aide d'un Autoanalyseur TECHNICON.

Les enchaînements N-terminaux ont été déterminés a) par voie enzymatique, grâce à l'emploi d'une aminopeptidase de *A. oryzae* [7]; b) par la méthode au chlorure de dansyle [8]; c) par la méthode d'EDMAN, suivant la modification proposée par DOPHEIDE, MOORE & STEIN [9]; nous avons pu ainsi déterminer dans bien des cas l'enchaînement de 5-6 acides aminés; après chaque étape, le peptide raccourci a été analysé ou bien son acide aminé N-terminal a été caractérisé par la méthode au chlorure de dansyle. Les enchaînements C-terminaux ont été caractérisés au moyen du dosage des acides aminés libérés par les carboxypeptidases A et B (EC 3.4.2.1 et 3.4.2.2). Les peptides trypsiques ont, par ailleurs, été soumis soit à une hydrolyse acide partielle (HCl 11,2 N; 24 h; 38°) soit à une hydrolyse chymotrypsique (pH 8; 38°; 6 ou 24 h; rapport enzyme/substrat: 1/20) soit à une hydrolyse pepsique (EC 3.4.4.1; acide formique à 5%; 6 ou 24 h; 38°; enzyme/substrat: 1/20).

**Résultats.** – *Peptides trypsiques.* Le Tableau I indique soit la composition soit la structure de *tous* les peptides trypsiques contenus dans le lysozyme du lait humain. Le Tableau II donne un exemple d'établissement de la structure d'un de ces peptides.

*Réunion des peptides trypsiques.* Grâce à des essais de digestion du lysozyme natif avec l'aminopeptidase, il a pu être établi que le peptide 3c constitue l'enchaînement N-terminal de l'enzyme. L'ordre des autres peptides a pu être fixé grâce aux peptides chymotrypsiques dont la structure détaillée n'a pas encore été établie dans tous les cas. Les comparaisons avec les lysozymes de Poule et de Cane nous ont également aidé dans l'agencement des peptides trypsiques. A titre d'exemple, indiquons que le peptide trypsique 3b a pu être rattaché au peptide 9a grâce au peptide chymotrypsique

Ala-Arg-Thr-Leu. De même, les peptides 5b et 9b se sont trouvés réunis grâce au peptide chymotrypsique Asn-Thr-Arg-Ala-Thr-Asn-Tyr.

Tableau I. *Les peptides trypsiques du lysozyme de lait de Femme*

Les N° des peptides correspondent aux pics obtenus lors de la séparation chromatographique sur Dowex 1X2 [6] de l'hydrolysat trypsique, et la lettre qui suit le numéro, au peptide obtenu lors d'une chromatographie préparative dans les solvants A ou B. Les pics contenant des peptides à trop faible rendement n'ont pas été étudiés. Se référer à la partie expérimentale pour les abréviations. Asx = Asp ou Asn; Glx = Glu ou Gln. SCMCys: S-carboxyméthylcystéine.

N° du pep- tide [6]	Ren- de- ment %	Rf (A)	Rf (B)	<i>m</i> (pH 6,5)	Structure (éventuellement composition)
3c	20	0,05	0,36	+ 0,44	Lys-Val-Phe-Glu-Arg [6]
9a	65	0,20	0,60	- 0,35	SCMCys-Glu-Leu-Ala-Arg [6]
3b	38	0,16	0,47	+ 0,53	Thr-Leu-Lys [6]
1c	30	0,10	0,30	+ 0,7	Thr-Leu-Lys-Arg
8	35	0,27	0,60	0	Leu-Gly-Met-Asp-Gly-Tyr-Arg [6]
7a	20	0,27	0,55	0	Gly-Ile-Ser-Leu-Ala-Asn-Trp-Met-SCMCys-Leu-Ala-Lys
9b	60	0,01	0,30	0	Trp-Glu-Ser-Gly-Tyr-Asn-Thr-Arg [6]
5b	50	0,01	0,18	0	Ala-Thr-Asn-Tyr-Asn-Ala-Gly-Asp-Arg
15	25	0,12	0,50	- 0,26	Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ile-Phe-Glu-Ile-Asn-Ser-Arg
14	50	0,05	0,28	- 0,22	Tyr-Trp-SCMCys-Asx-Asx-Gly-Lys [6]
12	35	0	0	- 0,33	Thr-Pro-Gly-(Asp <sub>4</sub> , Ser <sub>2</sub> , Glu <sub>1</sub> , Ala <sub>6</sub> , Val <sub>2</sub> , SCMCys <sub>3</sub> , Ile <sub>1</sub> , Leu <sub>3</sub> , His <sub>1</sub> )-Ala-Lys
1b	50	0,08	0,22	+ 1	Arg [6]
2	75	0,20	0,47	+ 0,6	Val-Arg [6]
5d	65	0,05	0,28	0	Asp-Pro-Gln-Gly-Ile-Arg
7b	25	0,33	0,70	+ 0,27	Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg
3a	40	0,02	0,16	+ 0,55	Asn-Arg [6]
5c	65	0,01	0,12	0	SCMCys-Gln-Asn-Arg
5a	60	0,16	0,30	0	Asp-Val-Arg [6]
20	25	0,40	0,60	- 0,35	Gln-Tyr-Val-Gln-Gly-SCMCys-Gly-Val [6]

Tableau II. *Etablissement de la structure du peptide trypsique 5b, contenant une «insertion» par rapport à la séquence correspondante du lysozyme de Poule*Composition: Asp<sub>3</sub>, Thr<sub>1</sub>, Gly<sub>1</sub>, Ala<sub>2</sub>, Tyr<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>

— : résidu déterminé par la méthode d'EDMAN; Asx: Asp ou Asn

Méthode	Substances isolées
Chlorure de dansyle EDMAN	Ala Ala - Thr - Asx
Carboxypeptidase B	
Hydrolyse chymotrypsique	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="flex: 1; text-align: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> (Ala, Thr, Asn) - Tyr (<i>m</i> = 0) </div> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> EDMAN </div> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> Asx - Ala - Gly - Asx - Arg (<i>m</i> = 0) </div> </div> <div style="flex: 1; text-align: right;"> Arg </div> </div>
	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="flex: 1; text-align: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> Aminopeptidase (30 min): </div> <div style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px; margin-right: 10px;"> Asn - Ala (70%) (70%) </div> </div> <div style="flex: 1; text-align: right;"> </div> </div>
Structure	Ala - Thr - Asn - Tyr - Asn - Ala - Gly - Asp - Arg

Tableau III. *Structure du lysozyme de lait de Femme*

Séquences détaillées des résidus 1 à 72 et 107 à 129; composition ou structure partielle des peptides trypsiques des résidus 73 à 106. Comparaison avec les lysozymes de blanc d'œuf de Poule [2] et de Cane II [3]; seuls les acides aminés changés sont indiqués. Les numéros au début des lignes correspondent aux numéros des résidus. Asx = Asp ou Asn; Glx = Glu ou Gln.  $\Theta$  = délétion.

Lait de Femme	1	H. Lys - Val - Phe - Glu - Arg - Cys - Glu - Leu - Ala - Arg - Thr - Leu - Lys - Arg - Leu - Gly -
Poule	1	Gly
Cane II	1	Tyr
Lait	17	Met - Asp - Gly - Tyr - Arg - Gly - Ile - Ser - Leu - Ala - Asn - Trp - Met - Cys - Leu - Ala -
Poule	17	Leu
Cane	17	Asn
Lait	33	Lys - Trp - Glu - Ser - Gly - Tyr - Asn - Thr - Arg - Ala - Thr - Asn - Tyr - Asn - Ala - Gly - Asp -
Poule	33	Phe
Cane	33	Asn
Lait	50	Arg - Ser - Thr - Asp - Tyr - Gly - Ile - Phe - Glu - Ile - Asn - Ser - Arg - Tyr - Trp - Cys -
Poule	49	Gly
Cane	49	Gly
Lait	66	Asx - Asx - Gly - Lys - Thr - Pro - Gly - (Asp <sub>4</sub> , Ser <sub>2</sub> , Glu <sub>1</sub> , Ala <sub>6</sub> , Val <sub>2</sub> , Cys <sub>3</sub> )
Poule	65	Arg
Cane	65	{ à partir du résidu 73 jusqu'au résidu 105, il y a
Lait		Ile <sub>1</sub> , Leu <sub>3</sub> , His <sub>5</sub> )
Poule		probablement 17 changements entre les lysozymes d'oiseaux et le lysozyme de lait; celui-ci présente une délétion
Cane		correspondant sans doute au résidu (N° 98) des lysozymes d'oiseaux.
Lait	98	[Arg, (Val - Arg), (Asp - Pro - Gln - Gly - Ile - Arg)] - Ala - Trp - Val - Ala - Trp - Arg - Asn -
Poule	97	{ Asn
Cane	97	
Lait	114	Arg - Cys - Gln - Asn - Arg - Asp - Val - Arg - Gln - Tyr - Val - Gln - Gly - Cys - Gly - Val. OH
Poule	114	Lys
Cane	114	Arg

*Formule développée et discussion.* Le Tableau III indique une formule détaillée du lysozyme de lait de Femme où cependant la séquence allant du résidu N° 73 au résidu N° 106 n'a pas encore été établie en détail. Cette formule appelle plusieurs remarques: 1) le lysozyme contient 129 acides aminés alors que l'analyse n'avait permis d'en repérer que 124 [10]; une fois de plus se trouve vérifié le fait que la composition exacte n'est connue qu'après des travaux ayant trait à la structure; l'observation la plus importante concerne la mise en évidence de 8 et non pas de 6 demi-résidus de cystine; 2) les résidus Glu (35) et Asp (52) du lysozyme de Poule impliqués d'après PHILLIPS [11] dans la suite des réactions aboutissant à la coupure du substrat polyosidique se retrouvent dans le lysozyme de lait dans des enchaînements très voisins: le résidu Glu No 35 est resté à la même place; par contre, le résidu Asp (52) est devenu dans le lysozyme du lait le résidu N° 53 par suite de l'«insertion» dans le cas du lait d'un résidu de Asp situé entre les résidus 48 et 49 du lysozyme de Poule (Tableau III); 3) par rapport au lysozyme de Poule, le lysozyme de lait présente une «délétion»; il s'agit très probablement du résidu Ile (N° 98) du lysozyme de Poule; 4) environ 50 résidus d'acides aminés sont changés entre le lysozyme humain d'une part et les lysozymes de Poule et de Cane d'autre part, pour seulement 19 changements entre les deux lysozymes de blancs d'œufs d'oiseaux. 5) Notons aussi que le nombre de résidus de tryptophane du lysozyme humain est plus faible que celui des lysozymes d'oiseaux; leur répartition est différente, notamment dans le site actif [11]. 6) Certains parmi les changements caractérisés entre les lysozymes de Poule et de lait humain (résidus N° 10, 12, 19, 37, 38, 57) rapprochent ce dernier de l'α-lactalbumine [12]. 7) CANFIELD [13] a indiqué récemment une formule partielle du lysozyme isolé de l'urine de malades atteints de «leucémie monocytaire chronique». Cette formule est très voisine de notre séquence concernant le lysozyme du lait, sauf dans la partie C-terminale où nous avons caractérisé un peptide supplémentaire avec un demi-résidu de cystine.

Les auteurs sont heureux de remercier Mme BERTRAND, Ecole de Puériculture, Paris, des nombreux échantillons de lait de Femme mis à leur disposition, ainsi que Mmes J. FEYDIT et F. SCHOENTGEN de leur précieuse collaboration technique. Ce travail a bénéficié de l'aide du C.N.R.S., de la D.G.R.S.T. (Biologie moléculaire) ainsi que de la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. C. LANDUREAU & P. JOLLÈS, *Nature* 224 (1969), sous presse.
- [2] J. JOLLÈS & P. JOLLÈS, *C. r. hebd. Séances. Acad. Sci.* 253, 2773 (1961); J. JOLLÈS, J. JAUREGUI-ADELL, I. BERNIER & P. JOLLÈS; *Biochim. biophys. Acta* 78, 668 (1963).
- [3] J. HERMANN & J. JOLLÈS, sous presse *Biochim. biophys. Acta* (1969).
- [4] P. JOLLÈS, *Angew. Chem.* 81, 244 (1969).
- [5] P. JOLLÈS & J. JOLLÈS, *Nature* 192, 1187 (1961).
- [6] J. JOLLÈS & P. JOLLÈS, *Bull. Soc. Chim. biol.* 50, 2543 (1968).
- [7] J. JOLLÈS, P. JOLLÈS, H. UHLIG & K. LEHMANN, *Z. physiol. Chem.* 350, 139 (1969).
- [8] W. H. GRAY & B. S. HARTLEY, *Biochem. J.* 89, 379 (1963).
- [9] T. A. A. DOPHEIDE, S. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 242, 1833 (1967).
- [10] J. JOLLÈS & P. JOLLÈS, *Biochemistry* 6, 411 (1967).
- [11] D. C. PHILLIPS, *Scient. Amer.* 215, 78 (1966).
- [12] K. BREW, T. C. VANAMAN & R. L. HILL, *J. biol. Chemistry* 242, 3747 (1967).
- [13] R. E. CANFIELD, cité dans la discussion de L. N. JOHNSON, D. C. PHILLIPS & J. A. RUPLEY, «Structure, Function and Evolution in Proteins», *Brookhaven Symposia in Biology* 21, 137 (1968).