

# PURIFICATION DU LYSOZYME DE BLANC D'OEUF

Pierre-Alain. Mannoni, Jeanne Rodrigue.

## I) BUT

Nous cherchons dans cette manipulation à extraire et purifier l'enzyme lysozyme du blanc d'œuf de poule.

Les différentes fractions récupérées durant les étapes de la purification seront analysées par spectrophotométrie pour connaître leur teneur en protéines et en lysozymes. Egalement les fractions seront analysées par électrophorèse pour caractériser les molécules présentes et constater la validité de la méthode.

## II) PRINCIPE

Dans le blanc d'œuf on trouve de nombreuses protéines telles que l'ovalbumine et le lysozyme.

Le lysozyme représente 7 à 8% de ces protéines, son  $pI = 11$  est supérieur à celui de toutes les autres protéines (dont l'ovalbumine). Pour purifier le lysozyme on utilisera la méthode de la chromatographie échangeuse d'ions :

- Dans un tampon de  $pH = 10$  toutes les protéines du blanc d'œuf sont chargées négativement, sauf le lysozyme qui lui, est chargé positivement. Comme seul le lysozyme est chargé positivement il sera fixé sur la résine.
- On décroche le lysozyme avec un bombardement d'ions  $Na^+$  (provenant de  $NaCl$  à forte concentration), car les ions  $Na^+$  entrent en compétition avec le lysozyme sur le groupement  $COO^-$  de la  $CM$  cellulose.
- Après centrifugation on recueille le lysozyme dans les fractions F5 et F6.
- On procède au dosage des protéines présentes dans les différentes fractions par la méthode de Folin-Lowry. Ainsi on pourra déterminer l'enrichissement et le rendement de purification, et localiser éventuellement les pertes d'enzymes au cours de la chromatographie.
- L'électrophorèse permet d'identifier la présence de protéines et donc l'absence ou présence de lysozyme.

### III) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### 1) Purification du lysozyme par chromatographie échangeuse d'ions.

Dans un bécher on récupère le blanc d'œuf et on le dilue en Tp 10 ( tampon glycine-NaOH ; à 0,1 mol/l) jusqu'à un volume total de 200ml et on agite. Puis on filtre cette solution sur lame de verre. Ceci est fait en commun par tous les binômes.

Les différentes étapes sont faites dans du Tp10 et Tp10 NaCl :Tp10+NaCl à 0,5mol /l

Voir schéma organigramme du protocole expérimental.

Le lysozyme est une holoprotéine de masse molaire=14300 Da ; c'est une exoenzyme ; elle possède une activité enzymatique BETA- galactosémique qui lui permet de lyser la paroi de certaines bactéries gram +. Lorsque l'on va chercher à déterminer son activité catalytique volumique c'est cette propriété que l'on va utiliser mais aussi le fait que la paroi bactérienne absorbe à 450 nm. Ainsi en présence de Micrococcus selon la quantité de lysozyme présent, la lyse sera plus ou moins importante. On mesure donc l'absorbance de chaque fraction (préparation enzymatique) ainsi on verra dans quel fraction le lysozyme est présent c'est à dire à quel moment qu'il a été décroché.

#### 2) Détermination de l'activité catalytique volumique.

Préparation des solutions diluées des fractions dans des tubes à hémolyse

Nous avons effectué les dilutions suivantes dans des tubes à hémolyse. Toutes les fractions ont été diluées à l'aide du tampon Tp 6.2

Fraction	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Volume de Tp 6.2 (µl)	900	/	/	/	800	800	500
Volume de Fraction (µl)	100	/	/	/	200	200	500
Dilution	1/10	AUCUNE	AUCUNE	AUCUNE	1/5	1/5	1/2

A température ambiante, nous avons mis 2,9 ml de d'une solution contenant des Micrococcus dans une cuve de spectrophotométrie après avoir bien agité le flacon dans lequel se trouve ce

dernier. Nous avons alors introduit 0.1 ml de préparation effectuée précédemment puis nous avons agité quelques secondes avant de commencer les mesures d'absorbance.

Pour chaque fraction, nous avons effectué des mesures à 450 nm toutes les 15 secondes pendant 300 secondes. Pour l'étalonnage du spectrophotomètre nous avons utilisé une cuve avec de l'eau distillée. La variation de l'absorbance par rapport au temps est proportionnelle à la quantité de lysozyme. En effet le *Micrococcus* intact absorbe à 450 nm. Après la lyse de ses parois par le lysozyme, l'absorbance diminue. Lorsque le *Micrococcus* est en excès, plus la quantité de lysozyme est importante, plus la lyse se fait rapidement.

### **Exemple de calcul pour trouver l'activité catalytique volumique enzymatique et de l'unité total de lysozymes par fraction.**

$$\text{Activité catalytique volumique} = (\text{Variation de l'absorbance} \times 60) / 300$$

$$\text{Nombre d'unité total de Lysozyme par fraction} = \frac{(\text{variation d'absorbance} \times \text{volume de fraction recueilli})}{(\text{dilution} \times 0,1 \times 0,001)}$$

En F1 :

$$\begin{aligned} \text{quantité récolté} &= 7,23 \text{ ml} = 0,723 \text{ dcl} \\ \text{Une unité Lysozymique} &> 0,001 \text{ ABS} \\ X &> 0,723 - 0,519 \\ X &= ((0,723 - 0,519) / 0,001) / 4,75 \\ X1 &= (204 / 4,75 \times 10 \times 10) / 0,1 \text{ (Quantité mis en cuve)} \\ X1 &= 42947,36 \text{ U Lysozymique s} \end{aligned}$$

On divisera par 4,75 qui équivaut à 5min et 15s car on a attendu 15s avant de mettre le tube à hémolyse dans le spectrophotomètre.

### **Calcul de l'enrichissement.**

$$\text{Enrichissement} = \text{Activité spécifique de la Fraction F5 ou F6} / \text{Activité spécifique de F0}$$

### **Calcul du rendement.**

$$\text{Rendement} = \frac{(\text{quantité de lysozyme dans une fraction}) \times 100}{(\text{Quantité de lysozyme en F0})}$$

Voir tableau récapitulatif pour les résultats

### 3) Dosage des protéines

Ce dosage permet de déterminer la quantité de protéines que l'on trouve dans chacune des fractions obtenues.

-Préparation de la gamme d'étalonnage.

La gamme d'étalonnage nous permet de tracer une droite étalon qui nous permettra de mesurer la concentration des fractions en protéines par interpolation.

Nous avons préparé les tubes avec des concentrations de SAB allant de 0 à 0.1 mg/ml à partir de d'une solution à 0.1 mg/ml. Puis nous avons lu l'absorbance à 700 nm.

méthode de dilution pour gamme d'étalonnage

Tube	1	2	3	4	5	6
Concentration en mg/ml	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
Absorbance	0	0.065	0.127	0.203	0.237	0.281

(Voire droite d'étalonnage en annexe)

#### -Préparation des fractions

Nous avons préparé les fraction F0 a F6 selon le tableau suivant.

Puis après une estimation visuelle montrant que F0 et F1 étaient plus coloré que le plus coloré des tubes de la gamme étalon nous avons dilué F0 et F1 au 1/2 pour obtenir F0' et F1'. Nous avons préparé un volume de 2 ml pour chaque fraction.

Fraction	F0	F0'	F1	F1'	F2	F3	F4	F5	F6
Prise d'essai en µl	40	20	40	20	200	400	600	1000	2000
Dilution	1/50	1/100	1/50	1/100	1/10	1/5	1/3.33	1/2	-
H2O µl	1960	1980	1960	1980	1800	1600	1400	1000	0

#### 4) Electrophorèse

L'électrophorèse a pour but d'identifier les protéines présentes dans les fractions recueillies lors de la purification. Le gel de séparation est utilisé pour séparer les protéines selon leur vitesse de migration quand elles sont soumise à un champ électrique. Le gel de concentration à pour but de concentrer les protéines avant leur migration.

#### Préparation du matériel

- Montage

Un joint est mis en place sur l'une des plaques en verre puis on positionne les deux espaceurs de chaque côté et on pose l'autre plaque par-dessus. Le tout est solidarisé par des pinces. On remplit le montage d'eau pour tester l'étanchéité puis on sèche avec de l'alcool.

- Gel de séparation

Nous avons préparé 30 ml de gel selon le protocole fourni soit

7.50 ml d'acrylamide :bis-Acrylamide

11.25 ml Tris HCl pH 8.8

0.30 ml SDS à 10 %

10.95 ml d'eau

Pour la polymérisation nous avons ajouté

30 µl de TEMED

Et après agitation

300 µl de persulfate d'ammonium 20%

La préparation est aussitôt coulée entre les deux plaques à l'aide d'une pipette jusqu'à 2 cm du niveau supérieur. Nous avons pris soin d'éviter la présence de bulle dans le gel en inclinant le montage lors du remplissage. Puis nous avons recouvert le gel d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale. Le gel a commencé à polymériser dès la fin du remplissage. Il importe donc d'effectuer cette opération très rapidement ou bien de diminuer la quantité de catalyseur pour ralentir la polymérisation.

- Gel de concentration

Nous avons préparé 10 ml de gel selon le protocole fourni soit :

1.25 ml d'acrylamide :bis-Acrylamide

1.25 ml Tris HCl pH 6.8

0.10 ml SDS à 10 %

7.4 ml d'eau

Pour la polymérisation nous avons ajouté

40 µl de TEMED

Et après agitation

100 µl de persulfate d'ammonium 20%

Nous avons retiré l'eau puis avons rempli le montage comme précédemment jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre. Le peigne est alors mis en place pour former des puits dans le gel de concentration.

- Le tampon de migration

Nous avons préparé 1 litre de tampon selon le protocole fourni soit :

12.5 ml de Tris 25mM

14.4 g de Glycine

977.5 ml d'eau distillée

10 ml SDS 10 %

### Préparation des fractions

Les fractions F0 à F6 ont été diluées en fonction des concentrations en protéines. Les préparations sont effectuées dans des tubes Eppendorf dont le bouchon a été percé.

Fraction	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Tampon dénaturant	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Fraction recueillie	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Préparation à placer dans l'électrophorèse</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>200 µl</b>	<b>200 µl</b>	<b>200 µl</b>	<b>200 µl</b>

Les préparations sont chauffées pendant 4 minutes afin de favoriser la dénaturation des protéines.

### Montage de l'électrophorèse

Le peigne est retiré puis les plaques sont placées sur le support et fixées avec des pinces. Les cuves sont alors remplies avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure. Nous avons pris soin de retirer les bulles d'air présentes entre les plaques en verre et le tampon de migration. Nous avons déposé 50 µl d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue. Les électrodes sont alors connectées au générateur avec le pôle négatif dans la partie supérieure. La migration se fait à 30 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.

### Révélation

Le gel est retiré des plaques puis placé sur un agitateur et coloré pendant 30 minutes puis décoloré 3 fois 30 minutes avec les solutions suivantes :

Coloration 30 minutes	Décoloration 3 fois 30 minutes
Bleu de Coomassie 2.5 %	Isopropanol 45%
Isopropanol 20 %	Acide Acétique 10 %
Acide Acétique 20 %	Eau 45 %
Eau 57.5 %	

L'électrophorèse nous permet d'identifier les protéines présentes dans les fractions et donc de déterminer la présence de lysozyme.

#### IV) Resultats et Interpretation

Fractions	F0'	F0	F1'	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Absorbance	0.271	0.492	0.279	0.389	0.270	0.124	0.073	0.226	0.127
Concentration en mg/ml	0.092	0.172	0.095	0.135	0.092	0.039	0.020	0.076	0.040
Dilution	1/100	1/50	1/100	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
Concentration réelle mg/ml	9.2*		9.5*		4.6	2.0	1.0	3.8	1.3
Volume de la fraction (ml)	10		7.2		18.6	20	19.5	9.8	10
Quantité de protéines dans le surnageant des fraction en mg	92.0		68.4		85.6	40.0	19.5	37.2	13
Variation d'absorbance par fraction à 450 nm									
15 secondes	0.723		0.164		0.260	0.305	0.296	0.271	0.250
30	0.716		0.163		0.255	0.297	0.294	0.270	0.245
45	0.698		0.163		0.256	0.294	0.292	0.272	0.244
60	0.682		0.161		0.255	0.294	0.292	0.270	0.240
75	0.671		0.163		0.254	0.295	0.290	0.268	0.238
90	0.661		0.160		0.253	0.294	0.292	0.263	0.240
105	0.647		0.158		0.249	0.290	0.289	0.262	0.235
120	0.636		0.157		0.250	0.289	0.291	0.259	0.231
135	0.625		0.157		0.248	0.290	0.284	0.258	0.229
150	0.617		0.159		0.246	0.289	0.285	0.258	0.227
165	0.602		0.155		0.245	0.286	0.285	0.255	0.225
180	0.592		0.153		0.245	0.287	0.281	0.255	0.223
195	0.584		0.152		0.243	0.284	0.279	0.251	0.221
210	0.573		0.153		0.242	0.282	0.281	0.248	0.219
225	0.564		0.151		0.240	0.281	0.280	0.247	0.217
240	0.553		0.153		0.238	0.280	0.277	0.244	0.215
255	0.546		0.150		0.238	0.280	0.278	0.242	0.213
270	0.539		0.148		0.238	0.277	0.275	0.240	0.212
285	0.529		0.148		0.235	0.275	0.274	0.237	0.210
300	0.519		0.150		0.234	0.275	0.272	0.234	0.208
Activité Totale Nombre d'unités de lysozymes	42947.36		257.69		822.31	1263.15	4926.31	4126.31	1389.47
Activité spécifique lysozyme/mg protéine	466.81		3.66		9.60	31.57	252.63	110.92	106.88
Enrichissement								0.24	0.23
Rendement							10 %	9.6 %	3.2 %

\*se sont les valeurs F0' et F1' qui ont été gardées puisque elles seules étaient dans la gamme étalon.

## Dosage des protéines et des lysozymes

En théorie la somme des unités de lysozyme des fractions F1 à F6 doit être égale à au nombre d'unités en F0. Cependant dans notre cas :

$$F0 = 42947,36$$

$$\text{Somme F1 à F6} = 12783$$

On pourrait penser que il y a du lysozyme encore présent sur la résine après la dernière phase de désorption puisqu'un tel écart montre que il manque encore du lysozyme. Mais notre rendement en F6 est très insignifiant par rapport à la quantité de lysozyme manquant. Il y a plusieurs hypothèses à ces résultats incohérents.

- La quantité de NaCl utilisé pour la désorption n'a pas été respectée traduisant des erreurs de manipulation
- La quantité de lysozyme en F0 ne représente pas la réalité.
- Il y a eu des erreurs dans la manipulation, le lysozyme s'est mal conservé. En effet il est très sensible à la chaleur.

Pour la quantité de protéines dans chaque fraction, on retrouve des résultats aberrants. Ainsi nos résultats montrent que dans F0 on a 92mg de protéines (soit les protéines totales) et après avoir fixé le lysozyme (qui est une protéine) sur la résine, retiré 68.4 mg de protéines de F1, lavé une première fois, on retrouve 85.6 mg de protéines dans le surnageant. Il n'y a pas d'explication rationnelle à cela si ce n'est une faute de manipulation ou de lecture.

Bien que difficile à considérer comme valides les résultats obtenus nous permettent de calculer le rendement et l'enrichissement total

$$\text{Enrichissement total} = (\text{Activité spécifique de F5+F6}) / \text{Act Spec F0} = \mathbf{0.46}$$

$$\text{Rendement Total} = \frac{\text{Act Tot F5} + \text{Act Tot F6}}{\text{Act Tot F0}} = \mathbf{0.13}$$

- Electrophorèse

Nos résultats obtenus par électrophorèse ne sont pas exploitables, en effet il semble que la migration ait duré trop longtemps et que le marqueur moléculaire correspondant au lysozyme soit sorti du gel. Il nous a donc été fourni d'autres résultats sous la forme d'une photocopie.

Grâce aux marqueurs de poids moléculaire et à la distance de migration nous avons pu tracer la courbe :

$$\text{Log PM} = \text{distance de migration.}$$

Le lysozyme à un PM de 14300 ce qui est très proche de l'ovalbumine (14200) ainsi nous avons pu identifier ou non la présence du lysozyme dans les différentes fractions

MARQUEURS de PM	PM en Dalton
a lactalbumine	14200
Inhibiteur Trypsique	20100
Trypsinogene	24000
Anhydrase carbonique	29000
Glyceraldehyde 3 Phosphate	36000
Ovalbumine	45000
Serum Albumine	66000

Fraction	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Présence de lysozymes	oui	Bande très peu visible	non	non	non	oui	Oui

Les résultats fournis sont exemplaires. En effet ils correspondent parfaitement avec la théorie c'est à dire :

- Le lysozyme est clairement présent en F0 c'est à dire dans le blanc d'œuf.
- Il est présent en faible quantité dans F1 c'est à dire que une très grande partie a été fixée sur la résine mais qu'il reste un faible pourcentage dans le surnageant.
- En F2, F3, F4 l'absence de lysozyme confirme qu'il est correctement fixé à la résine.
- En F5, c'est la désorption et donc le lysozyme est libéré de la résine et se retrouve dans le surnageant.
- En F6 où l'on répète une nouvelle fois la désorption il est présent aussi, c'est-à-dire que tout le lysozyme n'a pas été désorbé en F5.

Cependant la présence du lysozyme en quantité significative en F6 suggère qu'il en reste encore sur la résine au moins en faible quantité et une troisième désorption le prouverait certainement.

Ainsi la purification a correctement fonctionné puisque le lysozyme se retrouve séparé des autres protéines du blanc d'œuf en F5 et F6. Cependant la « purification » est relative et nous sommes loin d'une purification à 100% (impossible d'ailleurs à réaliser où à trouver dans le commerce) et pour obtenir une substance « plus » pure, il faudrait soit répéter les opérations de purification à partir de la fraction F5 et F6 soit utiliser d'autres techniques de chromatographie tels que la CPG (chromatographie en phase gazeuse) ou la HPLC (chromatographie liquide haute pression) qui demandent cependant du matériel plus imposant et plus coûteux

