

LA STRUCTURE CHIMIQUE DU LYSOZYME DE BLANC D'OEUF DE POULE: ÉTUDE DÉTAILLÉE*

JACQUELINE JOLLÈS, JUAN JAUREGUI-ADELL, IDA BERNIER ET PIERRE JOLLÈS

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

(Reçu le 25 février, 1963)

SUMMARY

The chemical structure of hen's egg-white lysozyme: the detailed study

All the details concerning the establishment of the formula of the chemical structure of hen's egg-white lysozyme (*N*-acetylmuramide glycanohydrolase, EC 3.2.1.17) (which the authors had briefly indicated in 1961) are reported in the present study. The 18 tryptic units obtained from reduced lysozyme by chromatography on Dowex-1 X2 have been joined in the right order thanks to the chymotryptic units containing a basic amino acid and in two instances thanks to the peptic units. The protein is formed by a single polypeptide chain of 129 amino acid residues folded by the 4 bridges of the cystine residues; one of them has already been determined. Some considerations are made on the relations existing between chemical structure and biological activity.

INTRODUCTION

La formule développée de la structure chimique primaire du lysozyme (*N*-acetylmuramide glycanohydrolase, EC 3.2.1.17) de blanc d'oeuf de poule avait été établie en 1961 par JOLLÈS *et al.*¹ et avait fait l'objet d'une courte note. Préalablement l'enchaînement de la moitié N-terminale de la protéine² et une formule provisoire³ avaient été indiqués. Le présent travail a pour but d'exposer en détail les méthodes utilisées ainsi que les résultats qui ont permis d'aboutir à la séquence complète.

La composition en acides aminés du lysozyme de blanc d'oeuf de poule a fait l'objet de nombreux travaux⁴. L'enzyme comprend les 129 acides aminés suivants: Gly₁₂, Ala₁₂, Ser₁₀, (Cys-)₈, Met₂, Thr₇, Pro₂, Val₆, Leu₈, Ileu₆, Phe₃, Tyr₃, Try₆, Asp₂₁, Glu₅, Lys₆, Arg₁₁, His₁.

Le nombre de groupements amidés localisés est de 16. Le poids moléculaire calculé est donc de 14386, en excellent accord avec celui établi par la plupart des méthodes physiques⁴. Notons ici que le lysozyme est la première protéine contenant à la fois tous les acides aminés et en particulier cystine, méthionine et tryptophane, dont la structure chimique a été établie. La chaîne peptidique est plus ou moins repliée

Abréviations: SCMCys, S-carboxyméthylcystéine; HS, homosérine; NBS, *N*-bromosuccinimide.

* This paper is dedicated to the memory of Professor C. FROMAGEOT, one of the first Editors of *Biochimica et Biophysica Acta*.

sur elle-même, les replis étant maintenus par les quatre ponts –S–S– des quatre résidus de cystine. La rupture de ces ponts et leur remplacement par le nombre équivalent de groupes –SCH₂COOH ne scinde en aucune manière la molécule en plusieurs chaînes peptidiques⁵.

Pour établir la structure développée d'une aussi grande molécule, il était nécessaire de la scinder en plusieurs morceaux, d'étudier d'abord les séquences plus courtes pour, ensuite, les réunir dans l'ordre qui doit être le leur au sein de la molécule primitive. Il a été fait appel en premier lieu à la trypsine (EC 3.4.4.4) qui scinde la molécule au niveau des groupements carboxyliques des résidus de lysine et d'arginine. Malheureusement cet enzyme n'attaque pas (ou très peu) le lysozyme natif. Ce dernier a dû donc d'abord être dénaturé soit par chauffage, soit par oxydation⁶ avec l'acide performique, soit par réduction avec l'acide thioglycolique suivie de l'action de l'acide iodacétique^{3,7}. Pour séparer les peptides obtenus après hydrolyse tryptique et appelés unités tryptiques, on avait utilisé la chromatographie sur colonne de résine Dowex-50 X2.

Le Tableau I rend compte de ce que deviennent les trois acides aminés: cystine, méthionine et tryptophane, au cours des différents traitements de dénaturation; après chauffage, la cystine reste inchangée et les peptides contenant des résidus de cet acide aminé restent adsorbés sur le Dowex-50 X2. Après oxydation, c'est la kynurénine, principal produit de dégradation du tryptophane, qui est responsable de l'adsorption de certains peptides sur la résine⁶. Après réduction et traitement par l'acide iodacétique, le tryptophane reste inchangé, la méthionine est transformée principalement en homosérine⁸ et chaque résidu de cystine en deux résidus de S-carboxyméthylcystéine (SCMCys). L'obtention de toutes les unités tryptiques est cependant restée difficile par simple passage sur Dowex-50 X2, particulièrement en ce qui concerne les peptides à caractère fortement aromatique. Par contre toutes les unités tryptiques ont pu être obtenues de façon très élégante par chromatographie sur Dowex-1 X2.

L'ordre de succession des unités tryptiques a été établi grâce aux peptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique (EC 3.4.4.5), appelés unités chymotrypsiques, et

TABLEAU I
SÉPARATION DES UNITÉS TRYPTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE RÉSINE
Comportement de Try, Cys et Met.

Résine	Lysozyme	Try	Cys	Met	Observations
Dowex-50 X2	Natif	Try	Cys	Met	Digestion tryptique presque nulle
Dowex-50 X2	Dénaturé (chaleur)	Try	Cys	Met	Les peptides de la cystine restent adsorbés
Dowex-50 X2	Oxydé	Kynurénine	CySO ₃ H	MetO ₂	Les peptides du Try restent adsorbés
Dowex-50 X2	Réduit + acide iodacétique	Try	SCMCys	Homosérine	Les peptides aromatiques restent souvent adsorbés
Dowex-1 X2	Réduit + acide iodacétique	Try	SCMCys	Homosérine	Séparation de toutes les unités

contenant des acides aminés basiques³. Ces peptides constituaient de véritables ponts entre les unités tryptiques. La séparation de toutes les unités chymotrypsiques du lysozyme n'a pas été possible par chromatographie sur Dowex-50 X2 où restaient à nouveau adsorbés les courts enchaînements fortement basiques et (ou) aromatiques. Ici encore, le problème a pu être résolu en chromatographiant un hydrolysât enzymatique provenant du lysozyme réduit sur une colonne de Dowex-1 X2.

L'étude des unités tryptiques et chymotrypsiques isolées sur Dowex-50 X2 a abouti à une formule provisoire³. L'isolement de toutes les unités par chromatographie sur Dowex-1 X2 a permis d'aboutir à la formule complète¹. Seul, ce mode de séparation sera étudié en détail. Parmi les peptides isolés, nous n'étudierons que ceux dont la structure n'a pas été décrite dans nos travaux antérieurs. L'ordre d'enchaînement des unités tryptiques a pu être vérifié grâce à l'étude de l'hydrolysât tryptique du lysozyme acétylé; on sait, en effet, que l'acétylation des groupements aminés en ϵ de la lysine empêche la trypsine de couper la chaîne peptidique au niveau des résidus carboxyliques de cet acide aminé⁹. A la lumière de la formule développée, la spécificité de l'action des enzymes et du *N*-bromosuccinimide sur le lysozyme sera discutée ainsi que certains aspects des relations entre structure chimique et activité biologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lysozyme

Le lysozyme utilisé est un échantillon (lot No. 381-187) provenant des laboratoires Armour de Kankakee, Ill. (U.S.A.). Par chromatographie sur Amberlite CG-50 (colonne de 20 $\times$ 1 cm pour 1 mg; solution tampon de phosphates 0.2 M (pH 7.18)) il a été vérifié que 96 % de l'enzyme se retrouvent dans un seul pic. Après les diverses hydrolyses enzymatiques, il n'a été tenu compte que des peptides obtenus avec un rendement supérieur à 15 %.

Réduction

On laisse réagir le lysozyme (1 mol) avec l'acide thioglycolique (400 mol) dans l'urée 8 M, à pH 8.5 pendant 6 h à 20°. On ajoute ensuite de l'acide iodacétique (700 mol); le pH est maintenu à 8.5 grâce à l'addition de triméthylamine et ceci pendant 2 h. Le lysozyme ainsi transformé est dialysé pendant 48 h contre de l'eau distillée à 2°; il est ensuite lyophilisé. Il a été vérifié que la cystine est transformée en S-carboxyméthylcystéine et que ni la tyrosine ni le tryptophane n'ont subi de transformation.

Hydrolyse tryptique

La trypsine Worthington trois fois recristallisée contient encore des traces de chymotrypsine. Elle doit donc subir, avant son emploi, un prétraitement: en solution à 1 % elle est soumise à l'action de HCl N/16 pendant 18 h à 37°. L'hydrolyse tryptique est ensuite effectuée pendant 4 h à 37° et à pH 7.8. Le rapport enzyme/substrat est 1/100 et la concentration en protéine de 1 %. L'action enzymatique est stoppée par acidification. L'augmentation de l'azote aminé déterminée par un dosage ninhydrine sur une fraction aliquote, renseigne sur le nombre de coupures obtenues par action de la trypsine.

Hydrolyse chymotrypsique

L'hydrolyse chymotrypsique est effectuée avec de la chymotrypsine Worthington trois fois recristallisée dans des conditions analogues à celles décrites pour l'hydrolyse trypsique; on omet naturellement ici le prétraitement.

Chromatographie sur colonne de Dowex-1 X2.

Le Dowex-1 X2, 200-400 mesh, est tamponné à pH 8 avec une solution de collidine à 1 % dont le pH a été amené à 8 par addition d'une petite quantité (environ 2 ml) d'acide acétique à 30 %. Un hydrolysats enzymatique provenant de 25 à 30 μ mol de lysozyme réduit est chromatographié sur une colonne de 140×2.4 cm. Après passage d'environ 500 ml de la solution de pH 8, on établit un gradient; à une chambre de mélange contenant 1 l de la solution de pH 8 on ajoute successivement de l'acide acétique 0.1 N, 1 N puis 2 N. On termine la chromatographie en éluant la résine directement avec de l'acide acétique 2 N et HCl 1 N. L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml.

Repérage des peptides (ou acides aminés)

Une partie aliquote de chaque fraction est soumise d'abord à une hydrolyse alcaline puis après acidification à un dosage avec le réactif à la ninhydrine. À 0.1-0.3 ml de solution à doser, on ajoute 1 ml de NaOH 2.5 N. Après 2.5 h à 90°, on neutralise par addition de 1 ml d'acide acétique à 30 %. On ajoute 1 ml de réactif à la ninhydrine (20 mg ninhydrine, 3 mg hydrindantine, 0.75 ml méthylcellosolve, 0.25 ml de solution tampon acétate de sodium 4 M (pH 5.5)) et après développement de la coloration (15 min au bain-marie bouillant) on détermine densité optique à 570 m μ . On caractérise ainsi un certain nombre de pics. Les fractions correspondant à un pic donné sont réunies et amenées à sec dans un dessiccateur.

Élimination des réactifs

Comme on travaille avec des solutions tampons volatiles, il n'est pas nécessaire de procéder à des dessalifications sur des colonnes de résines. Cependant dans les fractions amenées à sec on retrouve une quantité non négligeable de collidine. Des évaporations successives ne sont pas toujours suffisantes pour chasser ce réactif et parfois il a été nécessaire de soumettre les peptides à des chromatographies sur papier Whatman No. 1 dans le solvant *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v). Les peptides séparés de la collidine sont ensuite élués du papier par de l'acide acétique 1 N. Pour les peptides aromatiques, HCl 0.1 N a pu être utilisé sans inconvénient; le rendement de l'éluion s'est ainsi trouvé accru.

Détermination de la structure des peptides

Pureté: La pureté de chaque peptide a été soigneusement contrôlée par des chromatographies sur papier Whatman No. 1 dans les solvants: *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v) (Solvant A) et *n*-butanol-pyridine-eau (6:4:3, v/v) et par des ionophorèses sur papier Whatman No. 1 avec les mélanges de pyridine-eau-acide acétique (100:900:4, v/v) (pH 6.5) et pyridine-eau-acide acétique (10:890:100, v/v) (pH 3.6) sous 15-20 V/cm pendant 1 ou 2 h, à 2°. Lorsqu'on se trouvait en présence d'un mélange de peptides, on a eu soin de procéder d'abord à des chromatographies ou ionophorèses préparatives sur papier, suivies d'éluions.

Composition quantitative: La composition quantitative en acides aminés des différents peptides a été déterminée après hydrolyse totale (HCl 6 N à 110° dans un tube scellé pendant 24 h, avec un Autoanalyseur Technicon, suivant la méthode de PIEZ ET MORRIS¹⁰. Le tryptophane a été déterminé par la méthode de SPIES ET CHAMBERS¹¹.

Acides aminés N-terminaux et séquences N-terminales: Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par la méthode de SANGER et les séquences N-terminales par la méthode d'EDMAN; la technique que nous avons utilisée est la suivante: 0.5 μ mol de peptide dissous dans 0.5 ml de pyridine à 50 % est traité avec 0.1 ml d'une solution de phénylisothiocyanate à 1 % dans l'alcool à 95°. Le pH est ajusté à 9 avec une solution de triméthylamine à 5 %. On laisse réagir 30 min à 37° en agitant de temps en temps. L'excès de réactif est extrait avec du benzène et le phénylthiocarbamylpeptide est amené à sec (sur acide sulfurique). On reprend par 0.3 ml d'un mélange acide acétique-HCl (5:1, v/v) et on laisse reposer 15 min à température ordinaire. Le phénylthiohydantoïne acide aminé se détache. On ajoute 4 volumes d'eau et on extrait par l'acétate d'éthyle; on amène à sec la phase acétate. L'acide aminé est régénéré par hydrolyse acide (HCl 6 N pendant 16 h à 150°, tubes scellés sous vide) et caractérisé par chromatographie sur papier.

Acides aminés et enchaînements C-terminaux: Les acides aminés et les enchaînements C-terminaux sont déterminés par action de la carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1) (sauf dans le cas des unités tryptiques); elle agit à 37° pendant des temps variables sur la solution contenant le peptide et des traces de diisopropylfluorophosphate (0.1 ml d'une solution $2 \cdot 10^{-3}$ mol/ml de solution peptidique) ; le pH est ajusté à 7.8 avec de la triméthylamine.

Le (ou les) mélange acides aminés libérés sont ensuite caractérisés par chromatographie sur papier ou à l'aide de l'Autoanalyseur. Il est ainsi possible de déterminer soit l'acide aminé C-terminal, soit parfois l'enchaînement C-terminal. Dans ce dernier cas il est cependant nécessaire de répéter les analyses après différents temps de réaction de l'enzyme.

Hydrolyses enzymatiques: Les unités tryptiques sont à leur tour soumises à une hydrolyse chymotrypsique (voir plus haut) en vue d'obtenir de très courtes séquences (tri- ou tétrapeptides). Les unités chymotrypsiques sont soumises à une hydrolyse trypsique. Les unes et les autres ont également été soumises à l'action de la pepsine (37° pendant 1-4 h en solution tampon de citrate 0.05 M (pH 1.95) ou HCl 0.01 N; rapport enzyme/substrat: 1/50 ou 1/100). Les peptides obtenus après ces nouvelles scissions enzymatiques sont séparés et purifiés par chromatographie ou ionophorèse sur papier.

Hydrolyse acide partielle: Certains enchaînements n'ont pas pu être scindés par voie enzymatique. Pour déterminer entièrement leur structure, ils ont été soumis à une hydrolyse acide partielle (HCl 11 N à 37° pendant 24 ou 48 h). Les constituants de l'hydrolysats sont ici encore purifiés par chromatographie sur papier.

Structure des tripeptides: Lorsqu'après hydrolyse enzymatique ou acide partielle on obtient un tripeptide, on le transforme en DNP-tripeptide. Par action de la carboxypeptidase on caractérise l'acide aminé C-terminal. Le DNP-dipeptide résiduel est hydrolysé; après caractérisation du DNP-acide aminé, la structure du tripeptide se trouve établie: ce résultat peut également être obtenu grâce à la méthode d'EDMAN. La structure des tripeptides dans la partie consacrée aux résultats ne sera donc plus discutée, sauf dans le cas où les deux procédés indiqués ne peuvent pas être appliqués.

Localisation des résidus Asp(NH₂) et Glu(NH₂): Cette localisation a été faite en soumettant les peptides obtenus par voie enzymatique à des électrophorèses sur papier à pH 6.5 et en déterminant dans ces conditions leur mobilité.

Acétylation du lysozyme

Pour obtenir un lysozyme entièrement transformé, il doit être soumis à deux acétylations successives. Les procédés utilisés sont ceux de FRAENKEL-CONRAT¹² et de WONG ET LIENER¹³. 500 mg de lysozyme sont dissous à 0° dans 10 ml d'une solution d'acétate de sodium à demi saturée. On ajoute ensuite très lentement (90 min) et en agitant 0.6 ml d'anhydride acétique, par fractions de 0.05 ml. On dialyse pendant 20 h contre de l'eau distillée à 4°. On ajoute alors de l'acétate de sodium jusqu'à obtention d'une solution demi-saturée et on recommence l'addition d'anhydride acétique. On dialyse et on lyophilise.

RÉSULTATS

Etude des unités tryptiques

Action de la trypsine sur le lysozyme réduit et traité par l'acide iodacétique: L'évolution en fonction du temps de l'hydrolyse tryptique est montrée dans la Fig. 1. L'action de l'enzyme est rapide et semble complète après 8 h d'action. Le nombre calculé de coupures à 100 % est alors d'environ 10. Pour le lysozyme natif il est, dans les mêmes conditions, seulement de 1.

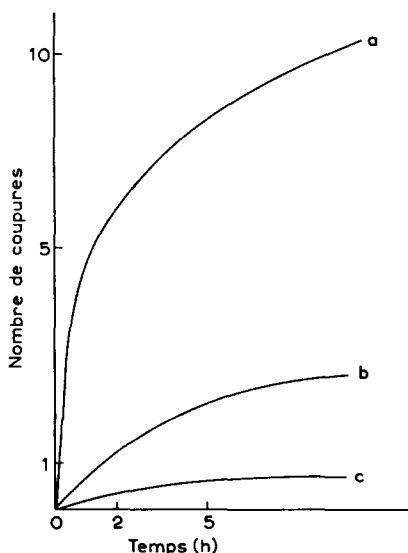


Fig. 1. Nombre de coupures (à 100 %) obtenues par action de la trypsine sur : (a) le lysozyme réduit puis traité par l'acide iodacétique, (b) le lysozyme réduit puis acétylé, (c) le lysozyme natif.

Séparation des peptides par chromatographie sur colonne: Le lysozyme contient, par molécule, 6 résidus de lysine et 11 résidus d'arginine. Comme l'acide aminé C-terminal est la leucine, on devrait théoriquement obtenir 18 unités tryptiques. Par chromatographie sur Dowex-1 X2, il a été possible de caractériser 17 pics (T 1 à T 17). La Fig. 2 montre la séparation de ces pics provenant de 300 mg de lysozyme réduit.

Purification des unités trypsiques: La pureté des constituants de chaque pic a été vérifiée par chromatographie et par ionophorèse sur papier. Le Tableau II montre que seul le pic 1 contient deux unités trypsiques T 1a et T 1b.

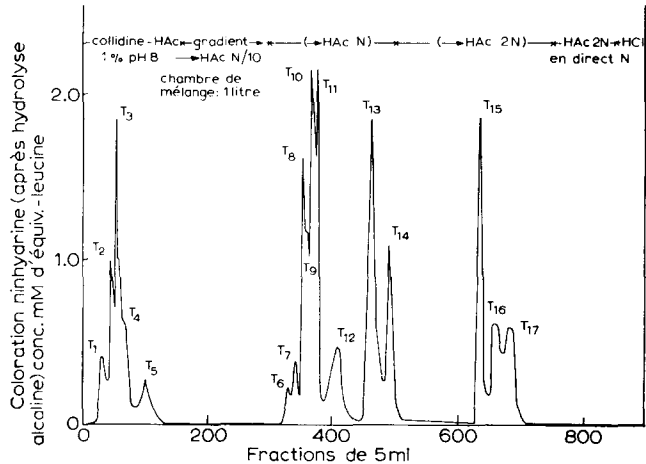


Fig. 2. Chromatographie sur Dowex-1 X 2 d'un hydrolysats trypsique de lysozyme réduit, puis traité par l'acide iodacétique (300 mg). Colonne de 140 x 2.4 cm.

TABLEAU II

R_F ET m DES UNITÉS TRYPSIQUES ISOLÉES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX-1 X2
 R_F dans le Solvant A. m (à pH 6.5) par rapport à celles de l'arginine, $m = +1$ et de $CySO_3H$, $m = -1$; $m = 0$ pour le glucose.

Unité trypsique	R_F	m
T 1a	0.05	+1.1
T 1b	0.08	+1
T 2	0.05	+0.6
T 3	0.03	+0.7
T 4	0.08	+0.4
T 5	0.71	0
T 6	0	0
T 7	0.05	0
T 8	0	0
T 9	0.09	0
T 10	0.16	0
T 11	0.02	+0.1
T 12	0.02	-0.20
T 13	0	-0.20
T 14	0.12	0
T 15	0.02	-0.30
T 16	0.02	-0.35
T 17	0.10	-0.27

Analyse des unités trypsiques: Le Tableau III indique la composition quantitative en acides aminés des unités trypsiques. Chaque unité comporte un seul acide aminé basique, comme l'exige la spécificité de la trypsine. Il y a cependant deux exceptions: l'unité T 4, qui comprend deux acides aminés basiques (donc 2 unités trypsiques),

TABEAU III

COMPOSITION QUANTITATIVE EN ACIDES AMINÉS DES UNITÉS TRYPSIQUES

Acides aminés	T _{1a}	T _{1b}	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆ *	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇	Total*
Gly			1		1			1			1	1		2	2		2	1	12
Ala						(3)			1		1		3		2	3	2		12
Ser			1						1		(0.3)			2	1	4	1		10
SCMCys						(1)		1		1		1	1		1	3		1	8
HS**						(1)							1				1		2
Thr			1						2		1			2		1			7
Pro			1													1			2
Val					1						1		1		1	1	2		6
Leu						(1)						1	1	1	1	3			8
Ileu											1			2		2	1		6
Phe					1				2										3
Tyr												1		1	1				3
Try											1				1		2		6
Asp				1					3		1	2		4	1	4	3	2	21
Glu						(1)			2		1		1	1					5
Lys	1									1			1		1		1		6
Arg		1	1	1	1		(1)	1	1		1	1		1			1	1	11
His												1							1
Total	1	1	5	2	5	1	(9)	3	12	2	9	7	8	16	12	23	15	7	129

* Dans le calcul de la totalité des résidues d'acides aminés T₆ n'a pas été pris en considération car T₆ = T₁₂ + T_{1b} (voir texte).

** HS, homosérine provenant après réduction de la méthionine.

la trypsine n'ayant pas pu scinder une des liaisons et l'unité T 6; mais cette dernière est le produit d'addition des unités T 12 + T 1b; aussi ne l'avons-nous pas fait intervenir dans le calcul de la totalité des résidus d'acides aminés. On retrouve ainsi 129 acides aminés et 18 unités tryptiques.

Rendement des unités tryptiques: Les rendements d'obtention des unités tryptiques après chromatographie sur colonne sont indiqués dans le Tableau IV.

TABLEAU IV
STRUCTURE CHIMIQUE DES UNITÉS TRYPTIQUES ET RENDEMENT D'OBTENTION (%)
APRÈS CHROMATOGRAPHIE

T 1a	Lys (60 %)
T 1b	Arg (60 %)
T 2	Thr-Pro-Gly-Ser-Arg (50 %)
T 3	Asp(NH ₂)-Arg (95 %)
T 4	Lys-Val-Phe-Gly-Arg (50 %)
T 5	Leu (70 %)
T 6	SCMCys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-HS*-Lys-Arg (8 %)
T 7	Gly-SCMCys-Arg (32 %)
T 8	Phe-Glu-Ser-Asp(NH ₂)-Phe-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH ₂)-Arg (25 %)
T 9	SCMCys-Lys (70 %)
T 10	Gly-Thr-Asp-Val-Glu(NH ₂)-Ala-Try-Ileu-Arg (28 %)
T 11	His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH ₂)-Tyr-Arg (45 %)
T 12	SCMCys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-HS*-Lys (28 %)
T 13	Asp-(Thr, Asp(NH ₂), Gly, Ser, Thr)-Asp-Tyr-Gly-Ileu-Leu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ileu-Ser-Arg (30 %)
T 14	Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asp(NH ₂)-Try-Val-SCMCys-Ala-Ala-Lys (25 %)
T 15	Asp(NH ₂)-Leu-SCMCys-Asp(NH ₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ileu-Thr-Ala-Ser-Asp(NH ₂)-Val-SCMCys-Ala-Lys (16 %)
T 16	Ileu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-HS*-Asp(NH ₂)-Ala-Try-Val-Ala-Try-Arg (12 %)
T 17	Try-Try-(SCMCys, Asp, Asp(NH ₂), Gly)-Arg (20 %)

* HS, homosérine provenant de la méthionine.

Structure chimique des unités tryptiques; T 1a, T 1b, T 2 et T 3: T 1a et T 1b sont les acides aminés libres: Lys et Arg. Les structures de T 2: Thr-Pro-Gly-Ser-Arg et de T 3: Asp(NH₂)-Arg ont été décrites en détail par JOLLÈS-THAUREAUX *et al.*⁶.

Structure de T 4: Par hydrolyse chymotrypsique on obtient un tripeptide Lys-Val-Phe et un dipeptide Gly-Arg. L'acide aminé N-terminal est Lys. La structure est donc Lys-Val-Phe-Gly-Arg. Il s'agit de l'enchaînement N-terminal du lysozyme. Cela a pu être vérifié en soumettant directement la protéine cinq fois de suite à la réaction d'EDMAN. Le comportement de la trypsine vis-à-vis de T 4 qui contient en fait deux unités tryptiques sera discuté plus loin.

Structure de T 5, T 6 et T 7: T 5 est constituée par la leucine libre. La structure de T 6 a déjà été décrite par JOLLÈS *et al.*³. T 7 fait partie de l'enchaînement C-terminal du lysozyme: Gly-SCMCys-Arg-Leu·OH qui a fait l'objet de la part de JOLLÈS *et al.*¹⁴ d'une étude détaillée.

Structure de T 8: Le Tableau V rend compte des peptides obtenus par hydrolyses chymotrypsique et acide partielle à partir de T 8. En agissant sur le peptide Glu-Ser-Asp(NH₂)-Phe, la carboxypeptidase libère successivement Phe et Asp(NH₂); comme ce peptide a une mobilité $m = -0.46$, Glu n'est pas amidé. Par contre le peptide T 8 ayant une mobilité $m = 0$, tous les autres résidus de Asp ou de Glu sont amidés.

TABLEAU V
ÉTABLISSEMENT DE LA STRUCTURE DE T 8

Méthode	Substances isolées
EDMAN	Phe-Glu
Chymotrypsine	Glu-Ser-Asp(NH ₂)-Phe
	Asp(NH ₂)-(Glu(NH ₂), Ala, Thr, Thr, Asp(NH ₂))-Arg
Hydrolyse acide partielle	Glu-----Ala Asp-----Glu-----Ala Thr
Structure	Phe-Glu-Ser-Asp(NH ₂)-Phe-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH ₂)-Arg

TABLEAU VI
ÉTABLISSEMENT DE LA STRUCTURE DE T 10

Méthode	Substances isolées
SANGER	Gly
Pepsine	Gly-(Thr, Ser ?)-Asp Val-Glu(NH ₂)-Ala
Chymotrypsine	Gly-(Thr, Asp, Val, Glu)-----Ala-Try Ileu-Arg
Structure	Gly-Thr-----Asp-Val-Glu(NH ₂)-Ala-Try-Ileu-Arg

TABLEAU VII
ÉTABLISSEMENT DE LA STRUCTURE DE T 11

Méthode	Substances isolées
SANGER	His
Chymotrypsine	His-Gly-Leu Asp-Asp(NH ₂)-Tyr
Hydrolyse acide partielle	Tyr-Arg
Structure	His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH ₂)-Tyr-Arg

Structure de T 9 et T 10: T 9 est le dipeptide SCMCys-Lys. Le Tableau VI rend compte de l'établissement de la structure de T 10. Le peptide Val-Glu(NH₂)-Ala a une mobilité nulle; il contient donc de la glutamine. Comme le peptide entier a une mobilité nulle, le résidu de Asp n'est pas amidé. Il est intéressant de noter qu'au cours de nombreuses analyses 0.3 résidu de Ser a été détecté dans ce peptide. Il n'a pas été possible de déterminer s'il s'agit ici d'un résidu de sérine particulièrement fragile au cours de l'hydrolyse totale ou d'un artefact, élué de la colonne d'analyse à la place habituelle de la sérine.

Structure de T 11: Cette unité contient l'unique résidu d'histidine du lysozyme. L'établissement de la structure est indiqué dans le Tableau VII. Le peptide Asp-Asp(NH₂)-Tyr a une mobilité $m = -0.46$. Après réaction d'EDMAN, on obtient un dipeptide de $m = 0$; c'est donc le deuxième résidu de Asp qui est amidé.

Structure de T 12: La structure de T 12 a été déterminée comme celle de T 6 (voir réf. 3).

Structure de T 13: Par la méthode de SANGER, Asp a été caractérisé comme acide aminé N-terminal. Après hydrolyse chymotrypsique, les quatre peptides suivants ont été isolés: (a) Asp-(Thr, Asp, Gly, Ser, Thr)-Asp-Tyr (la carboxypeptidase a détaché successivement Tyr et Asp), (b) Gly-Ileu-Leu, (c) Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ileu (les deux résidus sont amidés car $m = 0$) et (d) Ser-Arg. (a) est l'enchaînement N-terminal, (d) l'enchaînement C-terminal et (b) a pu être réuni à (a) grâce au peptide obtenu par hydrolyse pepsique: Tyr-Gly-Ileu-Leu. Dans l'enchaînement (a), l'enchaînement des cinq acides aminés entre parenthèses n'a pas pu être fixé de façon définitive ni après hydrolyse acide partielle, ni après hydrolyse pepsique. L'enchaînement le plus probable est celui qui est indiqué ci-dessous; le résidu de Asp qui se trouve entre parenthèses est amidé.

Asp-(Thr-Asp(NH₂)-Gly-Ser-Thr)-Asp-Tyr-Gly-Ileu-Leu-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ileu-Ser-Arg.

TABLEAU VIII
ÉTABLISSEMENT DE LA STRUCTURE DE T 14

Méthode	Substances isolées
SANGER	Gly
Chymotrypsine	Gly-Tyr Ser-Leu Gly-Asp(NH ₂)-Try Val-(SCMCys, Ala, Ala)-Lys
Pepsine	Tyr-Ser-Leu-Gly-Asp(NH ₂) Val--SCMCys-Ala
Hydrolyse acide partielle	Ala--Lys Ala-Ala
Structure	Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asp(NH ₂)-Try-Val--SCMCys-Ala-Ala--Lys

Structure de T 14: L'établissement de la structure est indiqué dans le Tableau VIII.

Structure de T 15: Le Tableau IX indique les peptides obtenus par divers procédés de scission et ayant servi à l'établissement de la structure de T 15. Les parties N- et C-terminales ont pu être réunies grâce à l'unité pepsique: Leu-Leu-Ser ou encore Leu-Ser-Ser. T 15 contient trois des huit demi-résidus de cystine du lysozyme. La SCMCys étant plus fragile au cours des analyses que l'acide cystéique (CySO₃H), nous avons vérifié les résultats obtenus à partir du lysozyme réduit par quelques expériences effectuées avec le lysozyme oxydé⁶. Il a été possible d'isoler, après action de la trypsine dont les traces de chymotrypsine n'ont pas été inactivées, le peptide Ser-Ser-Asp-Ileu-Thr-Ala-Ser-Asp(NH₂)-Val-CySO₃H-Ala-Lys. L'enchaînement C-terminal de T 15, contrairement à ce que nous avons dit préalablement³, ne contient

TABLEAU IX

PEPTIDES OBTENUS PAR DIFFÉRENTS PROCÉDÉS D'HYDROLYSE À PARTIR DE T 15

<i>Méthode</i>	<i>Partie N-terminale de T 15</i> <i>Substances isolées</i>
EDMAN	Asp-----Leu
Chymotrypsine	Asp(NH ₂)-Leu
Pepsine	Asp(NH ₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu Asp(NH ₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu-Leu Leu-Leu-Ser Leu-Ser-Ser
Hydrolyse acide partielle	Ileu-Pro Ileu-Pro-SCMCys Ser-Ala-Leu Leu-Leu
<i>Méthode</i>	<i>Partie C-terminale de T 15</i> <i>Substances isolées</i>
SANGER	Ser
Chymotrypsine	Ser-(Ser, Asp, Ileu, Thr, Ala, Ser)-Asp(NH ₂)-Val SCMCys-Ala-Lys
Trypsine non protégée	Ser-(Ser, Asp, Ileu, Thr, Ala, Ser, Asp, Val, SCMCys, Ala)-Lys
Pepsine	Leu-Ser-Ser Leu-Leu-Ser Ser-Ser-Asp Ileu-Thr-Ala Ser-Asp(NH ₂)-Val

TABLEAU X

ÉTABLISSEMENT DE LA STRUCTURE DE T 16

<i>Méthode</i>	<i>Substances isolées</i>
EDMAN	Ileu-Val
Chymotrypsine	Ileu-Val-(Ser, Asp, Gly, Asp, Gly, HS*, Asp(NH ₂))-Ala-Try Val-Ala-Try Arg
	A partir du lysozyme natif Met-Asp(NH ₂)-Ala-Try
Trypsine non protégée	Val-Ala-Try-Arg
Hydrolyse acide partielle	Ser-Asp Gly-Asp Gly-HS* Ser-(Asp, Gly)
Séquence déduite de l'action du NBS	Try-Val-Ala-Try
Structure	Ileu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-HS*-Asp(NH ₂)-Ala-Try-Val-Ala-Try-Arg

* HS, homosérine provenant de la méthionine.

donc qu'un seul demi-résidu de cystine. L'enchaînement obtenu par action de la pepsine: Asp(NH₂)-Ileu-Pro-CySO₃H-Ser-Ala-Leu-Leu auquel s'enchaîne la partie C-terminale de T 15, ne contient également qu'un seul demi-résidu de cystine. Le troisième demi-résidu de cystine ne peut donc être placé qu'entre l'enchaînement N-terminal de T 15: Asp(NH₂)-Leu et le peptide Asp(NH₂)-Ileu-Pro. Grâce au Tableau IX et aux expériences décrites ci-dessus, on peut attribuer à T 15 la structure suivante: Asp(NH₂)-Leu-SCMCys-Asp(NH₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ileu-Thr-Ala-Ser-Asp(NH₂)-Val-SCMCys-Ala-Lys. L'étude des mobilités des peptides: Asp(NH₂)-Leu ($m = 0$), Ser-Ser-Asp ($m = -0.30$) et Ser-Asp(NH₂)-Val ($m = 0$) a permis de préciser la position de deux résidus amidés. La mobilité de l'unité peptique Asp(NH₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu ($m = -0.30$) n'est pas en accord avec la présence de deux groupements acides; ici encore Asp est présent sous sa forme amidée.

TABLEAU XI

R_F ET m DES UNITÉS CHYMOTRYPSIQUES ISOLÉES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX-I X2

R_F et m , voir Tableau II.

Unité chymotrypsique	R_F	m
C 1	0	+0.7
C 2	0 et 0.02	+0.65 et +0.7
C 3	0.02	+0.65
C 4	0.02 et 0.18	+0.45 et +0.65
C 5	0.02 et 0.18	+0.45 et +0.65
C 6	0.18	+0.45
C 7	0.35	+0.35
C 8	0	+0.30
C 9	0.16	+0.50
C 10	0.27	+0.40
C 11	0	+0.20
C 12a	0	0
C 12b	0.78	0
C 13a	0.27	0
C 13b	0.20	+0.40
C 14	0.01	0
C 15	0	+0.30
C 16	0	0
C 17a	0.04	-0.30
C 17b	0.12	-0.25
C 18	0	-0.20
C 19	0.55	0
C 20	0.16	-0.46
C 21	0	-0.23
C 22	0.40	0
C 23	0	-0.20
C 24	0	-0.20
C 25	0.35	-0.60
C 26	0.35	-0.60

Notons enfin que l'unité chymotrypsique comprise entre Asp(NH₂)-Leu et la partie C-terminale (Ser-Ser -Lys) à savoir C 25 (Tableaux XI et XII) contient deux groupements carboxyliques libres, car sa mobilité est -0.60 . Il semble donc bien qu'elle renferme deux résidus de SCMCys, le résidu de Asp étant amidé.

Structure de T 16: L'établissement de la structure de T 16 peut être déduite du Tableau X. Comme le peptide Asp(NH₂)-Ala-Try a une mobilité nulle, il contient un résidu d'asparagine. T 16 entier ayant une mobilité $m = -0.35$ doit renfermer deux groupements acides: les deux autres résidus de Asp ne sont donc pas amidés.

Structure de T 17: La mobilité de T 17 implique la présence de deux groupements acides. L'un appartient au résidu SCMCys, l'autre à l'un des résidus de Asp; le deuxième résidu de Asp est donc amidé. L'acide N-terminal est Try. La structure est donc: Try-(Try, SCMCys, Asp, Asp(NH₂), Gly)-Arg. L'étude de l'action du NBS sur le lysozyme semble suggérer la présence dans la protéine d'une liaison Try-Try. L'enchaînement définitif des acides aminés entre parenthèses n'a pas encore été établi, mais le plus probable est celui qui est indiqué ci-dessus.

Etude des unités chymotrypsiques

Séparation des peptides par chromatographie sur colonne: La Fig. 3 montre la séparation des unités chymotrypsiques provenant de 375 mg de lysozyme réduit. 26 pics ont été caractérisés (C 1 à C 26).

Purification des unités chymotrypsiques: La pureté de chaque pic a été vérifiée par chromatographie et ionophorèse sur papier. Le Tableau XI indique les R_F (dans le Solvant A) et les mobilités des différents peptides. Les pics C 2, C 4, C 5, C 12, C 13 et C 17 contiennent deux substances.

Analyse des unités chymotrypsiques: En analysant après purification les unités chymotrypsiques, nous nous sommes rapidement aperçus des deux faits suivants, confirmés au cours de l'étude de la structure de ces séquences (voir plus loin): (a) une

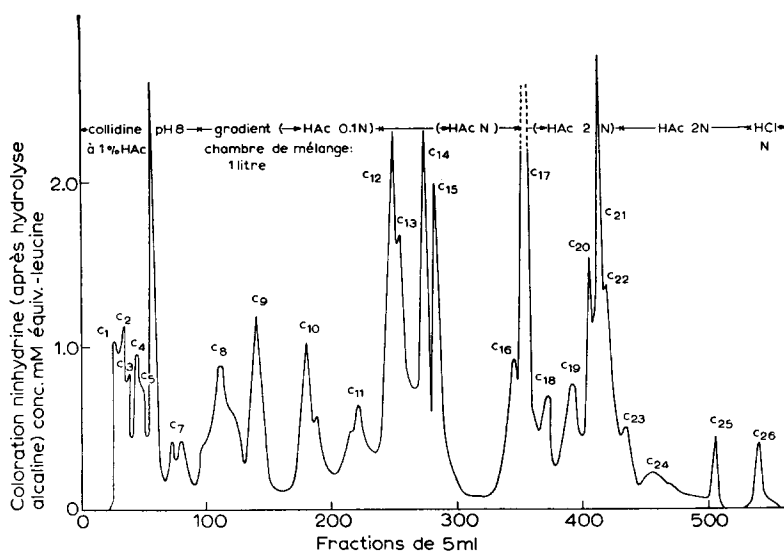


Fig. 3. Chromatographie sur Dowex-1 X 2 d'un hydrolysate chymotrypsique de lysozyme réduit, puis traité par l'acide iodacétique (375 mg). Colonne de 140 × 2.4 cm.

TABLEAU XII

COMPOSITION QUANTITATIVE EN ACIDES AMINÉS DES UNITÉS CHYMOTRYPSIQUES

Acides aminés	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12a	C12b	C13a	C14	C17a	C17b	C18	C19	C20	C21	C22	C25	Total
Gly	1		1	1		1	2	1				1	2			1	1		12
Ala			3			1		2		1	1		2	1				1	12
Ser				1			1			3			1		1	1	1	1	10
SCMCys	1					1	1	1				1	1					2	8
HS			1										1						2
Thr						1	1			2	1					2			7
Pro							1											1	2
Val		1				1			1		1		1	1					6
Leu	1		1				1	1				1					1	2	8
Ileu	1			1				1			1		1					1	6
Phe		1							1						1				3
Tyr			1	1												1			3
Try					1	1	1						1	1			1		6
Asp			2		1	2	3			2	2		3		1	3	1	1	21
Glu				1	1	1				1		1			1				5
Lys		1	1			1		1					2						6
Arg	2		1	1	1	2	2					1				1			11
His			1																1
Total	6	3	12	3	6	12	13	3	6	6	9	5	15	3	4	9	5	9	129

même unité chymotrypsique peut se retrouver dans deux pics différents, souvent fort éloignés. Ainsi le peptide Ala-Ala-Ala-HS-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH₂)-Tyr se retrouve dans les pics C 8 et C 15. Il semble qu'il soit fortement adsorbé sur la résine; quand on ajoute à la chambre de mélange de l'acide acétique 0.1 N, une certaine partie est éluée; le reste est décroché lorsque l'on modifie le gradient en ajoutant à la chambre de mélange de l'acide acétique 1 N. (b) Certains pics contiennent des séquences constituées par deux unités chymotrypsiques qui se suivent, la chymotrypsine ne scindant pas toutes les liaisons sensibles avec le même rendement. Il s'ensuit qu'une même unité chymotrypsique peut être retrouvée dans deux pics formés par des peptides de longueur différente. C 8 contient C 1 et Asp-Asp(NH₂)-Tyr; C 11 est formé de C 3 et de C 16. Dans le Tableau XII nous n'avons compté qu'une seule fois les unités chymotrypsiques que l'on retrouve soit dans plusieurs pics soit dans deux enchaînements de longueur différente. Les 129 acides aminés du lysozyme ont ainsi été caractérisés dans 18 unités chymotrypsiques.

Structure des unités chymotrypsiques: L'établissement de la structure chimique des unités chymotrypsiques ne contenant pas d'acides aminés basiques (C 12b, C 14, C 17a, C 19, C 20, C 22, C 25) ne sera pas décrite: il s'agit de séquences situées à l'intérieur des unités trypsiques étudiées plus haut. Nous étudierons ici seulement les peptides qui forment des ponts entre les unités trypsiques.

Structure de C 3, C 7, C 9, et C 13b: Il s'agit de di- ou tripeptides dont l'étude n'a présenté aucune difficulté.

Structure de C 6: L'acide aminé N-terminal est Ileu et l'acide aminé C-terminal Leu. Par hydrolyse trypsique on obtient les peptides: Ileu-Arg, Gly-SCMCys-Arg, Gly-SCMCys-Arg-Leu et de la Leu libre. La structure est donc: Ileu-Arg-Gly-SCMCys-Arg-Leu. Il s'agit de la séquence C-terminal du lysozyme.

Structure de C 8: Les acides N- et C-terminaux sont respectivement Ala et Tyr. Par hydrolyse trypsique, on obtient Ala-(Ala, Ala, HS)-Lys-Arg et His-(Gly, Leu, Asp, Asp(NH₂))-Tyr. Par hydrolyse chymotrypsique (rapport enzyme/substrat 1/20 pendant 8 h à 37°) on peut isoler les peptides: Ala-(Ala, Ala, HS, Lys, Arg, His, Gly)-Leu et Asp-Asp(NH₂)-Tyr. Par hydrolyse acide partielle, on forme les peptides: Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-HS, HS-Lys, Gly-Leu. De tous ces résultats, on déduit la structure: Ala-Ala-Ala-HS-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH₂)-Tyr.

Structure de C 10: L'acide aminé C-terminal est Try. Après hydrolyse trypsique, on obtient Try libre; on en déduit la séquence Arg-Try. Par hydrolyse acide partielle, on obtient Glu-Asp-Ileu et Ser-Arg. On en déduit la structure Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ileu-Ser-Arg-Try, le peptide ayant une mobilité $m = 0.40$.

Structure de C 11: L'acide aminé N-terminal est Arg; la séquence C-terminale déterminée par action de la carboxypeptidase est Ala-Try. Après hydrolyse trypsique, on obtient les peptides Arg-Asp(NH₂)-Arg et SCMCys-Lys-Gly-(Thr, Asp, Val, Glu(NH₂))-Ala-Try. Par hydrolyse chymotrypsique (rapport enzyme/substrat 1/10) on obtient: Arg-Asp(NH₂) et Arg-(SCMCys, Lys, Gly, Thr, Asp, Val, Glu(NH₂))-Ala-Try. Après hydrolyse pepsique, on caractérise notamment Val-Glu(NH₂)-Ala et dans un hydrolysate acide partiel Thr-Asp. De ces résultats on déduit la structure: Arg-Asp(NH₂)-Arg-SCMCys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Glu(NH₂)-Ala-Try.

Structure de C 12a: L'acide aminé C-terminal est Leu. Il a été vérifié que l'acide aminé N-terminal n'est pas Thr. Après hydrolyse trypsique, on isole les peptides: (Try, SCMCys, Asp, Asp(NH₂), Gly)-Arg, Thr-Pro-Gly-Ser-Arg et Asp(NH₂)-Leu.

La structure de C 12a est donc: (Try, SCMCys, Asp, Asp(NH₂), Gly)-Arg-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-Asp(NH₂)-Leu.

Structure de C 13a: Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Val et Phe. Après hydrolyse pepsique, on caractérise les peptides: Val-SCMCys-Ala et Ala-Lys-Phe, et après hydrolyse trypsique: Val-(SCMCys, Ala, Ala)-Lys et Phe libre. La structure est donc: Val-SCMCys-Ala-Ala-Lys-Phe.

Structure de C 16: La structure est établie comme celle de C 11.

Structure de C 17b: Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Gly et Leu. Après hydrolyse trypsique, on caractérise les peptides: Gly-Arg et SCMCys-Glu-Leu. La structure de C 17b est donc: Gly-Arg-SCMCys-Glu-Leu.

Structure de C 18: Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement SCMCys et Try. Après hydrolyse trypsique, on obtient: SCMCys-Ala-Lys, Lys libre et Ileu-Val-(Ser, Asp, Gly, Asp, Gly, HS, Asp(NH₂))-Ala-Try. La structure du peptide est donc: SCMCys-Ala-Lys-Lys-Ileu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-HS-Asp(NH₂)-Ala-Try (voir T 16).

Structure de C 21: Les enchaînements N- et C-terminaux sont respectivement Arg-Asp et Asp-Tyr. On a isolé d'autre part les peptides Arg-Asp (*m* = 0) et (Thr, Asp(NH₂), Gly) de mobilité nulle. C 21 a donc la structure suivante: Arg-Asp-(Thr, Asp(NH₂), Gly, Ser, Thr)-Asp-Tyr.

Le Tableau XIII indique la structure chimique de chacune des unités chymotrypsiques.

TABLEAU XIII

STRUCTURE CHIMIQUE DES UNITÉS CHYMOTRYPSIQUES

C 1	Ala-Ala-Ala-HS*-Lys-Arg-His-Gly-Leu
C 2	Mélange de C 1 et de C 3
C 3	Arg-Asp(NH ₂)
C 4 et C 5	Mélange de C 3 et de C 6
C 6	Ileu-Arg-Gly-SCMCys-Arg-Leu
C 7	Lys-Val-Phe
C 8	Ala-Ala-Ala-HS*-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH ₂)-Tyr
C 9	Arg-Gly-Tyr
C 10	Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ileu-Ser-Arg-Try
C 11	Arg-Asp(NH ₂)-Arg-SCMCys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Glu(NH ₂)-Ala-Try
C 12a	(Try, SCMCys, Asp, Asp(NH ₂), Gly)-Arg-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-Asp(NH ₂)-Leu
C 12b	Gly-Ileu-Leu
C 13a	Val-SCMCys-Ala-Ala-Lys-Phe
C 13b	Ser-Arg-Try
C 14	Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH ₂)
C 15	Ala-Ala-Ala-HS*-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asp(NH ₂)-Tyr
C 16	Arg-SCMCys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Glu(NH ₂)-Ala-Try
C 17a	Ser-Ser-Asp-Ileu-Thr-Ala-Ser-Asp(NH ₂)-Val
C 17b	Gly-Arg-SCMCys-Glu-Leu
C 18	SCMCys-Ala-Lys-Lys-Ileu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-HS*-Asp(NH ₂)-Ala-Try
C 19	Val-Ala-Try
C 20	Glu-Ser-Asp(NH ₂)-Phe
C 21	Arg-Asp-(Thr, Asp(NH ₂), Gly, Ser, Thr)-Asp-Tyr
C 22	Ser-Leu-Gly-Asp(NH ₂)-Try
C 23 et C 24	Comme C 18
C 25 et C 26	SCMCys-Asp(NH ₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu-Leu

* HS, homosérine provenant de la méthionine.

Réunion des unités tryptiques

Etablissement de la formule développée: Quelques unités tryptiques du lysozyme réduit ont pu être réunies grâce aux unités tryptiques provenant du lysozyme réduit et acétylé. Mais la formule développée du lysozyme n'a pu être obtenue que grâce aux unités chymotryptiques.

TABLEAU XIV

STRUCTURE CHIMIQUE DES UNITÉS TRYPTIQUES (CONTENANT DES RÉSIDUS DE Lys)
ISOLÉES À PARTIR DU LYSOZYME RÉDUIT ET ACÉTYLÉ

TA 1	Lys-Val-Phe-Gly-Arg
TA 2	SCMCys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-HS*-Lys-Arg
TA 3	Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asp(NH ₂)-Try-Val-SCMCys-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Ser-Asp(NH ₂)-Phe-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH ₂)-Arg
TA 4	SCMCys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val-Glu(NH ₂)-Ala-Try-Ileu-Arg
TA 5	Asp(NH ₂)-Leu-SCMCys-Asp(NH ₂)-Ileu-Pro-SCMCys-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ileu-Thr-Ala-Ser-Asp(NH ₂)-Val-SCMCys-Ala-Lys-Lys-Ileu-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-HS*-Asp(NH ₂)-Ala-Try-Val-Ala-Try-Arg

* HS, homosérine provenant de la méthionine.

Unités tryptiques provenant du lysozyme réduit et acétylé: Le Tableau XIV indique les cinq séquences contenant des résidus de lysine (acétylée) obtenues par action de la trypsine sur le lysozyme réduit et acétylé (TA 1 à TA 5). L'établissement de la structure de ces séquences ne sera pas décrit, les expériences déjà rapportées ci-dessus ayant permis de résoudre rapidement ce problème. Les séquences TA 1 et TA 2 avaient déjà été rencontrées au cours de l'étude de l'hydrolysate tryptique du lysozyme non acétylé; elles correspondent respectivement aux unités T 4 et T 6 (T 12 + T 1b). La question de la spécificité de la trypsine dans ces deux cas sera discutée plus loin. Les séquences TA 3, TA 4 et TA 5 ont permis de réunir respectivement les unités tryptiques: T 14 + T 8; T 9 + T 10; et T 15 + T 1a + T 16.

Etablissement de la formule développée du lysozyme: L'enchaînement N-terminal du lysozyme T 4 a pu être réuni à T 6 grâce à l'unité chymotryptique C 17b. L'existence du peptide C 12a exclut la réunion de T 17 et T 6. L'unité C 8 a permis ensuite la réunion de T 6 et de T 11.

L'unité chymotryptique C 9. Arg-Gly-Tyr n'est pas suffisante pour réunir les unités tryptiques T 11 et T 14. Nous avons fait appel ici au peptide Tyr-Arg-Gly isolé à partir du lysozyme après hydrolyse pepsique.

Les unités T 14 et T 8 ont été réunies grâce à C 13a. Les unités T 8 et T 13 n'ont pas pu être réunies grâce à la seule unité chymotryptique C 21: Arg-Asp-(Thr, Asp(NH₂), Gly, Ser, Thr)-Asp-Tyr; en effet Arg est N-terminal et le lysozyme contient 11 résidus de Arg. Nous avons fait appel ici à nouveau à une unité pepsique: Asp(NH₂)-Glu(NH₂)-Ala-Thr-Thr-Asp(NH₂)-Arg-Asp-(Thr, Asp(NH₂), Gly, Ser, Thr)-Asp.

Les unités T 13 et T 17 ont été réunies grâce à C 10.

Les unités T 17, T 2 et T 15 se sont trouvées jointes grâce à la seule unité chymotryptique C 12a.

Les unités T 15, T 1a et T 16 ont été réunies grâce à C 18.

a également été apportée. Seuls doivent encore être vérifiés les enchaînements des résidus 46 à 49 et 63 à 66 restés entre parenthèses.

Quelques études déjà anciennes et partielles, car portant seulement sur un nombre restreint de résidus d'acides aminés, avaient précédé la nôtre. THOMPSON¹⁵ a établi la structure de 25 séquences (tri- à hexapeptides); seulement six peptides ont été retrouvés dans notre formule: Thr-Asp-Val-Glu-Ala (dans T 10), Asp-Glu-Ala (dans T 18), Glu-Asp-Ileu (dans T 13), Asp-Ileu-Pro-Cys (dans T 15), Arg-Cys-Lys-Gly (dans C 11) et Asp-Leu-Cys-Asp (dans T 15). Deux autres peptides sont très proches des nôtres: Thr-Gly-Asp-Val (Gly-Thr-Asp-Val dans T 10), Ser-Val-Asp-Cys-Ala (dans T 15). ACHER *et al.*¹⁶ ont caractérisé dix enchaînements contenant plus particulièrement les résidus de His, Met, Pro, Tyr et Phe. Nous avons retrouvé les enchaînements: Lys-Val-Phe-Gly-Arg (T 4), Ala-Ala-Met (dans T 12), Ala-Lys-Phe-Glu (dans C 13a) et Asp-Tyr-Arg-Gly (dans C 9); les enchaînements contenant les deux autres résidus de Tyr et l'enchaînement Arg-His-Lys n'ont pas pu être vérifiés par nous. L'unique résidu de His du lysozyme fait en réalité partie de la séquence Lys-Arg-His. L'enchaînement N-terminal du lysozyme tel que nous l'indiquons dans le Tableau XV avait été établi par SCHROEDER¹⁷ (Lys-Val-Phe-Gly) et grâce à sa méthode, EDMAN¹⁸ a pu détacher les 14 premiers acides aminés. L'enchaînement C-terminal du lysozyme tel que nous l'avions indiqué dès 1957 (voir réf. 14) ne correspond pas à celui établi par OHNO¹⁹: Asp-Gly-Ala-Asp(NH₂)-Leu.

Quelques remarques s'imposent en ce qui concerne la spécificité des enzymes lors de leur action sur le lysozyme réduit, puis traité par l'acide iodacétique. La trypsine dont les traces de chymotrypsine ont été inactivées, scinde la chaîne peptidique seulement au niveau des groupements carboxyliques des résidus de Lys et de Arg; elle n'a cependant pas détaché la lysine N-terminale du lysozyme (on retrouve l'unité Lys-Val-Phe-Gly-Arg) et elle a rompu avec un faible rendement la liaison Lys-Arg dans T 12. Lorsque les traces de chymotrypsine ne sont pas inactivées, des coupures supplémentaires ont lieu principalement au niveau des groupements carboxyliques du premier résidu de Try de T 16 et de T 10 et du troisième résidu de Leu de T 15. Nos expériences ont montré qu'après l'acétylation du lysozyme, les coupures au niveau des groupements carboxyliques des résidus de Lys n'ont plus lieu. La chymotrypsine a scindé la chaîne peptidique au niveau des groupements carboxyliques des trois résidus de Tyr, des trois résidus de Phe, de cinq (sur six) résidus de Try (sauf dans C 12a), de sept (sur huit) résidus de Leu (le huitième résidu de Leu est l'acide aminé C-terminal du lysozyme), et de deux résidus de Asp(NH₂) qui sont suivis de résidus de Arg (dans T 8 et T 3). Aucune coupure n'a été constatée au niveau des résidus de Met modifiés par la réduction.

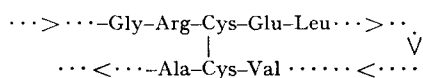
La pepsine n'a pas fait preuve d'une grande spécificité; elle a souvent scindé la chaîne peptidique au niveau des groupements aminés ou carboxyliques des résidus d'acides aminés sensibles à l'action de la chymotrypsine.

Au cours d'une étude de l'action du NBS sur le lysozyme²⁰, les séquences Try-Val (deux fois), Try-Arg et Try-Ileu avaient été déterminées; ces séquences ont été retrouvées dans les enchaînements étudiés plus haut.

Dans le cadre plus général de nos études de structure effectuées avec le lysozyme dénaturé par la chaleur, oxydé ou réduit, nous n'avons jusqu'à présent obtenu, par voie enzymatique et dans les conditions indiquées dans la partie MÉTHODES aucun peptide ayant conservé son action biologique (lyse de suspensions de *Micrococcus*

lysodeikticus). Le lysozyme privé de sa leucine C-terminale est actif. Après dénaturation par chauffage, l'enzyme est inactivé; mais une certaine activité reparaît au bout de 24 h et le rendement de l'hydrolyse trypsique diminue en même temps que l'activité augmente. Au cours de l'oxydation par l'acide performique qui transforme les résidus de cystine en rompant les ponts -S-S-, l'activité biologique disparaît. Lorsqu'on réduit le lysozyme par l'acide thioglycolique, il perd également, mais de façon réversible, son pouvoir lysant; des expériences de réduction partielle ont montré que le maintien d'au moins deux ponts -S-S- semble nécessaire pour que l'enzyme demeure actif. Au cours de l'action du NBS et au fur et à mesure de la disparition des résidus de Try, l'activité lysante disparaît²⁰. Par contre au cours de l'action de l'acide iodacétique à pH 5.5 sur le lysozyme (dans des conditions où la transformation de His serait possible²¹), seule une très faible perte de l'activité enzymatique a été constatée et l'histidine ne semble pas être transformée au cours de ce traitement; l'histidine ne paraît pas être accessible dans ces conditions et serait peut-être engagée dans une liaison hydrogène. Notons à ce propos l'importance accordée par LÉONIS²² à la structure tertiaire (et en particulier aux liaisons hydrophobes) pour le maintien d'un lysozyme pleinement actif.

Dans le but d'éclaircir les relations pouvant exister entre structure chimique et activité biologique, nous avons poursuivi notre étude comparée des lysozymes d'origines diverses qui, tous, présentent qualitativement le même pouvoir lysant²³. Nous essayons également d'obtenir par voie enzymatique et à partir du lysozyme de blanc d'oeuf de poule des séquences présentant une certaine activité. Pour cela la connaissance de la disposition des quatre ponts -S-S- des résidus de cystine était indispensable; cette étude est en voie d'achèvement et un premier pont a été localisé entre les demi-résidus de cystine No. 1 et No. 2 (voir réf. 24) du Tableau XV:



REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier Monsieur le Professeur E. LEDERER de toutes les facilités qu'il nous a accordées pour mener à bien ce travail.

Nous remercions Mme J. CALMETTES et Mlle A. BROCHET de leur efficace et précieuse collaboration technique.

RÉSUMÉ

Tous les détails concernant l'établissement de la structure chimique du lysozyme du blanc d'oeuf de poule (brièvement publiée en 1961) sont indiqués dans la présente étude. Les 18 unités trypsiniques obtenues par chromatographie sur Dowex-1 X2 à partir du lysozyme réduit puis traité par l'acide iodacétique ont été réunies dans l'ordre qu'elles occupent au sein de la molécule primitive grâce aux unités chymotrypsiniques contenant un acide aminé basique, et dans deux cas, grâce à des unités pepsiniques. La protéine est formée par une seule chaîne peptidique de 129 acides aminés plus ou moins repliée par les quatre ponts -S-S- des quatre résidus de cystine; l'un de ces ponts a déjà été caractérisé. Quelques considérations sont faites sur les relations existant entre structure chimique et activité biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. JOLLÈS ET P. JOLLÈS, *Compt. Rend.*, 253 (1961) 2773.
- ² J. JOLLÈS ET P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 407.
- ³ J. JOLLÈS, P. JOLLÈS ET J. JAUREGUI-ADELL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1319.
- ⁴ P. JOLLÈS, dans P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 4, 2ème ed., Academic Press, New York, 1960, Chapitre 25.
- ⁵ H. FRAENKEL-CONRAT, A. MOHAMMAD, E. D. DUCAY ET D. K. MECHAM, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 625.
- ⁶ J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 298.
- ⁷ P. JOLLÈS ET J. JOLLÈS, *Compt. Rend.*, 246 (1958) 1109.
- ⁸ H. G. GUNDLACH, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1761.
- ⁹ K. HOFMANN ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 81.
- ¹⁰ K. A. PIEZ ET L. MORRIS, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 187.
- ¹¹ J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
- ¹² H. FRAENKEL-CONRAT, R. S. BEAN ET H. LINEWEAVER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 385.
- ¹³ R. C. WONG ET I. E. LIENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 80.
- ¹⁴ P. JOLLÈS, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 290.
- ¹⁵ A. R. THOMPSON, *Biochem. J.*, 61 (1955) 253.
- ¹⁶ R. ACHER ET C. FROMAGEOT, *Soc. Biol. Chemists, India Silver Jubilee Souvenir*, (1955) 277.
- ¹⁷ W. A. SCHROEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5118.
- ¹⁸ P. EDMAN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 88 (1960) 602.
- ¹⁹ K. OHNO, *J. Biochem. Tokyo*, 42 (1955) 615.
- ²⁰ I. BERNIER ET P. JOLLÈS, *Compt. Rend.*, 253 (1961) 745.
- ²¹ H. G. GUNDLACH, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1754.
- ²² J. LÉONIS, 2ème Symp. Lysozyme, Milan, 1961, Vol. 1, 1961, p. 125.
- ²³ P. JOLLÈS, *Angew. Chem.*, 75 (1963); *Angew. Chem. intern. ed. Engl.*, 4 (1964), sous presse.
- ²⁴ J. JOLLÈS, J. JAUREGUI-ADELL ET P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 71 (1963) 488.

Biochim. Biophys. Acta, 78 (1963) 668-689