

## PRÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIES SPÉCIFIQUES DES LYSOZYMES DE LA RATE ET DU REIN DE CHIEN\*

par

PIERRE JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

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

Continuant nos recherches sur la comparaison des lysozymes de différentes origines<sup>2</sup>, nous avons préparé à l'état chromatographiquement pur un lysozyme de la rate de chien et deux lysozymes du rein de chien. Ces enzymes ont été obtenus par des méthodes voisines de celle qui a été utilisée précédemment dans le cas des lysozymes de la rate du lapin: Tout d'abord, préparation d'un matériel primaire, puis extraction des lysozymes à partir de ce dernier par chromatographies sur Amberlite XE-64 dans des conditions particulières à chacun des lysozymes.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Comme il a été indiqué précédemment<sup>3</sup>, l'activité lysante est mesurée vis à vis de suspensions d'une poudre acétonique de *Micrococcus lysodeikticus*; cette activité (A) est rapportée à la quantité de lysozyme d'oeuf (à 18.6 % de N) correspondante. La concentration en protéine ( $P_{ph}$ ) est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu parfaitement utilisable ici, du fait que les lysozymes en question contiennent des quantités notables de résidus d'acides aminés, notamment de tryptophane, réagissant au réactif en question. La valeur  $P_{ph}$  est rapportée elle aussi à la quantité de lysozyme d'oeuf correspondante. On suit la purification des lysozymes par l'accroissement, au cours des opérations, du rapport A/ $P_{ph}$ .

#### *Lysozymes de la rate de chien*

*Préparation du matériel primaire.* La rate du chien a un poids très variable suivant la race de l'animal, et contient de 70 à 250 µg de lysozyme par g d'organe frais. Dès leur prélèvement, les rates sont plongées à -20°, dans de l'acétone contenant 0.75% d'acide acétique, température et milieu où elles sont conservées jusqu'à leur utilisation. Par exemple, 15 rates pesant ensemble 740 g (poids des organes frais) sont broyées en présence d'eau distillée. Après une centrifugation effectuée à 2°, le culot est lavé 5 fois, chaque fois avec 200 à 250 ml d'eau; on réunit les liquides d'extraction\*\*. La protéine active est adsorbée sur 200 ml d'Amberlite XE-64\*\*\* en agitant pendant 4

\* Le présent travail a fait l'objet d'une communication au IIIème Congrès international de Biochimie, Bruxelles, 1955<sup>1</sup>.

\*\* Un chauffage de ce liquide de quelques minutes à 100° en milieu acétique en vue d'une déprotéinisation, comme cela a été fait dans le cas de la rate de lapin<sup>3</sup> est ici inutile, car il ne donnerait lieu à aucune précipitation.

\*\*\* Des expériences encore inédites nous ont montré que des échantillons différents d'une même résine manifestent dans certains cas des propriétés adsorbantes différentes. Aussi n'est-il pas inutile de signaler que pour l'opération en question tous les échantillons d'Amberlite XE-64 semblent convenir.

heures le liquide obtenu; la résine a été préalablement tamponnée à pH 6.55 par une solution tampon de phosphates 0.2 M. L'élution du produit actif est faite par 7 à 8 lavages successifs de la résine à l'aide d'une solution tampon de phosphates 0.8 M à pH 6.55. On recueille 90 à 95 % de l'activité initiale.

On dialyse 18 heures à 2°; au cours de cette opération la perte de substance active atteint 20 à 40%, ce qui est sensiblement plus important que dans le cas du lysozyme de rate du lapin. Après lyophilisation on obtient une poudre plus ou moins brunâtre constituant le "matériel primaire" ( $A/P_{ph} = 0.07$  à 0.13).

*Séparation de la substance active par chromatographie sur colonne d'Amberlite.* On met en jeu une quantité de matériel primaire contenant 650 µg de substance active, que l'on fait passer, en solution tampon de phosphates, sur une colonne (11.5 × 1.2 cm) d'Amberlite XE-64, échantillon 67 A (175–250 mesh). Pour une molarité de la solution de phosphates de 0.2 M, à pH 6.45 la protéine active reste fixée sur la colonne de façon définitive tant que l'on ne modifie pas la molarité (Fig. 1); à pH 6.55 et toujours avec une molarité de 0.2 M, la protéine active n'est au contraire pas retenue et passe simplement à travers la colonne (Fig. 2), alors qu'à pH 6.50 on obtient une excellente séparation du lysozyme de la rate du chien (Fig. 3). Dans tous les

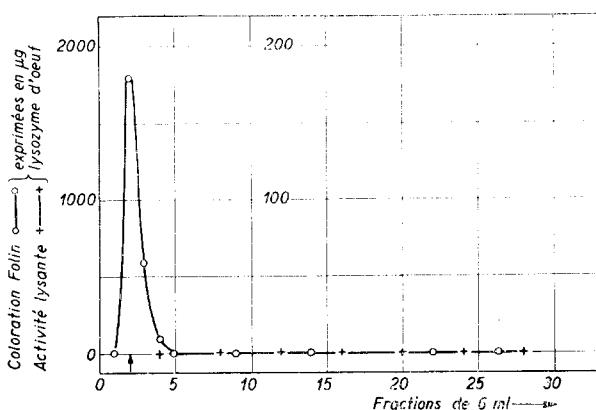


Fig. 1. Lysozyme de Rate de Chien. 650 µg sur colonne 11.5 × 1.2 cm; Amberlite XE-64 lot 67-A; phosphates 0.2 M; pH 6.45 ± 0.02.

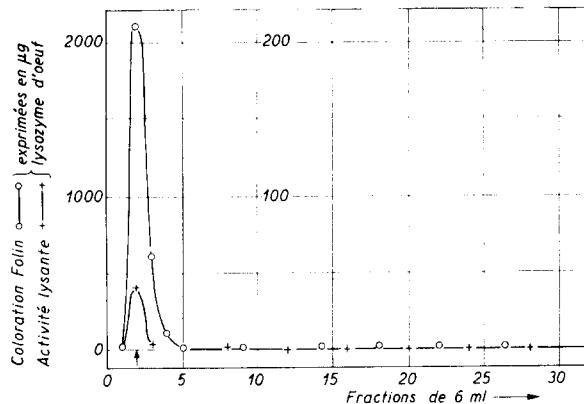


Fig. 2. Lysozyme de Rate de Chien. 650 µg sur colonne 11.5 × 1.2 cm; Amberlite XE-64 Lot 67-A; phosphates 0.2 M; pH 6.55 ± 0.02.

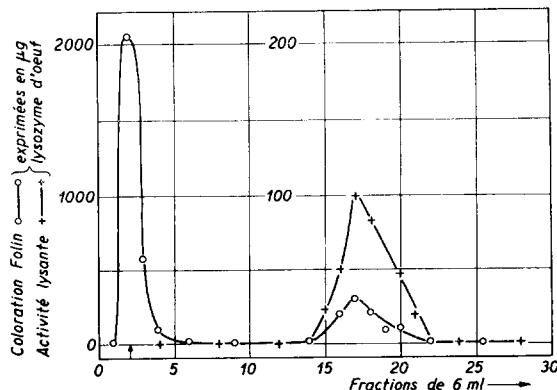
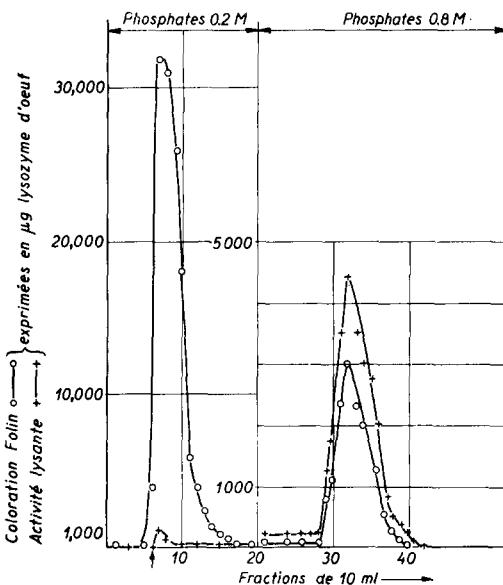


Fig. 3. Lysozyme de Rate de Chien. 650 µg sur colonne 11.5 × 1.2 cm; Amberlite XE-64 lot 67-A; phosphates 0.2 M; pH 6.50 ± 0.02.

cas, une certaine quantité d'impuretés protéiques inactives passe dès le début, sans être retenue par la colonne, comme le montrent les Figs. 1 à 3, où la flèche indique les volumes morts. Lorsqu'il y a séparation de la protéine active, à pH 6.50 pour l'échantillon d'Amberlite en question, l'activité lysozymique ne se retrouve très généralement que dans un pic\*. Les fractions constituant ce pic sont réunies, dialysées et lyophilisées; le résidu se présente sous forme d'une poudre blanche ( $A/P_{ph} = 1.5$ ) qui, séchée sous vide en présence de  $P_2O_5$  et à 56° présente une teneur en azote de 17.8%.

*Préparation du lysozyme de rate de chien.* Lors de sa chromatographie dans les conditions qui viennent d'être décrites, le lysozyme se répartit dans un ensemble de fractions correspondant à une quarantaine de ml. Si l'on voulait utiliser ce genre d'opération pour l'obtention de quantités de substance active atteignant 100 mg, on devrait mettre en oeuvre des colonnes plus importantes ( $15 \times 4$  cm), et le lysozyme se trouverait contenu dans un ensemble de fractions correspondant à 600 à 700 ml. Pour éviter cet inconvénient, on opère de la façon suivante: Le matériel primaire, dissous dans une solution tampon de phosphates 0.20 M à pH 6.50, est placé sur la colonne de résine préalablement tamponnée avec la même solution tampon. 2 à 10% du produit actif sont entraînés dès le début avec les impuretés protéiques inactives. Dès que celles-ci ont été éliminées, on remplace la solution tampon de phosphates 0.20 M par une solution 0.80 M, toujours à pH 6.50; on obtient ainsi rapidement la totalité de l'activité récupérable qui représente ici 70 à 85% de l'activité totale mise en jeu dans l'opération (Fig. 4).

Fig. 4. Préparation de 35 mg de Lysozyme de Rate de Chien sur colonne  $10 \times 4$  cm; Amberlite XE-64 lot 67-A, pH 6.50  $\pm$  0.03.



#### *Lysozyme du rein de chien*

*Préparation du matériel primaire.* Le rein du chien contient de 15 à 25 µg de lysozyme par g d'organe frais. Les reins sont traités ici exactement comme les rates; par exemple, on utilise pour une opération 8 reins pesant ensemble 300 g; on obtient ainsi le "matériel primaire" de lysozyme de rein de chien sous forme d'une poudre plus ou moins jaunâtre.

*Séparation de la substance active par chromatographie sur colonne d'Amberlite.* Lors de sa chromatographie sur colonne d'Amberlite XE-64, échantillon 67 A, la fraction

\* Il convient toutefois de remarquer que dans 2 opérations, sur un total de 22, ayant fait suivre la solution tampon 0.2 M d'une solution tampon 0.8 M de même pH, nous avons fait sortir une seconde fraction active représentant environ 10% de l'activité mise initialement sur la colonne.

active du rein de chien montre un comportement sensiblement différent de celui de la rate. On utilise ici des colonnes de  $15 \times 1.2$  cm et une quantité de matériel primaire

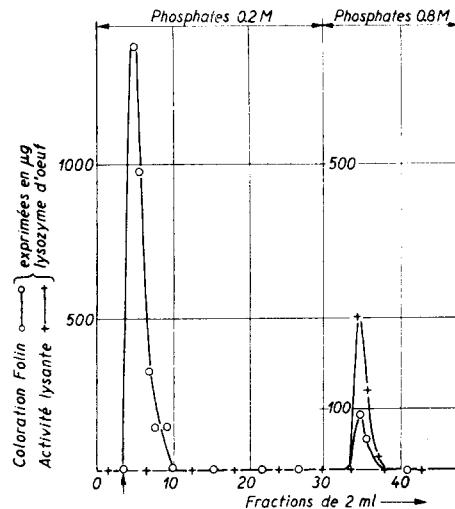


Fig. 5. Lysozyme de Rein de Chien. 500 µg sur colonne  $15 \times 1.2$  cm; Amberlite XE-64 lot 67-A; pH  $6.23 \pm 0.02$ .

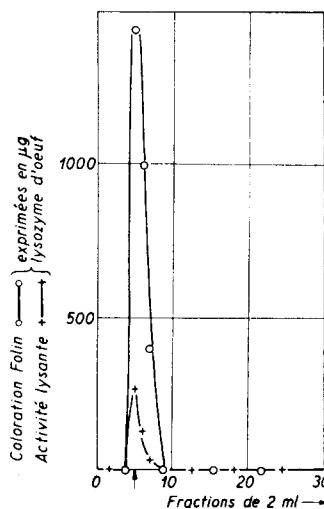


Fig. 6. Lysozyme de Rein de Chien. 500 µg sur colonne  $15 \times 1.2$  cm; Amberlite XE-64 lot 67-A; phosphates 0.2 M; pH  $6.35 \pm 0.03$ .

correspondant à 500 µg de substance active. En solution tampon de phosphates 0.2 M à pH 6.23 la fraction active reste fixée sur la colonne (Fig. 5). A pH 6.35 la totalité de l'activité récupérable, qui représente ici environ 70% de l'activité totale mise en jeu dans l'opération, sort sans être retenue (Fig. 6). L'expérience montre qu'il est impossible de trouver un pH intermédiaire auquel on puisse séparer convenablement à la molarité de 0.2 M une fraction active. Aussi, pour obtenir une séparation convenable

doit-on modifier cette molarité en cours d'opération; il ne s'agit plus alors d'une chromatographie proprement dite, mais d'une séparation. La Fig. 5 montre qu'en faisant suivre la solution de phosphates 0.2 M par une solution de phosphates 0.8 M toujours à pH 6.23, on fait sortir de la colonne la totalité de la fraction active récupérable. Il est possible d'exécuter l'opération de façon plus précise et de montrer que la fraction active ainsi obtenue correspond en fait à deux lysozymes distincts, comme dans le cas de la rate de lapin, lysozymes que l'on peut séparer. En effet, en exécutant une chromatographie à pH 6.30, en solution tampon de phosphates 0.2 M (Fig. 7) on recueille une partie notable de l'activité (pic I) qui sort, dès le début,

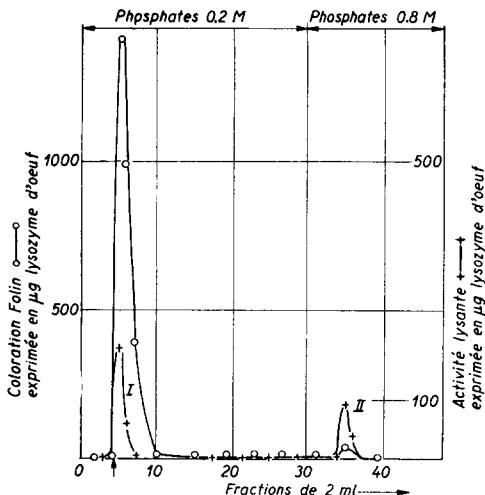


Fig. 7. Lysozyme de Rein de Chien. 500 µg sur colonne  $15 \times 1.2$  cm; Amberlite XE-64 lot 67-A; pH  $6.30 \pm 0.02$ .

sans être retenue, avec les impuretés protéiques; en remplaçant ensuite la solution de phosphates 0.2 M par une solution de phosphates 0.8 M, toujours à pH 6.30, on récupère une fraction importante, et différente de la première, d'activité lysante (pic II). Pour obtenir à l'état pur la protéine active du pic I, confondue jusqu'ici avec l'ensemble des impuretés protéiques non retenues, on dialyse le liquide des fractions correspondant au pic I, on lyophilise, puis, après remise en solution dans une solution tampon de phosphates 0.2 M à pH 6.23, on fait passer sur une colonne. On élimine ainsi les impuretés protéiques non retenues. En utilisant maintenant une solution de phosphates 0.8 M, on récupère la protéine active, et cette fois homogène, correspondant au pic I.

#### DISCUSSION

Comme le montrent leurs comportements chromatographiques sur un même échantillon d'Amberlite XE-64, le lysozyme de la rate du chien et les lysozymes du rein de chien ne sont pas identiques. On peut admettre, à priori, que les différences que ces lysozymes manifestent concernent les charges des résidus des acides aminés, ce qui peut correspondre soit à des différences réelles de composition en résidus d'acides aminés, soit, la composition étant la même, à des différences dans le nombre ou la disposition de groupes amides fixés sur les résidus aspartyl et glutamyl. Nous basant sur les résultats d'une première série d'analyses, nous indiquerons brièvement que les lysozymes de la rate du chien et le lysozyme I du rein de chien diffèrent certainement par leurs compositions en résidus d'acides aminés; nous ignorons encore la nature des différences entre les lysozymes I et II du rein de chien.

Il n'est pas sans intérêt de signaler ici que les lysozymes de la rate et du rein de chien, comme le lysozyme d'oeuf, non seulement lysent et inhibent la croissance de *M. lysodeikticus*, mais agissent également sur *Bacillus megatherium* et *Sarcina flava*, alors qu'ils sont sans action sur *Proteus vulgaris*, *Aerobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

#### REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier Mlle MONIQUE LEDIEU dont la collaboration technique a été précieuse, Dr. DRIEUX, École Vétérinaire d'Alfort et Professeur BARGETON, Faculté de Médecine de Paris, qui nous ont aimablement procuré les organes de chien.

#### RÉSUMÉ

Les substances auxquelles est due l'action lysante, vis à vis de *M. lysodeikticus* et de quelques autres bactéries, de la rate de chien et du rein de chien, ont été extraites de ces organes et purifiées par chromatographie sur Amberlite XE-64. Leurs comportements chromatographiques montrent que, tout en présentant une analogie indiscutable, ces nouveaux lysozymes diffèrent nettement les uns des autres.

#### SUMMARY

Substances responsible for the lysing action of the spleen and kidney of the dog towards *M. lysodeikticus* and some other bacteria have been extracted from these organs and purified by ion-exchange chromatography on Amberlite XE-64. The behaviour of these lysozymes indicates that although they show definite differences, they belong to the same class of substances.

*Bibliographie p. 96.*

## ZUSAMMENFASSUNG

Substanzen aus der Milz und der Niere des Hundes, denen eine lytische Wirkung gegenüber *M. lysodeikticus* und einigen anderen Bakterien zuzuschreiben ist, wurden aus diesen Organen extrahiert und durch Chromatographie auf Amberlite XE-64 getrennt. Das Verhalten dieser Lysozyme zeigt, dass sie zu derselben Substanzengruppe gehören, jedoch gegenseitig bestimmte Differenzen aufweisen.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. JOLLÈS, *Congr. intern. biochim.*, Résumés communs., 3<sup>e</sup> Congr., Bruxelles 1955, p. 8.  
<sup>2</sup> G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 219.  
<sup>3</sup> G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 95.

Reçu le 22 juin 1955