

## NOUVELLE MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE DE PRÉPARATION DES LYSOZYMES\*

PIERRE JOLLÈS, HALINA ZOWALL,  
JUAN JAUREGUI-ADELL ET JACQUELINE JOLLÈS  
*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,  
Paris (France)*

(Reçu le 24 novembre 1961)

Les lysozymes d'origines diverses obtenus à l'état chromatographiquement pur ont, jusqu'à présent, été préparés par chromatographie sur Amberlite CG-50<sup>1</sup>. Ce genre de chromatographie est extrêmement sensible au pH, à la présence de sels et nécessite une purification importante du matériel de départ. Aussi la chromatographie utilisant des celluloses a paru plus adaptée à la purification de quantités importantes d'enzymes lysants; comme ces derniers sont des substances basiques, nous avons fait appel à la carboxyméthylcellulose (CM-cellulose), et nous allons décrire ici notre procédé de purification. Notons que précédemment RHODES *et al.*<sup>2</sup> et MANDELES<sup>3</sup> avaient séparé les protéines du blanc d'oeuf, et parmi elles le lysozyme de blanc d'oeuf, respectivement sur CM-cellulose et diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose); mais leurs procédés n'étaient pas centrés sur la préparation des lysozymes et ne conviennent pas, comme nous le verrons dans la discussion, à l'obtention d'un enzyme chromatographiquement pur et ayant, en même temps, conservé toute son activité lysante.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *CM-cellulose*

La CM-cellulose provient de la Brown Company, Berlin, N. H., U.S.A. Elle a été lavée successivement avec NaOH 0.1 *N*, de l'eau et HCl 0.1 *N*, puis tamponnée à pH 5.5 avec une solution tampon de phosphates 0.01 *M*.

#### *Préparation d'un extrait riche en lysozyme*

Un organe ou un tissu riche en lysozyme (par exemple: rate, rein, etc.) dégraissé et coupé en petits morceaux est broyé en présence d'un poids double d'eau, à pH 4.5; après centrifugation, le culot est broyé à nouveau en présence d'eau. Le lysozyme se retrouve dans l'extrait aqueux. Des quantités mêmes importantes (de l'ordre de 1-2 l) de tels extraits ou encore des liquides ou sécrétions contenant un lysozyme et convenablement dilués (ex: lait humain, larmes etc.) sont agités soit à 4°, soit à la température normale, pendant 4-5 h avec 50-100 ml de résine Amberlite CG-50 tamponnée à pH 6.5 avec une solution tampon de phosphates 0.2 *M*. Le lysozyme est adsorbé sur la résine qui est lavée plusieurs fois avec un volume égal d'eau puis de

\* Ce travail a bénéficié d'une subvention (FG-Fr-106) accordée par le United States Department of Agriculture (U.S. Public Law No. 480, 83rd Congress).

solution tampon phosphates 0.2 *M*, pH 6.5. Le lysozyme accompagné d'un grand nombre d'autres substances (protéines, etc.) est élué avec une solution tampon de phosphates 0.6 *M* ou 0.8 *M*, pH 6.5. Cet éluat est dialysé 24 ou 48 h contre de l'eau distillée, à + 2°, puis lyophilisé. On obtient ainsi un extrait enrichi en lysozyme propre à être soumis à la chromatographie sur CM-cellulose.

#### *Préparation de la colonne de CM-cellulose*

Les colonnes les plus fréquemment utilisées ont une hauteur de 40–50 cm et un diamètre de 1.2–1.5 cm et contiennent la CM-cellulose tamponnée à pH 5.5 par une solution tampon de phosphate 0.01 *M*. 500–1000 mg de matériel enrichi en lysozyme (contenant suivant l'origine de 3–10 mg d'un lysozyme/g d'extrait) dissous dans environ 5 ml d'eau sont chargés sur la colonne à un pH compris entre 4.5 et 5.5. Il est bon de vérifier que la dialyse a éliminé la majeure partie des sels contenus dans le matériel à purifier.

#### *Purification d'un lysozyme par chromatographie sur CM-cellulose*

La colonne de CM-cellulose est placée sur un collecteur de fractions et on recueille des portions de 10 ml. La colonne est d'abord éluée avec une solution tampon de phosphates 0.01 *M* à pH 5.5; la vitesse d'écoulement doit ici être lente (20–30 ml/h). La majeure partie des protéines accompagnant le lysozyme sont éliminées et il faut éviter un entraînement du lysozyme.

Dans un deuxième stade, on établit un gradient de pH et de molarité. A une chambre de mélange contenant 250 ou 500 ml de la solution tampon de phosphates 0.01 *M*, pH 5.5, on ajoute une solution tampon de phosphates 0.1 *M*, pH 7.5 (ou bien 0.2 *M*, pH 7.5). La vitesse d'écoulement peut être ici de l'ordre de 60 ml/h. Le lysozyme est habituellement élué après passage de 1 l de la solution tampon.

#### *Obtention du lysozyme à l'état dessalifié par passage sur Sephadex*

Les fractions contenant le lysozyme sont réunies, dialysées 24 h contre de l'eau distillée à 2° puis lyophilisées. Comme il reste après ce traitement des quantités de sels relativement importantes par rapport à la quantité de lysozyme, la dessalification est achevée en soumettant le produit obtenu à une filtration sur Sephadex G-50. 100 mg pouvant contenir 10 % d'un lysozyme et 90 % de sels sont dissous dans environ 5 ml d'une solution tampon pyridine 0.3 *M*–acide acétique 0.1 *M*, pH 5.5, et chargés sur une colonne de Sephadex G-50 de 50 × 1.2 cm équilibrée avec la même solution tampon. On recueille des fractions de 2 ml. Les phosphates et le lysozyme sont élués séparément. Il suffit d'évaporer la solution tampon volatile pour obtenir un lysozyme sans sel.

#### *Dosage des protéines totales et du lysozyme*

Les protéines totales sont déterminées soit par spectrométrie ultraviolette à 280 m $\mu$  avec un spectrophotomètre Beckman modèle DU, soit par la méthode de FOLIN-CIOCALTEU, selon le procédé indiqué par SUTHERLAND *et al.*<sup>4</sup>.

Le lysozyme est déterminé grâce à son pouvoir de lyser des suspensions de *Micrococcus lysodeikticus*. Toutes les mesures ont été rapportées au lysozyme de blanc d'oeuf de poule. Le dosage a été décrit précédemment par JOLLÈS<sup>5,6</sup>.

## RÉSULTATS

*Chromatographie du lysozyme de blanc d'oeuf de poule*

Après la mise en route du gradient, le lysozyme de blanc d'oeuf de poule est élué après passage de 1.5 l de solution tampon sur la colonne (addition d'une solution tampon de phosphates 0.1 M, pH 7.5 dans la chambre de mélange). Le pic correspondant à 3 mg de lysozyme de blanc d'oeuf de poule est indiqué en pointillé dans la Fig. 1.

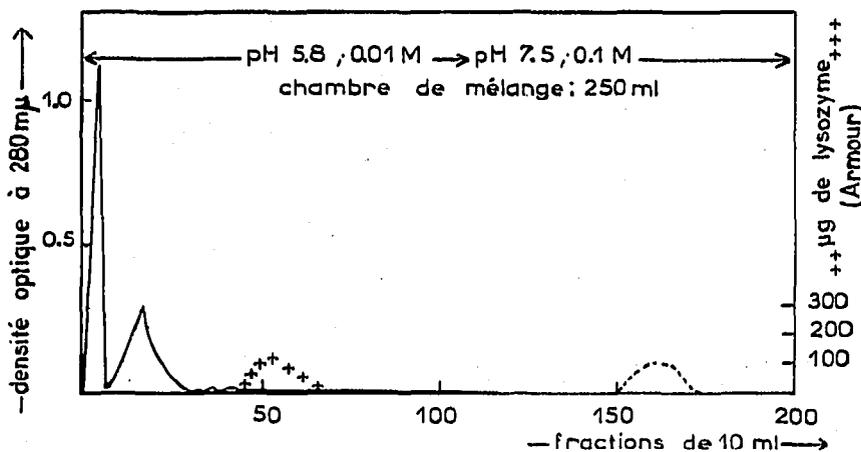


Fig. 1. Purification du lysozyme de rate de chien. — densité optique à 280 m $\mu$ ; + + + activité lysante; - - - lysozyme de blanc d'oeuf de poule (témoin).

*Obtention du lysozyme de rate de chien à l'état chromatographiquement pur*

Après la mise en route du gradient, le lysozyme de rate de chien est élué après passage de 500 ml de solution tampon sur la colonne (addition d'une solution tampon de phosphate 0.1 M, pH 7.5 dans la chambre de mélange) (Fig. 1).

Le lysozyme de rate de chien avait été obtenu précédemment à l'état chromatographiquement pur grâce à une chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50<sup>7</sup>.

L'enzyme obtenu par le nouveau procédé est en tout point comparable à celui purifié sur Amberlite:

(a) l'activité spécifique est constante à l'intérieur du pic représentant le lysozyme de rate de chien,

(b) la composition quantitative en acides aminés du lysozyme de rate purifié sur CM-cellulose, déterminée par la méthode de MOORE, SPACKMAN ET STEIN<sup>8</sup>, correspond à celle indiquée précédemment<sup>9</sup>.

*Obtention du lysozyme de lait humain à l'état chromatographiquement pur*

Après la mise en route du gradient, le lysozyme de lait humain, contrairement aux précédents lysozymes, ne peut pas être élué en ajoutant une solution tampon de phosphates 0.1 M, pH 7.5 à la chambre de mélange. Par contre il est élué après addition d'environ 1 l d'une solution tampon de phosphates 0.2 M, pH 7.5. La quantité de sels restant après dialyse est cette fois plus importante que dans les cas précédents: la dessalification a donc été achevée sur Sephadex G-50 (Fig. 2).

Le lysozyme de lait humain obtenu par chromatographie sur CM-cellulose est chromatographiquement pur; en effet l'activité spécifique est constante à l'intérieur

du pic représentant le lysozyme; mais de plus il a été possible de le soumettre quantitativement à une chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50: il s'agit d'une chromatographie au cours de laquelle, le pH et la  $M$  de la solution tampon ainsi que la température restent constants (Fig. 3).

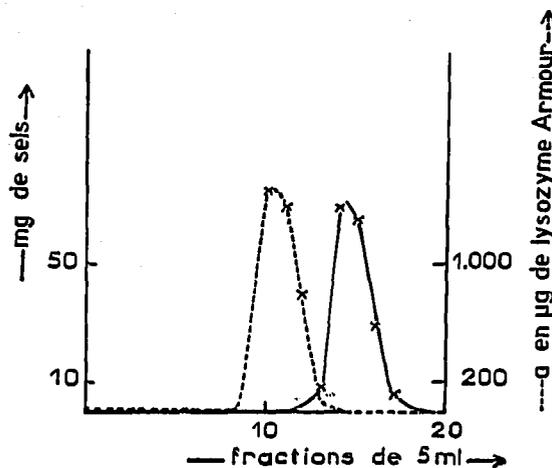


Fig. 2. Lysozyme de lait de femme. Dessalification sur Sephadex G-50 ( $50 \times 1.2$  cm). Tampon pyridine  $0.3 M$ -acide acétique  $0.1 M$ ; pH 5.5.

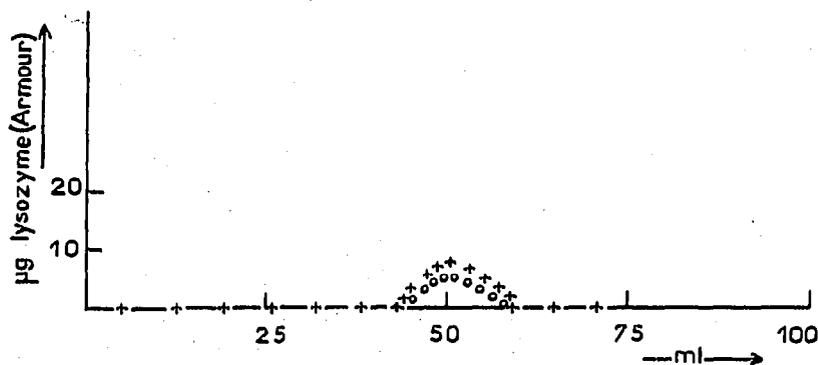


Fig. 3. Chromatographie du lysozyme de lait de femme ( $0.1$  mg) sur Amberlite CG-50 (colonne de  $15 \times 1.2$  cm); pH 7.0,  $0.2 M$ .  $\circ \circ \circ$  coloration Folin;  $+++$  activité lysante.

#### DISCUSSION

La méthode de MANDELES<sup>3</sup> qui fait appel à la chromatographie sur DEAE-cellulose n'a pas pu être utilisée pour préparer les lysozymes contenus soit dans des extraits d'organes (rate, rein, placenta, etc.) soit dans des sécrétions (lait). En effet le lysozyme est élué très rapidement et se trouve souillé de quantités importantes de protéines "inactives", c'est à dire ne lysant pas des suspensions de *M. lysodeikticus*.

La méthode décrite par RHODES *et al.*<sup>2</sup> fait appel, pour l'éluion du lysozyme, à une solution tampon d'un pH voisin de 10 et contenant du carbonate de sodium. Or les lysozymes sont extrêmement labiles en milieu alcalin: ils perdent très rapidement, même à température normale, leur propriété de lyser des suspensions de *M. lysodeikticus* et souvent on constate une légère précipitation. Grâce à la méthode exposée dans le présent travail, on ne dépasse jamais pH 7.5 et on conserve aux différents lysozymes toute leur activité. Un essai de préparation du lysozyme de

rate humaine par la méthode de RHODES nous a permis de récupérer seulement 10-15 % du produit actif mis sur la colonne (Fig. 4). La purification totale de cet enzyme lysant n'a pu être achevée jusqu'à présent; en travaillant avec le lysozyme de rate de chien, 20-25 % du produit actif ont pu être récupérés par la méthode de RHODES, et environ 60 % par la présente méthode.

La pureté des lysozymes ainsi préparés a pu être vérifiée soit en les soumettant, pour contrôle, à une chromatographie d'équilibre soit en déterminant leur compo-

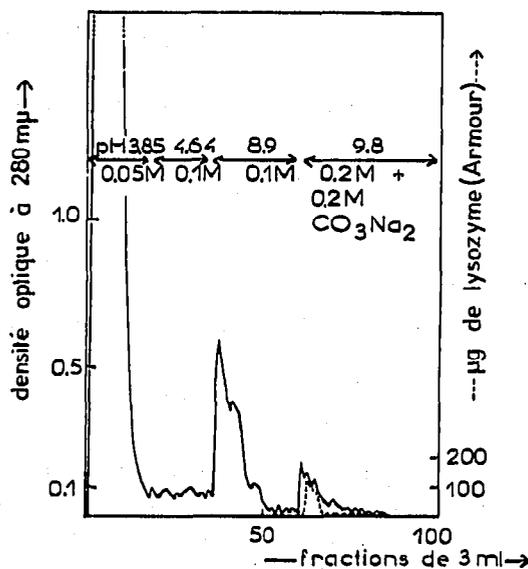


Fig. 4. Essai de purification du lysozyme de rate humaine. — densité optique à 280 m $\mu$ ; --- activité lysante.

sition en acides aminés lorsque celle-ci est déjà connue. Parfois, cependant, une re-chromatographie sur CM-cellulose dans les mêmes conditions s'est avérée nécessaire; ce cas se présente surtout lorsque les extraits contenant les lysozymes sont particulièrement riches en protéines "inactives".

Par passage sur CM-cellulose, on peut purifier au cours d'une opération 5-10 fois plus de lysozyme qu'en utilisant des colonnes d'Amberlite CG-50 de même grandeur. La chromatographie sur Amberlite est d'autre part très sensible au pH; pour réaliser une chromatographie d'équilibre, chaque lysozyme a un pH bien déterminé (à  $\pm 0.05$  unité de pH près): plus un lysozyme est basique et plus ce pH est élevé<sup>1</sup>. On retrouve un comportement analogue en utilisant la CM-cellulose: le lysozyme de lait humain qui est plus basique que celui extrait de la rate de chien ne peut être élué qu'avec une solution tampon de phosphates 0.2 M (et non pas 0.1 M).

En plus des exemples cités plus haut, la présente méthode est actuellement utilisée pour la purification de quelques nouveaux lysozymes (du placenta humain, etc.).

#### REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier Mademoiselle A. BROCHET et Madame J. CALMETTES-POTIER de leur efficace et précieuse collaboration technique.

## RÉSUMÉ

1. Une méthode de purification et de préparation de lysozymes de diverses origines par chromatographie sur carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est décrite; les conditions utilisées, et notamment celles concernant le pH, permettent de conserver aux lysozymes toute leur activité biologique.

2. A titre d'exemple, la purification des lysozymes extraits du lait humain et de la rate de chien est décrite: leur pureté a été vérifiée par une chromatographie d'équilibre et des analyses.

3. La dessalification complète des solutions contenant des lysozymes a pu être achevée par filtration sur Sephadex G-50.

4. La présente méthode est comparée à d'autres décrites précédemment.

## SUMMARY

1. A method is described for the purification and preparation of lysozymes from various sources by chromatography on carboxymethylcellulose; under the conditions used, especially those relating to the pH, the lysozymes retain their full biological activity.

2. The method was applied to the purification of the lysozymes from human milk and from dog spleen; the purity of these lytic enzymes was verified by partition chromatography on Amberlite CG-50 (pH, molarity and temperature being kept constant during the chromatography) and by some amino acid determinations.

3. Complete desalting of solutions containing lysozymes can be achieved by filtration on Sephadex G-50.

4. The present method is compared with some purification processes reported previously.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. JOLLÈS, dans P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. IV, Academic Press, New York, 1960, p. 431.
- <sup>2</sup> M. B. RHODES, P. A. AZARI ET R. E. FEENEY, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 399.
- <sup>3</sup> S. MANDELES, *J. Chrom. Log.*, 3 (1960) 256.
- <sup>4</sup> E. W. SUTHERLAND, C. F. CORI, R. HAYNES ET N. S. OLSON, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 825.
- <sup>5</sup> G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 95.
- <sup>6</sup> P. JOLLÈS, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. V, Academic Press, New York, 1961, p. 137.
- <sup>7</sup> P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 91.
- <sup>8</sup> S. MOORE, D. H. SPACKMAN ET W. H. STEIN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185.
- <sup>9</sup> P. JOLLÈS ET M. LEDIEU, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 100.