

## ISOLEMENT DE PROTÉINES LYSANTES DE LA RATE DU LAPIN

par

GEORGES JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Depuis la découverte du lysozyme dans le blanc d'œuf de poule<sup>1</sup>, de nombreuses investigations ont été faites pour rechercher des substances analogues, notamment dans les divers organes des animaux supérieurs<sup>2,3</sup>. On a constaté ainsi que la rate du lapin était l'un des organes particulièrement riche en „lysozyme”. Mais aucune recherche ne semble avoir été faite jusqu'ici sur la nature de ces „lysozymes” des organes. Leur rapprochement avec le lysozyme proprement dit, celui du blanc d'œuf de poule, est basé uniquement d'une part sur les propriétés lysantes des substances, d'autre part sur certains aspects de leur stabilité, relativement forte en milieu acide, particulièrement faible au contraire en milieu alcalin. *A priori*, on peut s'attendre à ce que ces lysozymes d'organes diffèrent du lysozyme d'œuf de poule et par leur structure moléculaire, et par l'étendue du domaine bactérien de leur action lysante et bactéricide. Dans le présent travail, nous indiquons une première série de résultats obtenus lors de recherches sur le „lysozyme” de la rate du lapin: ce „lysozyme” correspond en réalité à deux substances distinctes, que nous pensons avoir isolées chacune à l'état pur; ce sont deux protéines, vraisemblablement de poids moléculaires faibles, dont chacune diffère, par sa constitution, du lysozyme de l'œuf de poule.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Mesure et définition de l'activité lysante*

L'activité lysante des diverses préparations obtenues au cours de la purification des substances lysantes est déterminée par turbidimétrie sur une suspension déterminée de poudre acétonique de corps bactériens de *Micrococcus lysodeikticus*, souche N.C.T.C. 3665, selon la technique de FRAENKEL-CONRAT<sup>4</sup>: 28 mg de cette poudre acétonique sont mis en suspension dans 90 ml de solution de phosphates tampons *M/15* à pH 6.2, additionnés de 10 ml d'une solution de NaCl à 1%, exactement. On obtient ainsi une suspension dont la turbidité correspond au maximum de densité encore lisible dans le rouge au photomètre Meunier. A 5 ml de cette suspension, on ajoute au temps  $t_0$ , 0.5 ml de la solution convenablement diluée, dans laquelle on veut doser le lysozyme. Les mesures sont faites à  $25 \pm 1^\circ$ . Dans un intervalle de temps compris entre 30 secondes et 4 minutes, la diminution de densité est proportionnelle à la concentration de l'enzyme, tant que celle-ci se maintient entre des quantités correspondant à 7 et à 15 µg de lysozyme d'œuf de poule par ml. On fait six à huit lectures dans l'intervalle de temps indiqué. Si l'on désigne par  $t_{40}$  le nombre de secondes pendant lequel la densité de la suspension diminue, dans les conditions de proportionnalité, de 40 unités du photomètre, on définit  $a$  par:  $a = 10^5/t_{40}$ . Les valeurs de  $a$  ont été étalonnées une fois pour toutes en µg de lysozyme cristallisé. Les résultats de ces mesures sont reproductibles à 4% près, à condition que la concentration en ions Cl<sup>-</sup> soit toujours rigoureusement la même. L'unité d'activité  $A$  est l'activité présentée dans ces conditions par une solution de lysozyme cristallisé "Armour" contenant 0.167 µg de N par ml.

La mesure de la concentration en protéines est faite par deux méthodes: au cours des premiers stades de purification, on utilise le dosage colorimétrique par le réactif de Folin Ciocalteu selon le procédé indiqué par SUTHERLAND *et coll.*<sup>5</sup> pour le dosage de l'insuline. Ce procédé donne des résultats tout à fait satisfaisants avec le lysozyme d'œuf de poule, et permet de définir l'unité de protéine P<sub>ph</sub>

comme étant la quantité de protéines fournissant une coloration égale à celle donnée par une solution de lysozyme cristallisé "Armour" contenant 0.167 µg de N par ml. Le rapport  $A/P_{ph}$  permet de suivre la progression des premiers stades de la purification. Par définition,  $A/P_{ph} = 1$  pour le lysozyme cristallisé. Mais le réactif de Folin-Ciocalteu ne peut plus être employé à partir du moment où les protéines lysantes sont débarrassées de la majorité des protéines étrangères: les protéines lysantes de la rate du lapin contrairement au lysozyme de l'œuf de poule, ne donnent en effet qu'une faible coloration avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Au cours des derniers stades de purification (chromatographie différentielle sur colonne), on utilise alors la réaction à la ninhydrine, selon MOORE ET STEIN<sup>6</sup>; il convient de remarquer que le mélange des tampons citrate et phosphate utilisé par ces auteurs doit être ici additionné, par ml, de 0.02 ml de HCl 3 N, pour être ramené à pH 5 avant addition de la ninhydrine; d'autre part, après ébullition et addition d'alcool isopropylique, il se forme un précipité minéral dû à la forte concentration des solutions tampon; on s'en débarrasse avant la lecture au photomètre par une brève centrifugation. Comme précédemment, l'unité de protéine  $P_n$  est définie comme étant la quantité de protéine fournissant une coloration égale à celle donnée par une solution de lysozyme cristallisé "Armour" contenant 0.167 µg de N par ml.

### *Extraction des protéines lysantes*

Les rates de lapins fraîchement tués sont tout d'abord débarrassées de toute graisse adhérente; elles peuvent être alors soit traitées immédiatement, soit conservées dans l'acétone. Dans ce dernier cas, elles sont plongées dans l'acétone contenant 1% d'acide acétique. A —20°, elles s'y conservent plusieurs mois sans perte d'activité; il convient toutefois de changer l'acétone acétique environ toutes les trois semaines.

Toutes les opérations décrites ci-dessous doivent être exécutées à une température de 2 à 4°:

### *Extraction par l'eau et précipitation par l'acétone*

Fraîches ou conservées dans l'acétone, les rates sont broyées au "blender" en présence de leur poids d'eau, ce poids étant calculé pour l'organe frais. Chaque opération porte sur 300 rates, soit environ 345 g d'organe (poids frais). Le broyat obtenu est extrait 4 fois, chaque fois avec 200 ml d'eau; chaque extraction comporte une bonne agitation pendant un quart d'heure et est suivie d'une centrifugation à 0°; après décantation du liquide, le culot de centrifugation est remis en suspension dans 200 ml d'eau froide, et ainsi de suite. On obtient ainsi environ 1 litre d'un liquide rouge, trouble, dont le pH est voisin de 6.5. On abaisse le pH à 4.5 par addition d'acide acétique à 10% (environ 25 ml). Sans se préoccuper du premier précipité qui se forme alors, on plonge le ballon contenant la totalité du liquide, et en agitant convenablement ce dernier, dans un bain-marie bouillant, où on maintient le tout exactement 5 minutes. On refroidit énergiquement immédiatement après, puis on élimine par centrifugation à 0° l'abondant précipité. On ajoute au liquide décanté les eaux de lavage du précipité (2 fois 100 ml). Le liquide jaune clair résultant de cette opération contient 98% de l'activité initiale des organes. On l'abandonne quelques heures à 4°; des matières grasses précipitent, qu'on élimine par filtration rapide sur papier. On obtient ainsi environ 1200 ml d'un liquide jaune limpide  $A/P_{ph} = 0.035$ .

On ajoute à ce liquide 4 fois son volume d'acétone, en agitant soigneusement, et à raison de 1 litre à l'heure; un précipité commence à se former lorsque 1.5 litre a été introduit. Après addition de la totalité de l'acétone, on laisse déposer le tout, on décante le plus possible du liquide surnageant et on recueille le précipité par centrifugation à froid. Ce précipité, brun, est repris par 100 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 0.3%; on clarifie la solution par centrifugation et on a ainsi un liquide brun  $A/P_{ph} = 0.109$ .

Sur ce liquide, on opère une nouvelle précipitation par addition de 4 fois son volume d'acétone, en opérant comme précédemment; le précipité, repris encore par 100 ml d'acide acétique à 0.3%, donne une solution qui, après clarification, se présente comme un liquide brun  $A/P_{ph} = 0.188$ .

Cette solution est soumise à une troisième précipitation par l'acétone, toujours dans les mêmes conditions; le précipité est repris par 50 ml d'acide acétique à 0.3%; sa solution, après centrifugation, fournit un liquide brun limpide  $A/P_{ph} = 0.258$ .

#### *Précipitation en milieu alcalin*

D'autres précipitations par l'acétone dans les mêmes conditions ne donnent plus de substances insolubles dans l'acide acétique dilué, et ne modifient pas la valeur du rapport  $A/P_{ph}$ . On continue donc la purification par une précipitation en milieu alcalin; dans un tel milieu, en effet, on constate une précipitation abondante de substances inactives, mais l'utilisation de ce mode de purification est limité par la labilité des substances actives en milieu alcalin; il convient d'opérer ici avec une prudence particulière:

Le liquide provenant des opérations précédentes est ajusté exactement à pH 8.4 (électrode de verre) par de la soude N. On centrifuge immédiatement, toujours à 0°, et on ramène aussitôt le liquide clair décanté à pH 6.0 par de l'acide acétique à 10%. On évite ainsi toute destruction des substances actives. On obtient ainsi environ 50 ml d'un liquide jaune clair,  $A/P_{ph} = 0.280$ .

#### *Traitemennt par l'acide flavianique*

La suite de la purification met en jeu la formation des flavianates des substances actives; la précipitation par l'acide flavianique doit être faite en milieu relativement dilué et à pH 6.0: on amène le volume du liquide obtenu ci-dessus à 100 ml avec de l'eau; on en contrôle le pH et on ramène ce dernier éventuellement à 6.0. Le liquide étant toujours maintenu à 2°, on lui ajoute en agitant et en répartissant cette addition sur une heure, 50 ml d'eau contenant 250 mg d'acide flavianique\* sous forme de son sel de sodium. Au cours de cette addition, le pH est maintenu à 6.0 par addition ménagée d'acide acétique à 10%. Il se forme un précipité jaune cristallisé, qui se dépose rapidement. On abandonne le tout au froid environ 36 heures, puis on recueille le précipité par centrifugation. L'activité lysante du liquide surnageant ne doit pas dépasser celle de 1 à 2 µg de lysozyme d'œuf de poule par ml. On lave le précipité avec 25 ml d'eau, puis on le recueille à nouveau par centrifugation.

Il est indispensable que le déplacement de l'acide flavianique se fasse à basse température, en utilisant notamment des réactifs préalablement refroidis à 2°. Le précipité, encore humide, est mis en suspension dans 10 ml d'eau; à cette suspension, on ajoute, en 5 minutes et en agitant continuellement, un mélange de 4 ml d'eau de baryte saturée à 2°. A la fin de cette addition, le pH du liquide doit être de 8.8 à 9.0. On introduit aussitôt après 10 ml d'une solution tampon de phosphates M/15 à pH 6.2. Le pH du milieu tombe à environ 7.5 et la plus grande partie de la baryte précipite sous forme de phosphate de baryum. On l'élimine par centrifugation à 0°. On décante le liquide clair et on lave le précipité avec 10 ml d'eau; on centrifuge de nouveau et

\* Provenant de la Maison Hoffmann-La Roche; des préparations d'acide flavianique provenant d'autres maisons ne donnent pas ici de résultats satisfaisants.

on réunit les eaux de lavage au premier liquide. On obtient ainsi environ 40 ml d'une solution jaune clair, de pH 7.5, et dont l'activité correspond à  $A/P_{ph} = 0.88$ .

A cette solution, maintenue à 2°, on ajoute lentement et toujours en agitant, 6 fois son volume d'acétone, soit environ 250 ml. On obtient un précipité jaunâtre floconneux que l'on recueille par centrifugation à —10°. On reprend ce précipité par 5 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 1% et on élimine les parties insolubles par centrifugation. On obtient ainsi 5 ml d'un liquide fortement coloré en jaune, mais parfaitement limpide,  $A/P_{ph} = 0.94$ .

### *Traitemen t par la déacidite*

La coloration jaune de la solution précédente est due à l'acide flavianique qu'elle contient encore; pour éliminer complètement ce dernier, diverses méthodes ont tout d'abord été essayées: lavages à l'alcool ammoniacal selon MAYER *et coll.*<sup>7</sup>; lavages à l'acétone contenant 20% d'eau, précipitations successives par l'acétone et reprises à l'acide acétique; etc. Les résultats de ces essais ont toujours été médiocres: ils se sont manifestés par des pertes en les substances lysantes, par leur inactivation et par une mauvaise élimination de l'acide flavianique.

Au contraire, un excellent procédé d'élimination de l'acide flavianique consiste à traiter le liquide par un échangeur d'anions. On utilise ici la déacidite 300\*, ayant préalablement subi une vingtaine de cycles NaOH 10% — eau distillée — NaCl 10% — eau distillée — NaOH 10% — etc. Le dernier cycle s'arrête avec la soude; on lave ensuite à l'eau distillée jusqu'à neutralité du liquide. L'utilisation de cette déacidite ne donne lieu à aucune inactivation des substances lysantes. Cette utilisation est faite dans les conditions suivantes: 2 g de déacidite, préparée comme il vient d'être dit, sont essorés sur un filtre en verre frité, puis introduits dans les 5 ml de la solution jaune obtenue précédemment; on agite quelques minutes jusqu'à disparition totale de la couleur jaune, puis on laisse décanter. Le liquide doit être alors incolore, mais il contient encore en suspension des traces de substances minérales. On recueille le liquide surnageant et on lave la résine 4 fois, chaque fois avec 5 ml d'eau, recueillis par décantation; après le dernier lavage, le liquide est recueilli après filtration sur verre frité; on réunit les eaux de lavage au premier liquide. Si le pH de la solution ainsi obtenue est supérieur à 8.5, on ajoute quelques gouttes d'acide acétique dilué pour le ramener à 8.0 ou légèrement en dessous. On abandonne le tout 4 à 5 jours à 4°. La majeure partie des substances minérales ainsi que diverses substances organiques inactives précipitent; on élimine toutes les substances insolubles par centrifugation à grande vitesse (16,000 t/m) à 0°. On obtient ainsi environ 25 ml d'un liquide limpide parfaitement incolore  $A/P_{ph} = 1.1$ .

### *Dialyse et lyophilysation*

Ce liquide est dialysé à 2°, en agitant, pendant 10 heures contre l'eau distillée; au cours de cette opération, les pertes en substances actives restent inférieures à 4%. La solution dialysée est lyophilisée: elle fournit un produit pulvérulent, blanc, contenant 16.6% d'azote total (microkjeldahl) et d'activité  $A/P_{ph} = 1.2$ . Ce produit est désigné dans la suite sous le nom de *matériel primaire*.

\* Phillips et Pain, Montrouge (Seine), France.

### *Chromatographie sur colonne*

Ce matériel primaire est soumis à une chromatographie sur colonne selon une technique inspirée de celle que TALLAN ET STEIN<sup>8</sup> ont mise en oeuvre dans le cas du lysozyme\*. La quantité de matériel primaire soumis à la chromatographie étant de environ 4 mg, on utilise une colonne d'Amberlite XE-64 de 20 cm × 1 cm, préalablement lavée avec de la soude N, puis amenée exactement à pH 6.54 par un abondant lavage avec une solution tampon convenable. Celle-ci est une solution de phosphates *M/5* dont le pH de 6.54 doit être rigoureusement contrôlé. Il apparaît en effet que la séparation des différents constituants du matériel primaire est extrêmement sensible à de faibles écarts de pH: au-dessus de pH 6.8, il n'y a plus aucune rétention sur la colonne; entre pH 6.8 et pH 6.6, la séparation des constituants est mauvaise; en dessous de pH 6.4, la récupération des produits fractionnés devient incomplète. Le fractionnement est fait

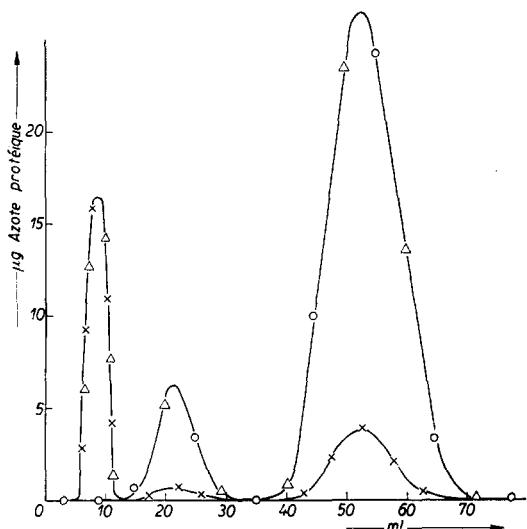


Fig. 1. Azote protéique calculé comme s'il s'agissait du lysozyme d'œuf de poule.

- ×—×— Azote protéique dosé par le réactif de Folin-Ciocalteu
- △—△— Azote protéique dosé par la ninhydrine
- Azote protéique dosé par l'activité lytique

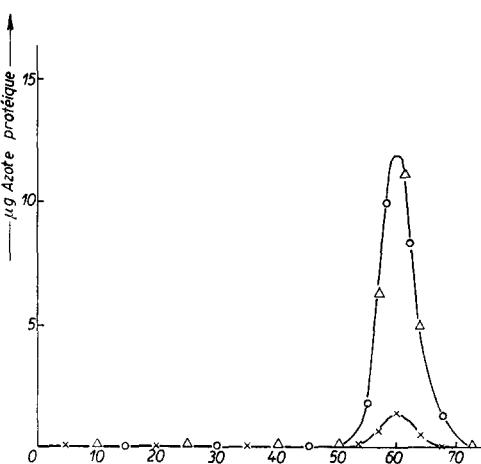


Fig. 2. Azote protéique calculé comme s'il s'agissait du lysozyme d'œuf de poule.

- ×—×— Azote protéique dosé par le réactif de Folin-Ciocalteu
- △—△— Azote protéique dosé par la ninhydrine
- Azote protéique dosé par l'activité lytique

à 22 ± 1°, dans une chambre noire, à raison de 2 ml à l'heure. Chaque fraction est de 1 ml. Sur chacune des fractions, on effectue un dosage spectrophotométrique à la ninhydrine, et on détermine l'activité lysante. Les résultats obtenus sont donnés dans la Fig. 1.

Cette figure montre l'existence:

1. d'une fraction réagissant à la ninhydrine, sans aucune activité lysante, et qui n'est pratiquement pas retenue sur la colonne;

\* Des essais préliminaires ont montré que, aux pH qui avaient donné à TALLAN ET STEIN de bons résultats dans le cas du lysozyme, tout le matériel primaire actuel passe à travers la colonne sans être fractionné.

2. d'une fraction I, active,  $A/P_n = 1.0$ , correspondant à 17% de l'activité totale;
3. d'une fraction II, active,  $A/P_n = 1.0$  et représentant 83% de l'activité totale.

La chromatographie sur Amberlite permet ainsi de séparer deux substances actives différentes, la somme des activités de chacune d'entre elles étant égale à l'activité du matériel primaire avant chromatographie.

Une moitié du liquide correspondant à la fraction II, est chromatographiée à nouveau sur la même colonne, dans les mêmes conditions; le résultat de cette opération est présenté par la Fig. 2, qui montre que la fraction II se comporte comme une fraction homogène.

#### *Cristallisation de la protéine active II*

Une chromatographie analogue a été faite avec 21 mg de matériel primaire et en utilisant une colonne plus grosse ( $15 \times 2$  cm). On prélève la partie centrale de la fraction II, et on la soumet à la dialyse pendant 36 heures à  $2^\circ$  contre de l'eau distillée. Après élimination des sels, le liquide est concentré sous vide, puis la substance est lyophilisée. Après divers prélèvements (mesure d'activité, dosages par le réactif de Folin-Ciocalteu et par la ninhydrine) on obtient 3.5 mg d'une poudre blanche légère; celle-ci, reprise par 0.5 ml d'acide acétique à 0.2%, se dissout immédiatement. A cette solution, maintenue à  $0^\circ$ , on ajoute 0.75 ml d'acétone, quantité juste nécessaire pour provoquer un léger trouble. On abandonne le tout à  $0^\circ$  pendant 36 heures. La substance se présente alors sous forme de cristaux blancs, ayant à l'œil nu l'aspect d'aiguilles grossières. Observées au microscope, ces aiguilles se révèlent être formées par l'accrolement de nombreux rhomboèdres (Fig. 3).

Ces cristaux fondent dès qu'on amène la préparation à la température ordinaire, quelle que soit la quantité d'acétone présente; l'échauffement dû à la concentration de la lumière sous le microscope suffit pour en arrondir en quelques instants les angles: on obtient alors des magmas informes qui recristallisent fort bien cependant, après quelques heures de séjour au froid. Ces cristaux sont recueillis par centrifugation à froid puis séchés sous vide en présence de  $P_2O_5$  (2.5 mg).

Fig. 3. Cristaux observés ( $\times 75$ )

Leur teneur en azote total (micro-kjeldahl) est de 16.2% (N % trouvé: 16.18 et 16.24).

L'étude chimique des fractions I et II fera l'objet d'un prochain mémoire; mais dès maintenant, leur réaction avec la ninhydrine, leur non-précipitation en milieu acétique à chaud, et le fait qu'elles ne dialysent que difficilement à travers une membrane de cellophane, indiquent qu'il s'agit soit de gros peptides, soit de protéines à faibles poids moléculaires, comparables à ce point de vue au lysozyme de l'œuf de poule. Toutefois, la faiblesse de réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu, leur comportement au cours de la chromatographie sur Amberlite et leur extraordinaire labilité en milieu alcalin, montrent que la composition et la structure de ces deux protéines diffèrent profondément de celles du lysozyme de l'œuf de poule.

Nous sommes heureux de remercier ici les Etablissements Organon, Oss, Pays-Bas, de l'aide matérielle qu'ils ont apportée à ce travail.

## RÉSUMÉ

Les substances auxquelles est due l'action lysante, vis à vis de *M. lysodeikticus* et de quelques autres bactéries, de la rate du lapin, ont été extraites de cet organe par épuisement à l'eau, précipitations successives par l'acétone, par la soude, puis par l'acide flavianique, et ont été enfin séparées par chromatographie sur Amberlite X-E 64. Deux substances actives, apparemment homogènes, ont été obtenues; ces substances réagissent avec la ninhydrine, et seulement faiblement avec le réactif de Folin-Ciocalteu (faible quantité de tryptophane, de tyrosine et de cystéine). Ce sont ou bien de gros peptides, ou des protéines de faibles poids moléculaires. De toute façon, ces substances diffèrent certainement du lysozyme de l'oeuf de poule par leur composition et leur structure.

## SUMMARY

Substances, to which is due the lysing reaction of the spleen of the rabbit towards *M. lysodeikticus* and other bacteria, have been obtained from this organ by exhaustive extraction with water and precipitating successively by acetone, alkali and flavianic acid, and have finally been separated by chromatography on Amberlite X-E 64. Two active, apparently homogeneous, substances have been obtained; they react with ninhydrin and only feebly with the Folin-Ciocalteu reagent (small quantity of tryptophan, tyrosine and cysteine). They are either large peptides or proteins of small molecular weight. In any case, these substances differ definitely from the lysozyme of hen's egg in composition and structure.

## ZUSAMMENFASSUNG

Substanzen aus der Milz des Kaninchens, denen eine lytische Wirkung gegenüber *M. lysodeikticus* und einigen anderen Bakterien zuzuschreiben ist, wurden aus diesem Organ durch Ausziehen mit Wasser extrahiert, nach einander mit Aceton, Lauge und dann mit Flaviansäure ausgefällt und schliesslich durch Chromatographie auf Amberlite X-E 64 getrennt. Es wurden 2 aktive, wahrscheinlich homogene Substanzen erhalten. Sie reagieren mit Ninhydrin und nur schwach mit dem Reagenz von Folin-Ciocalteu (geringe Menge Tryptophan, Tyrosin und Cystein). Sie sind sehr grosse Peptide oder aber Proteine mit geringem Molekulargewicht. Diese Substanzen unterscheiden sich sicher in der Zusammensetzung und der Struktur von dem Lysozym aus dem Hühnerei.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. FLEMING, *Proc. Roy. Soc. London, B*, 93 (1922) 306.
- <sup>2</sup> H. W. FLOREY, *British J. Exp. Path.*, 11 (1930) 251.
- <sup>3</sup> A. FLEMING, *Proc. Roy. Soc. Med.*, 26 (1932) 71.
- <sup>4</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 109.
- <sup>5</sup> E. W. SUTHERLAND, C. F. CORI, R. HAYNES ET N. S. OLSEN, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 825.
- <sup>6</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- <sup>7</sup> K. MEYER, R. THOMPSON, J. W. PALMER ET D. KHORAZO, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 303.
- <sup>8</sup> H. H. TALLAN ET W. H. STEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2976.

Reçu le 16 décembre 1952