

Synthèse d'un inhibiteur du lysozyme utilisable en chromatographie d'affinité

Abdelmoula RZAMA¹□ & Moussa ETTALIBI¹

(Reçu le 20/10/1995 ; Révisé le 6/02/1996 ; Accepté le 6/01/1997)

تفاعل بين ليزوزيم أبيض بيض الدجاج ومضاد السيفاروس

تم التطرق إلى طريقة تهيء مواد تتفاعل مع ليزوزيم أنزيم و الذي استخرج من أبيض بيض الدجاج من خلال استعمال الكيتين. استعملت طريقتين لاستخلاص مادة متفاعلة مع هذا الأنزيم هي Di-N- Acétyl- p aminophényl-1- hiochito bioside بمعدل عالي. وقد حصل على صفاء اليزوزيم المهية بمركب الكروماتوغرافيه بنسبة 70%.

الكلمات المفتاحية : الكيتين - مادة متفاعلة - أنزيم - ليزوزيم الكروماتوغرافيه - السيفاروس

Synthèse d'un nouvel inhibiteur du lysozyme utilisable en chromatographie d'affinité

L'objectif de ce travail est l'obtention, par hydrolyse de la chitine, de substrats du lysozyme de blanc d'œuf de poule et la synthèse d'un nouvel inhibiteur de cette enzyme. Deux méthodes d'acétolyse de la chitine, une hydrolyse acide et une hydrolyse enzymatique ont été utilisées. La synthèse organique de l'inhibiteur est réalisée à partir du chitobiose et du p-thiophénylamine. L'inhibiteur sélectif, le di-N-acétyl p-aminophényl 1-thiochitobioside, est obtenu avec un excellent rendement. Ce composé est greffé sur le sépharose-4B activé via la carbodiimide. La chromatographie d'affinité sur ce gel montre une absorption sélective de l'enzyme. Cette protéine est désorbée avec un rendement de 70%.

Mots clés: Inhibiteur -Lysozyme - Blanc d'œuf de poule - Chromatographie d'affinité - Sépharose 4B - Chitine

Synthesis of a new inhibitor of lysozyme used in affinity chromatography

The objectif of this work is to obtain substrates of hen egg white lysozyme from chitine and synthetize a new inhibitor of this enzyme. Two acetolysis of chitine, one hydrolysis acid and one enzymatic hydrolysis were used. The organic synthesis of inhibitor was realised from chitobiose and p-thiophenylamin. A selective inhibitor, Di-N-acetyl p-aminophényl-1-thiochitobioside was obtained with a high yield. This product was fixed on activated sepharose-4B via carbodiimide. The affinity chromatography showed the selective adsorption of lysozyme. This protein was desorbed with high yield (70%).

Key words : Inhibitor - Lysozyme - Egg white - Affinity chromatography - Sepharose 4B - Chitine

¹ Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Institut agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202 - Instituts, 10101 Rabat, Maroc

□Auteur correspondant

INTRODUCTION

Le lysozyme (E.C.3.2.1.17, mucopéptide N-acétylmuramyl hydrolase) isolé essentiellement du blanc d'œuf de poule a reçu des applications dans le domaine de l'agro-alimentaire et médical. Il peut être utilisé, par exemple, pour la réduction de la température de stérilisation des aliments dans leur emballage, prévenir la multiplication de gaz dans les fromages (Proctor et Cunningham, 1988) et en tant que bactériostatique.

Durant les dernières décennies de nombreux chercheurs (Alderton *et al.*, 1945, 1946 ; Bailon & Nishikawa, 1977; Ballardie *et al.*, 1977 ; Chang *et al.*, 1986a,b ; Coulon & Walt, 1986 ; Delmotte & Monsigny, 1974 ; Osawa 1966 ; Rupley & Gates, 1967; Sykes *et al.*, 1979, Chiang *et al.*, 1993) se sont intéressés à la purification du lysozyme de blanc d'œuf de poule.

La méthode classique de cristallisation de cette protéine est très utilisée dans l'industrie (Alderton & Fevold, 1946 ; Durance & Nakai, 1988). D'autres méthodes avantageuses ont été étudiées, telles la chromatographie échangeuse d'ions (Li-Chan *et al.*, 1986), la chromatographie d'affinité (Eshdat et Sharon, 1973; Rafestin *et al.*, 1974; Fernandez-Sousa *et al.*, 1978, Chiang *et al.*, (1993), l'ultrafiltration (Chang *et al.*, 1986.a,b).

Le lysosome est une muramidase dont le rôle essentiel est de provoquer la lyse bactérienne (Baosson, 1938; Sykes *et al.*, 1979). L'enzyme contient six sites actifs A, B, C, D, E & F où peuvent se fixer six résidus pyranoses. Le clivage semble se faire entre les sites D et E (Osawa, 1966; Sharon & Seifter, 1964 ; Pollock & Sharon, 1970).

Le lysozyme semble cliver un tétrasaccharide de la paroi cellulaire (Sykes *et al.*, 1979; Fukamizo *et al.*, (1986). Ce tétrasaccharide est un dimère formé d'unité disaccharidique répétée N-acétyl D-glucosamine β (1-4) acide N-acétyl D-Muramique liée par des liaisons osidiques β (1-4), se rapprochant du point de vue structural de la chitine, principal constituant organique (polymère β (1-4) du 2- acétamido 2-déoxy β D-glucose) du squelette externe des arthropodes (Sharon, 1986). Ces polymères, dérivés de la chitine, sont biodégradables et jouent le rôle de transporteur à retardement de médicaments (Muzzarelli 1977).

Muzzarelli *et al.* (1978) ont purifié et isolé le lysozyme sur le chitosane dérivé de la chitine par

chromatographie d'affinité. Récemment, Chiang *et al.* (1993) ont purifié cette protéine par ultrafiltration et chromatographie d'affinité sur la chitine. L'enzyme présente une affinité spécifique pour les oligomères de la N-acétyl D-glucosamine homologues comme le chitobiose, le chitotriose et le chitotétraose.

Les dérivés de l'acétamido 2-déoxy 1-thio β D-glucose (Rafestin *et al.*, 1974) possédant des groupes actifs sur les carbones anomères peuvent être utilisés dans la purification des glycosyl-hydrolases par chromatographie d'affinité sur gel de sépharose greffé à ces polysaccharides. La synthèse et le mécanisme d'action de divers oligomères fonctionnalisés sur le lysozyme ont été étudiés par plusieurs auteurs (Spinola & Jeanloz, 1970; Khorlin *et al.*, 1972; Rafestin *et al.*, 1974 ; Delmotte & Monsigny, 1974 ; Ballardie *et al.*, 1977).

L'objectif de cette étude est la synthèse d'un nouvel inhibiteur à partir de dérivés de la chitine en l'occurrence le p-aminophényl-1-thiochitobiose. La fonction amine de cet inhibiteur permet sa fixation sur le gel de sépharose activé en présence de carbodiimide. La purification du lysozyme est effectuée, par la suite, par chromatographie d'affinité sur ce gel. L'adsorption sélective de cette enzyme sur ce gel est démontrée par comparaison avec un gel témoin préparé à partir CH-sépharose où on a greffé l'aniline (Ph-NH₂) qui n'est ni substrat ni inhibiteur de cette enzyme.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Techniques d'analyse

Les points de fusion sont mesurés sur platine de Leitz sous microscope. Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 ont été réalisés à l'aide d'un appareil Bruker 100 Mhz assisté d'un ordinateur. Les pouvoirs rotatoires sont déterminés à l'aide d'un polarimètre (Roussel-Jouan) à température ambiante. Les standards (chitobiose, chitotriose) utilisés en CLHP et le lysozyme en chromatographie d'affinité sont de qualité Sigma.

Les évaporations ont été effectuées sous pression réduite à 35-40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Buchi. Les extraits chloroformiques ont été lavés avec des solutions glacées d'hydrogencarbonate et hydrogésulfate de potassium ou avec des solutions saturées de chlorure de sodium.

Les produits obtenus par acétolyse ou hydrolyse acide de la chitine et ceux obtenus par synthèse organique sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice (Merck 60G, 70-230 mesh) avec un gradient du mélange CHCl_3 -MeOH. Les composés séparés sont recristallisés à froid dans les solvants indiqués.

L'homogénéité des composés préparés est contrôlée par chromatographie sur couches minces (CCM) de gel de silice (plaque d'Aluminium Merck, F254) avec comme éluants les mélanges suivants : chloroforme / méthanol : 90/10 (v/v), acétate d'éthyle/acétone : 4/1 (v/v). La révélation est effectuée sous UV ou par vaporisation d'une solution d'acide sulfurique à 25% et chauffage à 100°C pendant 5 min.

Les chromatographies préparatives sont réalisées sur colonne de gel de silice (Merck N°7734), les fractions recueillies dans un collecteur de fractions étant de 10 ml. Les éluants cités précédemment sont utilisés également ici.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est réalisée à l'aide d'un appareil Waters 560 (colonne C_{18} , NH_2). Le mélange (acétonitrile/eau : 70/30, v/v) est utilisé avec un débit de 1,0 ml/min. La détection U.V. est faite à 215 et 300 nm.

2. Synthèse de substrats par acétolyse

On a utilisé deux méthodes d'acétolyse pour la préparation des substrats dérivés de la chitine.

• Méthode de Barker *et al.* (1958) modifiée

La chitine (Sigma), finement broyée (20g) est acétolysée dans un mélange d'anhydride acétique (100ml) et d'acide sulfurique concentré (13ml) selon la méthode de Barker *et al.* (1958) modifiée par Spinola & Jeanloz (1970) et Delmotte *et al.* (1974). On a à notre tour modifié la durée de la réaction, la température et le mode d'extraction. Après 18h d'agitation à température ambiante, la suspension est maintenue à 55°C pendant 8 h. Le mélange réactionnel est neutralisé avec une solution d'acétate de sodium (15%). Après une nuit à froid, la solution est extraite au chloroforme ; les extraits sont rassemblés, lavés à l'eau, 2 fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase organique est séchée puis concentrée à sec. Le sirop obtenu est séché sous pression réduite à 40°C puis séparé par chromatographie sur gel de silice avec un mélange isocratique (acétone/AcOEt, 4:1). Le chitobiose (4,5 g, 12,8%) et le chitotriose (2,4g, 6,8%) obtenus sont recristallisés dans le méthanol.

• Méthode de Narvi *et al.* (1987) modifiée

La technique de Narvi *et al.* (1987) appliquée à la cellulose a été modifiée. Des essais préliminaires sur 1 et 10g de chitine (Sigma) ont été effectués dans différentes conditions pour optimiser le rendement de la réaction. La chitine (10g) finement broyée est ajoutée petit à petit dans le mélange anhydride acétique/acide acétique/tétraméthylurée (Me_4U) dans les proportions 16,5/15/20 en volume. Le mélange est chauffé à 100°C sous agitation pendant 30 min. Après refroidissement, on ajoute 300 ml de CHCl_3 , puis on neutralise l'excès d'acide avec une solution d'hydrogénate de sodium. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée à sec. Le résidu visqueux est précipité à froid une nuit dans le mélange éther diéthylique/chloroforme (2/1, v/v). Le précipité blanc est séparé, par la suite, par chromatographie sur gel de silice avec un gradient chloroforme/méthanol (9/1, v/v). Le chitobiose (15%) et le chitotriose (8%) isolés sont analysés par CLHP.

Le produit d'hydrolyse est dilué au chloroforme, neutralisé à pH=7, lavé à l'eau, séché sur MgSO_4 , filtré puis concentré à sec. Le résidu obtenu est précipité à froid dans le mélange $\text{Et}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ (2/1, v/v) puis séparé par chromatographie liquide sur gel de silice avec un gradient $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$.

3. Synthèse de substrats par hydrolyse

• Hydrolyse acide

La chitine finement broyée est mise sous agitation mécanique en présence d'acide chlorhydrique concentré (100ml) selon la méthode de Smith *et al.* (1973) qu'on a modifiée comme suit: l'agitation est réalisée à 0° pendant 2h, puis à température ambiante pendant 30 min à 55°C puis 30 min sous vide. Le résidu est mis dans 350 ml d'eau distillée et l'acide chlorhydrique est alors neutralisé avec du carbonate de plomb. Le filtrat est passé sur résine anionique et cationique (type MB3) avant d'être concentré et lyophilisé. La poudre blanche obtenue est analysée par CLHP.

• Hydrolyse enzymatique

Les oligomères de degré de polymérisation (DP) 1 à 6, solubilisés dans 80 ml de tampon acétate/citrate (pH=4,6) sont mis en présence de 20 ml d'une solution enzymatique (lysozyme à 1% en solution aqueuse) dans une cellule d'ultrafiltration Amicon UM05 (Millipore 0,45 μm) avec agitation sous pression d'azote à 2,5 bars. Au bout de 18 heures,

les solutions internes et externes de la cellule Amicon sont dialysées. Les solutions d'oligomères sont concentrées séparément puis lyophilisées.

4. Synthèse du p-aminophényl 1-thiochitobioside pentahydroxyde (III)

• Le chlorure de chitobiosyle (I)

Le chlorure de chitobiosyle (I) est préparé selon la méthode de Osawa (1966), modifiée par addition de chlorure d'acétyle. Le chitobiose peracétylé (250mg) est ajouté dans une solution d'acide acétique glacial (1ml) présaturé d'acide chlorhydrique puis 3ml de chlorure d'acétyle sont additionnés. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation magnétique pendant 48 heures à température ambiante. Après refroidissement, on ajoute 30 ml de chloroforme. La phase organique est lavée à l'eau et avec une solution glacée de NaHCO_3 , une deuxième fois à l'eau+glace, puis séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée à sec. Les cristaux jaunes obtenus (64%) sont recristallisés dans CHCl_3 -AcOEt-Pentane (1/1/1, v/v).

• Le p-aminophényl 1-thiochitobioside peracétate (II)

Dans un ballon de 50 ml sous azote, on solubilise le p-thiophénylamine (76 mg ; 0,6 mmole) dans 4 ml de diméthylformamide (DMF) et 30 mg d'hydrure de sodium (NaH) à 50%. Le mélange est agité pendant 5 mn sous atmosphère d'azote. Le composé I (260 mg ; 0,4 mmole) solubilisé dans 2 ml de DMF est ajouté au mélange réactionnel, puis l'agitation est maintenue sous azote pendant 30 mn. L'excès d'hydrure est neutralisé à l'eau. Le produit est extrait avec 3x25 ml de CHCl_3 , les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau puis séchées, filtrées et concentrées à sec. Le produit (II) attendu est purifié par chromatographie sur gel de silice ou Florisil avec le mélange isocratique $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1, v/v). Le rendement après cette séparation est de 89%, le p-aminophényl 1-thiochitobioside (II) est recristallisé dans l'acétone à froid.

• Le p-aminophényl 1-thiochitobioside pentahydroxyde (III)

Le composé (II) peracétate (240 mg, 0,3 mmol) solubilisé dans 10ml du mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Et}3\text{N}$ (2/1/1) est maintenu sous agitation à température ambiante 1 nuit puis 30 min dans un bain-marie.

La réaction est suivie sur CCM dans le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/24/4). Le mélange réactionnel est neutralisé avec 0,2ml AcOH puis concentré à sec. Le résidu est solubilisé dans 120 ml de CHCl_3 . La phase chloroformique est lavée 2 fois à l'eau, 1 fois avec une solution NaCl saturée. Les phases aqueuses sont extraites au CHCl_3 . Les phases organiques sont rassemblées, séchées, filtrées et concentrées à sec. Les cristaux blancs obtenus sont solubilisés dans 20 ml d'eau, puis la solution est filtrée sur coton, concentrée et lyophilisée sous forme de poudre blanche. Le rendement de la réaction est de 70%. Le produit obtenu hydrosoluble sera fixé sur le gel pour la chromatographie d'affinité.

5. Chromatographie d'affinité

• Greffage du gel de sépharose

Le gel de sépharose 4 B activé est gonflé (1,25 g) dans 5 ml de NaCl (0,5 M) pendant 3h, puis lavé sur verre fritté de porosité 3 par 250 ml NaCl (0,5 M) et 250 ml d'eau distillée. Le p-aminophényl 1-thiochitobiose pentahydroxyde (100 mg ; 0,18 mmol) est dissous dans l'eau (4ml) et le pH est ajusté à 4,5 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (0,1N). La solution obtenue et le gel sont alors ajoutés à l'agent de couplage (solution de carbodiimide, 150 mg, 1 ml) et le pH est ajusté à 4,5. Le tout est agité 3 à 4h dans un ballon de 50ml à l'aide d'un évaporateur rotatif pour éviter la détérioration du gel par une agitation mécanique. Le pH est contrôlé pendant les 2 premières heures. Ensuite, le gel est filtré, lavé sur verre fritté à l'eau distillée (100ml), repris 3 à 4 h par du tris (hydroxyméthyl) aminométhane (0,605 g, 5mM) pour bloquer les groupes actifs restants de l'agent de couplage. Après filtration, le gel est rincé à l'eau distillée (250 ml), puis avec une solution NaCl (1M, 250 ml) dans le tampon carbonate (0,1M).

Parallèlement, un témoin est préparé à partir de 2 ml de gel gonflé, traités comme précédemment, mais où le p-aminophényl 1-thiochitobiose est remplacé par de l'aniline distillée (Ph-NH_2 , 8 μl , 86 μmol).

• Colonne de chromatographie

Les solutions enzymatiques de lysozyme 5 mg dans 200 μl de tampon acétate (0,01M) à pH 4,8 sont déposées en tête d'une colonne Amicon GA (10 mm x15 cm) contenant 6 ml de gel d'affinité (préparé comme décrit précédemment) préalablement équilibré dans un tampon acétate (0,01M) à pH 4, 8 et maintenu à 4°C.

Le débit est fixé à 12 ml.h⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique (LKB Micropèrplex). Les fractions recueillies sont suivies en continu à 280 nm (détecteur LKB-Uvicords), sensibilité : 0,1, défilement du papier 0,5 mm/mn. L'éluion au tampon acétate (0,01M, pH 4,8) n'exclut pas le lysozyme de la colonne. L'enzyme est désorbée à l'aide d'une solution de l'urée 4M.

Un essai à blanc est conduit de la même manière sur le gel greffé avec de la phénylamine (Ph-NH₂). L'enzyme, dans ce cas, n'étant pas retenue, donne, après lavage au tampon acétate (0,01 M à pH 4,8), le pic caractéristique de la protéine.

La solution enzymatique (EWL, 100µl, 10mg/200µl) est déposée au sommet de la colonne de chromatographie d'affinité. L'éluion est faite à l'aide d'une solution d'urée 4 M dans le tampon acétate (0,01 M) à pH 4,8. Le volume mort de la colonne étant de 850 µl, on récupère un volume de 1,5 ml. Le lysosyme est purifié avec un rendement de 70%.

6. Dosage des protéines

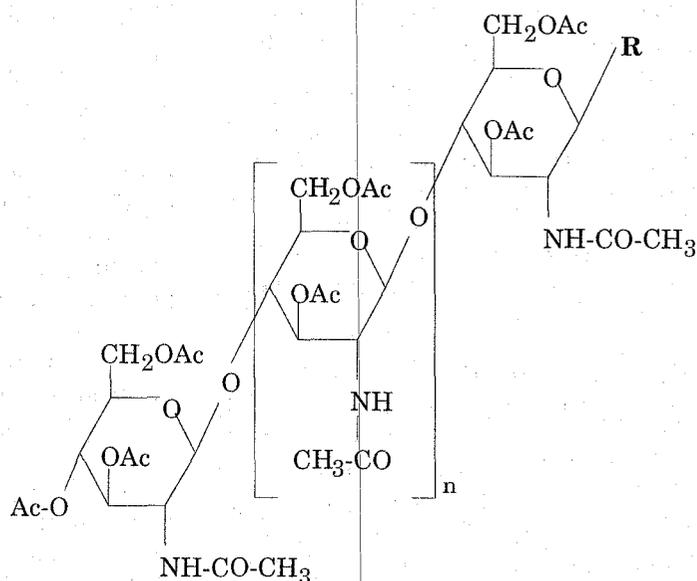
Du fait de la dénaturation du lysozyme par la solution d'urée 4M, on a suivi l'exclusion de l'enzyme adsorbée par le dosage des protéines. On a utilisé la méthode de Lowry *et al.* (1951) avec deux gammes étalons Albumine Serum Bovine (BSA) et lysozyme du blanc d'œuf (EWL).

RÉSULTATS & DISCUSSION

On a utilisé deux méthodes d'acétylolyse de la chitine pour l'obtention quantitative de chitobiose et de chitotriose. Le produit d'acétylolyse de la chitine (première méthode) est brun, tre (9,7g). Barker *et al.* (1958) Delmotte *et al.* (1974) ont obtenu respectivement 2,8 et 7,4g. Par la modification qu'on a effectué, on a amélioré le rendement de la réaction.

Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant un gradient CHCl₃/MeOH allant de 95/5 à 70/30 (v/v). Les fractions contenant les monomères, dimères et chitotrioses peracétylés ont été suivies par CCM analytique dans le système de solvant CHCl₃/MeOH (19/1 ; v/

v). Ces dérivés acétylés séparés sont purifiés par recristallisation deux fois dans le méthanol (voir ci-dessous la structure des produits). La pureté de ces oligomères est contrôlée par CLHP en utilisant les standards Sigma.



$n = 0$; $R = OAc$ ----> Chitobiose peracétylé

$n = 1$; $R = OAc$ ----> Chitotriose peracétylé

$n = 0$; $R = Cl$ ----> Chlorure de chitobiosyle peracétylé (I)

$n = 0$; $R = SPhNH_2$ ----> p-aminophénulthio 1- chitobioside peracétylé (II)

$n = 0$; $Ac = H$; $R = SPhNH_2$ ----> p-aminophénulthio 1- chitobioside (III)

Les résultats obtenus: 2-acétamido 2-déoxy D-glucose avec un rendement de 34%, un Rf de 0,62 dans le mélange CHCl₃-MeOH (9/1, v/v), le chitobiose (4,5g ; 12,8%), point de fusion Pf 302-304°C (Ballardie *et al.* (1977) ont trouvé 304°C) ; son pouvoir rotatoire à 25°C et à la concentration c dans l'acide acétique $[\alpha]_D^{25^\circ C} = +53,0$ (c0,5AcOH), un Rf 0,54 ; il est caractérisé par les déplacements chimiques en RMN du carbone 13 des carbones anomères C1:90,4 ppm; C1' 102,5 ppm. Le chitotriose a les données suivantes : un rendement de 6,8% ; Rf 0,45 ; Pf 316°C(317) et un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25^\circ C} = +33,2$ (c0,5AcOH).

On a constaté, par analyse RMN, la présence du chitobiose sous forme de deux isomères α et β . Seul l'isomère β réagit pour donner le chlorure de chitobiosyle (I). Ceci affecte bien évidemment le rendement quantitatif du produit (I). C'est pour cela qu'on a utilisé en parallèle la deuxième méthode.

Celle-ci est inspirée de celle de Narvi (1987) pour l'hydrolyse de la cellulose. Les réactions d'hydrolyse de la chitine sont effectuées dans un mélange d'acide acétique, d'anhydride acétique, d'acide sulfurique concentré et de tétraméthylurée à 100°C pendant 20 à 30 min. Cette méthode d'acétylation nous a permis, après purification, d'obtenir de meilleurs rendements en chitobiose (15%) et chitotriose (12%).

D'autres oligomères comme le chitotétraose, le chitopentaose et le chitoheptaose ont été détectés dans le mélange réactionnel et confirmé par CLHP. Le chitobiose et le chitotriose peracétylés présentent les caractéristiques en RMN ¹H à 100Mhz dans l'acétone deutériée (CD₃COCD₃) et l'infra rouge (IR).

Le chitobiose octaacétate: IR (cm⁻¹): 3300 (NH), 1740(OAc)1650(Amide I),1540(Amide II); RMN ¹H (d en ppm) 1,20-1,80 (6H, singuliet x 2 N-et N'-COCH₃) 1,95-2,16 (18H, 6xOAc) ; 4,64-4,69) 2H multiplet, C1-H et C1'-H), 7,88-8,05 (2 H, multiplet, NH et N'H).

Chitotriose undécaacétate: IR (cm⁻¹): 3300 cm⁻¹ (NH), 1740 cm⁻¹ (OAc), 1640 cm⁻¹ (Amide I) et 1540 cm⁻¹ (Amide II) 1450 (Amide III); 1,73-1,80 (9H, singuliet, N-COCH₃, N'-COCH₃, et N''COCH₃), 1,93-2,20 (24 H, 8 OCOCH₃), 7,89-7,98 (3H, multiplet, NH, N'H et N''H)

Le chitobiose est utilisé par la suite pour synthétiser le chlorure de chitobiosyle (I) (NAG₂Cl). Ce dernier est obtenu avec un rendement de 64% et un point de fusion de 208-209°C. Ce composé est identifié par RMN du ¹H (en ppm) dans l'acétone deutériée (2,27-2,53 ; 7 singulets, 7x3 protons, 2 N-COCH₃ et 5 O-COCH₃). Les carbones anomères donnent les déplacements chimiques suivants en RMN du carbone 13, C-1 à 92,8 ppm, C-1' à 101,2 ppm. Ces caractéristiques physico-chimiques concordent avec celles données par Spinola & Jeanloz (1970), Sykes *et al.* (1979).

Le chlorure de chitobiosyle condensé avec le p-aminothiophényle donne le p-aminophényl 1-thiochitobioside (II) obtenu avec un rendement de 89% comme décrit dans matériels et méthodes présente les caractéristiques suivantes: Rf=0,8 dans CHCl₃/MeOH : 20/1 et un point de fusion Pf 228-230°C ; son spectre IR donne les bandes d'absorptions maximales en cm⁻¹ 3250 (NH,

primaire) , 3060 (CH, Ph) ; 1740 (OAc) ; 1660 (Amide I), 1605 et 1595 (C=C, Ph) ; 1530 (Amide II) Le spectre RMN ¹H dans le méthanol (CD₃OD) donne les déplacements chimiques suivants en ppm : 1,80-1,85 (2 singulets, 2x3 protons, 2CH₃, NHCOCH₃) ; 1,95- 2,18 (5 singulet, 5x3p, 5 OCOCH₃) ; 7,92 (1 doublet , 4 protons, Phényl)

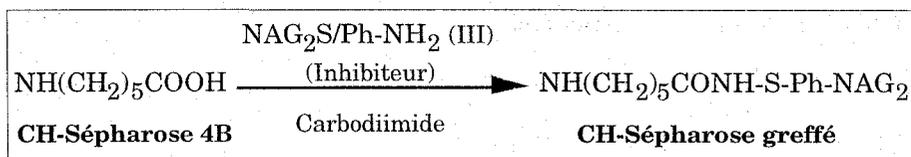
L'analyse par CLHP de l'extrait d'hydrolyse acide de la chitine montre la présence d'oligomères de degré de polymérisation (DP) variant de 1 à 6. Le chitobiose est bien représenté. Ces oligomères de qualité supérieure sont utilisés en CLHP préparative ou acétylés ou utilisés pour étudier l'affinité du lysozyme (hydrolyse enzymatique) pour ces polysaccharides.

Ces oligomères sont acétylés par la suite par un mélange d'anhydride acétique-pyridine (1/1, v/v) et quelques cristaux de diméthylaminopyridine.

L'analyse par CLHP des produits de l'hydrolyse enzymatique de la chitine préhydrolysée par voie acide révèle une augmentation quantitative du chitobiose. Ceci semble être dû à l'hydrolyse enzymatique des oligomères de DP 3 à 6.

Cette méthode peut être utilisée pour obtenir quantitativement des oligomères de la chitine par CLHP préparative sans passer par la chromatographie liquide sur gel de silice demandant beaucoup de temps et l'utilisation de grande quantité de solvants.

Le composé (II) dérivé du chitobiose fonctionnalisé désacétylé hydrosoluble est greffé au sépharose-4B activé via la carbodiimide, donnant un gel utilisé par la suite en chromatographie d'affinité.



La chromatographie d'affinité sur sépharose greffé est effectuée par introduction au sommet de la colonne du lysozyme à diverses concentrations. L'enzyme n'est pas exclue dans ce cas, ce qui signifie que l'affinité a bien fonctionné.

L'essai à blanc avec un dépôt de 5 mg du lysozyme (Sigma) sur gel de sépharose-4B couplé à l'aniline (Ph-NH₂), qui n'est ni un substrat ni un inhibiteur, permet après lavage au tampon acétate (0,01M) à

pH =4,8 l'exclusion de la protéine non adsorbée. à l'opposé, l'inhibiteur, que nous avons synthétisé pour la première fois et greffé sur le gel activé, adsorbe fortement la protéine enzymatique.

L'élution au tampon acétate (0,01 M) à pH=4,8 ne désorbe pas le lysozyme fixé sur le gel de la chromatographie d'affinité. Par contre, l'élution avec une solution d'urée (4M) permet la désorption de cette protéine avec un rendement de 70%, ce qui montre la forte adsorption.

Cependant, Dennis *et al.* (1974) utilisant un gel (NAG)₂-NH₂- Sépharose et une élution avec une solution de NaCl 0,3M contenant 0,1mM de chitotriose (NAG₃) puis 0,1M AcOH à pH 4,8 obtiennent du lysozyme avec 90% d'activité mais avec un rendement faible.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, on a effectué deux méthodes d'acétolyse de la chitine, une hydrolyse acide suivie d'une hydrolyse enzymatique afin d'obtenir quantitativement le chitobiose. La méthode de Narvi *et al.* (1987) modifiée nous a permis l'obtention de la matière première avec de meilleurs rendements (15%).

On a retenu la deuxième méthode du fait de ses rendements élevés, moins longue et moins coûteuse. On a aussi abordé l'hydrolyse acide de la chitine dont on a obtenu des oligomères de degré de polymérisation élevé. Ces derniers sont utilisés afin d'effectuer des tests d'affinité du lysozyme vis-à-vis de ces oligomères.

L'hydrolyse de la chitine par trois méthodes différentes (hydrolyse enzymatique, hydrolyse acide et acétolyse) nous a permis d'obtenir des substrats par 3 voies différentes et complémentaires.

Une préhydrolyse de la chitine, suivie de l'hydrolyse enzymatique peut être une voie de préparation quantitative par CLHP préparative du chitobiose, du chitotriose et du chitotétraose très purs. L'hydrolyse acide et l'acétolyse permettent une préparation quantitative de β-chitobiose.

L'obtention d'un rendement de 15% en chitobiose, nous a permis d'effectuer la synthèse d'un nouvel inhibiteur sélectif du lysozyme avec un rendement de 89%. Le gel de chromatographie d'affinité est préparé en fixant le p-amino 1-thiochitobiose sur le gel sépharose 4B activé.

L'adsorption du lysozyme sur cette colonne d'affinité est sélective. La désorption de l'enzyme avec un rendement de 70% nécessite l'emploi d'urée 4M. La recherche d'agents non dénaturants est en cours.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Alderton G. & Fevold H.L. (1946) Direct crystallisation of lysomème from egg white and some crystalline salts of lysozyme *J. Biol. Chem.* 164 : 1-5
- Alderton G., Ward W.H. & Fevold H.L. (1945) Isolation of lysozyme from egg white *J. Biol. Chem.* 157 : 43-58
- Bailon P. & Nishikawa A.H. (1977) Affinity purification methodo V. A novel and rapid isolation procedure for lysozymes. *Prep. Biochem.* 7 : 61-68
- Ballardie F.W. Capon B., Culhbert M.N. & Deariz W.M. (1977) Some studies on catalysis by lysozyme *Bioorganic Chemistry* 6. 483-496
- Baousson F.H. (1938) On the bacteriolysis by lysozyme. *J. Immunol.* 34 : 281-293
- Barker S.A., Foster A.B., Stacey M. & Webber J.M. (1958) Isolations and Properties obtained by controlled fragment action of chitin. *J. Chem. Soc.* 2218 - 2227
- Chang C.T., Chan L.H., Sung H.Y. & Kao M.D., (1986 a) Studies on the purification of lysozyme from egg white ultrafiltration. *J. Chinese Agr. Chem. Society* 24: 86-90
- Chang C.T., Jen J.C., Sung H.Y. & Su J.C. (1986 b) Purification by lysozyme from egg white affinity Chromatography. *J. Chinese Agr. Chem. Society* 24 : 272-278
- Chiang B.M., Su J.C., Tsai G.J. & Tsao G.T. (1993) Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *J. Food Sci.* 58: 303-306
- Chaplin M.F. & Kennedy J.F. (1986) Carbohydrate analysis, a practical approach. Oxford OX8 1JJ, England.
- Colobert L. & Dirhermer G. (1962) Le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44(2/3): 141-147
- Coulon H.D. & Walt D.R. (1986) Immobilization of enzymes on polymer Supports *J. Chem.* 63: 368-370
- Delmotte F.M. & Monsigny M.L.P. (1974) Synthèse des p-nitrophenyl-1-thio-β-chitobioside et 1-thio-β-chitotrioside et du p-nitrophényl-β-chitotrioside. *Carbolyd. Res.* 23 : 219-226

- Dennis A., Cornelins D., Brown W.H., Shrале A.F. & Rupley J.A. (1974) Purification of native and synthetic lysozyme with tri-(N-acetyl-glucosamine)-agarose. *Methods in Enzymol* 34: 639-645
- Dunn B.M, Thomas C. & Bruice T. C. (1973) Physical organic models for the lysozyme action . *Adv. in Enzymology* 37: 1-60 John Wiley & Sons, New York
- Durance T.D. & S. Nakai (1988) Simultaneous isolation of aridin and lysozyme from egg albumen. *J. Food Sci.* 53, 1096-2001
- Eshdat & Sharon N. (1977) Affinity lacking lysozyme. *Methods in Enzymol.* 46 : 403-414
- Fernandez-Sousa J.M., Perez-Castells R. & Rodriguez R. (1978) A simple, one-step chromatographic procedure for the purification of lysozyme. *Biochem. Biophys. Acta* 523: 430-434
- Fukamizo T., Minematsu T., Yanase Y., Hayashi K. & Goto S. (1986) Substrate size dependence of lysozyme catalyzed reaction. *Arch. Biochem. Biochem. Biophys.* 250: 312-321
- Imoto T., Haryaski K. & Funatsn (1968) Characterisation of enzyme-substrate complex of lysozyme. *J. Bioch.* 64 : 387-394
- Khorlin A.Y., Shashkova E.A. & Zurabyow (1972) Interaction of lysozyme with isomeric p-amino nitrophenyl, β -1, 4 (N-Ac GLc) 3. *Carbohydr. Res.* 21 : 269
- Li-chan E., Nakar S., Sim J., Bragg D.B. & Lo K.V. (1986) Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. *J. Food Sci.* 51 : 1032-1038
- Lowry O.H., Rosebrongh N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein estimation with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275
- Muzzarelli R.A.A (1977) Chitin. Ed. by Muzzarelli R.A.A. Pergamon. Press. England, pp. 255-260
- Muzzarelli R.A.A., Barotini G. & Rochetti R. (1978) Isolation of lysozyme on chitosan. *Biotechnol Bioeng.* 20: 87-92
- Narvi T. (1987) Hydrolyse of cellulose. *Carbohydr. Res.* 168 : 151- 155
- Osawa T. (1966a) Lysozymes substrates. *Carbohydr. Res.* 1 : 435- 443
- Pollock J. & Sharon N. (1970) The chemical structure of three trisaccharides formed in the lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction. *Carbohydr. Res.* 13 : 211-224
- Protor V. & Cunningham F.E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC critical Review in Food science & Nutrition* 26 : 359-368
- Rafestin M.E., Obrenovitch A., Oblin A. & Monsigny M. (1974) Purification of N. Acetyl-D-glucosamine binding protein by affinity chromatography. *FEB S letters* 40 : 62- 66
- Rupley J.A. & Gates V. (1967) Studies of the enzymatic activity of lysozyme, the hydrolysis and transfer reactions of N-acetylglucosamine oligosaccharide. *Proc. Nat. Sci (U. S)* 57: 496-502
- Sharon N. (1986) Les molécules de la vie. Edition pour la science S. A. R. L. Paris, France
- Sharon N. & Serfer S. (1964) A transglycosylation reaction catalyzed by lysozyme. *J. Biol. Chem.* 239 : 2398-2399
- Smith L. E.H., Mohr L.H. & Raftery M.A. (1973) Mechanism for lysozyme catalyzed hydrolysis. *J. Amer. Chem. Soc.* 95 (22) : 7497-7500
- Spinola M.S. & Jeanloz R.W. (1970) The synthesis of a Di-N-acetylchitobiose and its derivative. *J. Biol. Chem.* 245 : 4158-4162
- Sykes B. D., Boekelheide K., Patt S.L., Weisy G. & Baldo J.M. (1979) Lysozyme catalysis : Kinetics of the hydrolysis of cell wall oligosaccharides. *Can. J. Biochem.* 57 : 785- 88