

## LYSOZYME : SEQUENCE 1

### mise en évidence et mesurage de l'activité anti-bactérienne du lysozyme

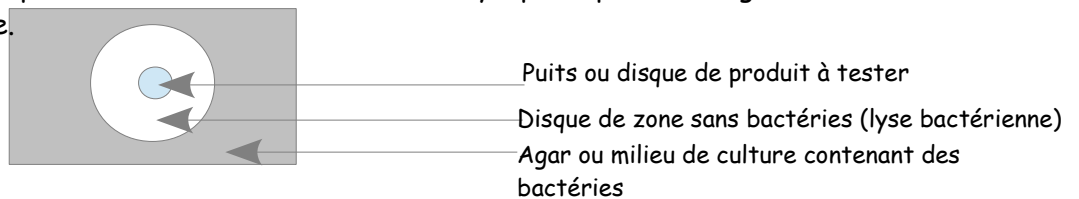
Chaque principe décrit dans les chapitres I) II) et III) ci-dessous permet de mettre en évidence et/ou de mesurer l'action bactériolytique du lysozyme. On testera chaque principe sur les trois préparations ci-dessous :

- Lysopaine
- Lysozyme pur en solution en tampon pH 6,2.
- Blanc d'œuf de poule.

#### I) Mise en évidence de l'action bactériolytique par une méthode de diffusion en gélose.

Objectif : Concevoir un protocole (disques ou puits ; agar pur ou milieu de culture) pour estimer la quantité de lysozyme présente dans le blanc d'œuf et la lysopaine par mesurage de diamètre de zone de bactériolyse.

A disposition :



Lysopaine

Lysozyme de poule en poudre.

Œuf de poule

Suspension de *Micrococcus lysodeikticus* en tampon pH 6,2 d'absorbance à 450 nm voisine de 0,6-0,7 (équivalent d'une culture en phase de croissance exponentielle)

Isolements de *Micrococcus lysodeikticus* sur gélose CTS

Tampon phosphate pH 6,2

Solution étalon mère de lysozyme à 2000 µg /mL de tampon pH 6,2

étalons de solution de lysozyme en pH 6,2 de 150 à 1500 µg/mL ( 150 ; 300 ; 1000 ; 1500)

Agar-agar pur

Gélose CTS : flacon de 100 mL

Disques de papier stériles

Emporte-pièce pour puits diamètre 4 mm (à traiter au surfasafe ou à l'aniosyme) ou cônes de micropipettes.

Boîtes de Pétri diamètre 90 mm.

Matériel usuel Bactériologie.

#### Données utiles au choix de la technique à utiliser :

Le lysozyme est actif à température ambiante avec un optimum aux environs de 28°C et à des pH variant de 4 à 9 avec un optimum aux environs de 6,2.

des essais préliminaires ont donné quelques indications :

- essai dans la masse (suspension en agarose pure) : l'équivalent de 5 colonies dans # 25 mL d'agarose donne un trouble trop faible pour une lecture aisée des zones de lyse ( Rq : il n'y a pas de développement bactérien dans l'agarose pure)
- ensemencement en surface d'une gélose CTS, méthode des puits : diamètre des zones de lyse compatibles avec des dépôts de 20 µL par puits de solutions de lysozyme de concentration variant de 150 à 2000 µg/mL
- méthode par disques : ressources bibliographiques mentionnant des résultats en incluant dans 20 mL de gélose CTS en surfusion, 0,1 mL de suspension de *Micrococcus*

lysodeikticus d'absorbance à 0,7 à 450 nm. Dépôts de 4  $\mu\text{L}$  par disque et incubation 24 h à 28 °C.

## II) Mise en évidence de l'action bactériolytique par mesure turbidimétrique.

Les particules en suspension provoquent une dispersion de la lumière (l'œil perçoit un ''trouble'' ou une turbidité).

L'intensité du faisceau transmis à la sortie de la suspension est amoindrie par rapport à celle du faisceau incident.

On peut utiliser deux types de mesurage : la turbidimétrie ( intensité du faisceau transmis) et la néphélométrie (intensité du faisceau diffracté).

La turbidimétrie est souvent applicable aux cultures cellulaires en respectant certaines précautions.

### Mode opératoire :

dans une macrocuve de mesure spectrophotométrique, introduire 2,9 mL de suspension de *Micrococcus l.* en pH 6,2 (attention à l'homogénéisation de la suspension avant de la prélever !)

Vérifier que l'absorbance à 450 m de la suspension utilisée est aux environs de 0,7. ( au besoin , diluer en tampon pH 6,2).

ajouter 0,1 mL du produit tester. Fermer la cuve. Agiter par retournement. Mesurer l'évolution de l'absorbance toutes les 15 secondes pendant 3 minutes.

Rq : un essai pourrait être réalisé avec une prise d'essai de salive qui contient du lysozyme.

**A la fin de chaque test, faire immédiatement un frottis bactérien**, le fixer et le colorer ( Gram ) pour la partie III)

**Rq : prévoir des témoins**

## III) Mise en évidence de l'action bactériolytique par observation de frottis colorés au

### Gram

Observer les frottis réalisés en II). Faire un schéma légendé de l'observation et interpréter.

***Donnée*** : la paroi bactérienne est responsable de la forme de la bactérie et lui permet de résister à la pression osmotique interne très élevée.

## IV) Étude des protéines du blanc d'œuf et de la lysopaïne par électrophorèse

L'électrophorèse en gel d'agarose est pratiquée en immersion en tampon Tris-Gly pH 8,6.

- Dissoudre un comprimé de lysopaïne dans 5 mL de tampon d'électrophorèse Tris-Gly pH 8,6.
- gel d'agarose à 3 % fournis (répartition des puits à prévoir par le groupe).
- dépôts :
  - lysozyme à 2 mg/mL : 5  $\mu\text{L}$
  - blanc d'œuf : diluer au  $\frac{1}{2}$  en tampon d'électrophorèse , incorporer du tracking dye et faire 2 dépôts de 2 et 5  $\mu\text{L}$
  - lysopaïne dissoute : dépôts de 10 et 15  $\mu\text{L}$
- migration : 120 V 30 minutes (suivre la migration du tracking dye pour adapter le temps de migration en cas de nécessité)

- coloration au bleu de coomassie : 3minutes
- lavages en bains successifs d'acide acétique à 5%.
- photographier le résultat. Une exploitation densitométrique logicielle est souhaitable (mesurim).

### Compte-rendu premier jour :

1. Diffusions : donner le protocole de la méthode de diffusion choisie
2. Turbidimétrie :
  1. Donner les tableaux des mesures des différents essais
  2. Comparer les résultats obtenus à 3 minutes.
3. Observation microscopique au Gram : faire des schémas d'observation des meilleurs champs observés et interpréter.

### Compte-rendu 2ème jour : lecture et exploitation des diffusions et électrophorèses

4. Diffusions :
  1. Construire le tableau des mesures des diamètres des disques de bactériolyse.
  2. Tracer la gamme d'étalonnage  $D^2 = f([\text{lysozyme}])$  sur papier millimétré et vérifier si elle est utilisable.
  3. Déterminer graphiquement la concentration du lysozyme dans la lysopaine et le blanc d'œuf.
  4. Interpréter les résultats obtenus et les comparer à ceux obtenus par mesure turbidimétrique.
5. Electrophorèse : Interpréter les résultats obtenus à l'électrophorèse sur photo et/ou tracés densitométriques obtenus avec le logiciel mesurim ( photo et tracés fournis par l'enseignant).  
Déterminer la présence ou l'absence de lysozyme dans les différents échantillons et expliquer sa migration électrophorétique dans les conditions expérimentales.  
Identifier les protéines correspondant aux différents spots obtenus .

**Données** : tampon d'électrophorèse pH 8,6 ; pHi des protéines du blanc d'œuf ci-dessous.

La révélation des protéines au bleu de coomassie donne une coloration d'autant plus intense que la quantité de protéine est importante. Cette propriété est utilisée dans la lecture densitométrique des gels d'électrophorèse. Dans un tel tracé chaque surface de pic d'absorbance est proportionnel à la concentration relative ( en %) de la protéine correspondante dans le mélange ( surface totale des pics d'absorbance = 100 % des protéines présentes dans l'échantillon et séparées lors de l'électrophorèse).

6. Synthèse : faire une synthèse d'environ 10 lignes sur les informations recueillies sur le lysozyme, le blanc d'œuf et la lysopaine . Faire une synthèse d'environ 20 lignes sur les résultats comparés des techniques utilisées et discuter de leurs avantages et inconvénients

Résultats de l'électrophorèse

