



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Int. Cl.³: C 12 N
C 11 B

9/02
5/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

619 981

⑲ Numéro de la demande: 2405/77	⑦③ Titulaire(s): ANVAR-Agence Nationale de Valorisation de la Recherche, Neuilly-sur-Seine (FR)
⑥② Demande scindée de: 5082/74	
②② Date de dépôt: 11.04.1974	
③⑩ Priorité(s): 16.04.1973 FR 73 13670	⑦② Inventeur(s): Adolf Michael Michelson, Chatenay-Malabry (FR)
②④ Brevet délivré le: 31.10.1980	
④⑤ Fascicule du brevet publié le: 31.10.1980	⑦④ Mandataire: Kirker & Cie, Genève

⑤④ Procédé de préparation d'une enzyme superoxyde dismutase.

⑤⑦ On extrait l'enzyme d'une culture d'une souche bactérienne marine, notamment un photobacterium par maintien d'une dispersion aqueuse du micro-organisme à 4°C, puis pendant quelques minutes à 50-60°C alors que son pH est à 6,5-8, refroidissement à 4°C, centrifugation, précipitation fractionnée de l'enzyme sur la fraction surnageante par addition d'un sel neutre et nouvelle centrifugation.

L'enzyme ainsi obtenue est utile comme inhibiteur d'oxydation des aliments et autres matières oxydables.

REVENDECATIONS

1. Procédé de préparation d'une enzyme superoxyde dismutase, caractérisé en ce qu'on extrait l'enzyme superoxyde dismutase de cultures de souches bactériennes marines, ladite extraction comprenant la succession d'étapes consistant à disperser dans l'eau et maintenir à environ 4°C une culture bactérienne marine, à porter ensuite le mélange à 50-60°C pendant quelques minutes alors que son pH est compris entre 6,5 et 8, à refroidir ledit mélange à environ 4°C et, à cette température, à centrifuger, à effectuer sur la fraction surnageante une précipitation fractionnée de l'enzyme au moyen d'un sel neutre et à centrifuger de nouveau.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, après la seconde centrifugation, on effectue sur la fraction surnageante une seconde précipitation fractionnée de l'enzyme aux sels neutres et on centrifuge une troisième fois.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites souches marines sont des souches de *Photobacterium leiognathi*, de *Photobacterium phosphoreum* ou de *Photobacterium sepia*.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites souches marines sont choisies parmi une souche de *Photobacterium leiognathi* N° ATCC 25521, une souche de *Photobacterium phosphoreum* N° ATCC 11040 et une souche de *Photobacterium sepia* N° ATCC 15709.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la dissolution, dans du tampon phosphate pH 7,8, du précipité recueilli dans la dernière centrifugation et une dialyse de la solution ainsi obtenue, contre le même tampon phosphate pH 7,8.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on reprend le produit de la dernière centrifugation avec du tampon phosphate pH 7,8 et on effectue une chromatographie de la solution obtenue.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on porte ledit mélange à 50-60°C pendant 3 à 4 mn.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit sel neutre est du sulfate neutre d'ammonium (NH₄)₂SO₄.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on réalise la première précipitation fractionnée au moyen de (NH₄)₂SO₄ ajouté en une quantité telle que le mélange ou extrait enzymatique traité soit ainsi amené à une concentration finale de 30 à 35% de la saturation à 4°C.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise la seconde précipitation fractionnée au moyen de (NH₄)₂SO₄ ajouté en une quantité telle que le mélange ou extrait enzymatique traité soit ainsi amené à une concentration finale de 70 à 75% de la saturation à 4°C.

11. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on stérilise l'extrait obtenu par ultrafiltration.

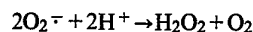
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'on opère au moyen d'un dispositif d'ultrafiltration comprenant un premier tube poreux retenant, en les concentrant, les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 40000 et un second tube poreux laissant passer les molécules d'enzyme désirées, mais retenant les bactéries restantes, procurant ainsi un extrait enzymatique stérile.

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une enzyme superoxyde dismutase utile à titre d'inhibiteur d'oxydation, en particulier à titre d'inhibiteur d'oxydation des aliments et autres composés ou milieux oxydables.

On a déjà décrit des superoxyde dismutases, extraites d'érythrocyte de bœuf (Markovitz, «J. Biol. Chem.» 234, p. 40,

1959) et d'*Escherichia coli* (Keele et Fridovich, «J. Biol. Chem.», 245, p. 6176, 1970).

Les superoxyde dismutases sont des enzymes capables d'inhiber la dismutation des ions superoxydes, suivant la réaction :



Elles contribuent donc à réaliser un système d'autoprotection pour les articles ou organismes dans lesquels elles se trouvent, car les ions O₂⁻ qui sont produits au cours des réactions d'oxydation sous l'effet d'oxygène moléculaire sont très actifs et attaquent, entre autres, les protéines, par oxydation du tryptophane entre autres acides aminés, et les acides nucléiques.

Au sens de la présente invention, on entend par substance oxydable toute substance susceptible de se dégrader par une oxydation mettant en jeu l'intervention d'ions superoxydes.

Suivant l'invention, on prépare une superoxyde dismutase efficace à partir de souches bactériennes marines, telles que, par exemple, des souches de *Photobacterium phosphoreum*, de *Photobacterium leiognathi* ou de *Photobacterium sepia* entre autres.

Parmi ces diverses souches, on peut citer les souches de *Photobacterium phosphoreum* N° ATCC 11040, de *Photobacterium leiognathi* N° ATCC 25521, de *Photobacterium sepia* N° ATCC 15709.

Tous ces micro-organismes sont connus. En particulier, *Photobacterium leiognathi* a été décrit par Boisvert, Châtelain et Bassot («Annales de l'Institut Pasteur» (1967), 112, p. 520-524); *Photobacterium sepia* a été décrit par Nicholas et McElroy dans «J. Gen. Microbiology» (1964), 35, p. 401-410.

On a pu déterminer l'effet antioxydant remarquable procuré par ces superoxyde dismutases sur des champignons, sur des pommes et sur des pommes de terre, entre autres aliments.

Le procédé selon l'invention consiste à disperser dans l'eau et à maintenir à environ 4°C une culture bactérienne marine, à ajuster ensuite le pH du milieu à 6,5-8, et de préférence à 7

environ, à porter le mélange à 50-60°C pendant quelques minutes, à le refroidir à environ 4°C et, à cette température, à centrifuger, à effectuer sur la fraction surnageante une précipitation fractionnée de l'enzyme au moyen de sels neutres, à centrifuger à nouveau. De préférence, on effectue sur la fraction surnageante une seconde précipitation fractionnée de l'enzyme aux sels neutres et on centrifuge à nouveau.

En variante, on peut compléter le procédé selon l'invention par une étape de purification, consistant avant tout en une dissolution dans du tampon phosphate pH 7,8 du précipité recueilli dans la dernière centrifugation et en une dialyse de la solution ainsi obtenue, contre le même tampon phosphate pH 7,8.

Selon une autre variante du procédé selon l'invention, on purifie l'enzyme extraite de la culture bactérienne marine, après reprise du produit de la dernière centrifugation avec du tampon phosphate pH 7,8, et dialyse contre ce même tampon, par une chromatographie qui est de préférence une chromatographie sur colonne et en particulier une chromatographie sur trois colonnes successives qui sont respectivement : une première colonne de gel de Sephadex G 200, une colonne de diéthylaminoéthyl Sephadex (DEAE-Sephadex A-50) et une seconde colonne de gel de Sephadex G 200.

La culture bactérienne servant de source d'enzyme dans le procédé selon l'invention est, par exemple, une culture de souches de *Photobacterium phosphoreum*, de *Photobacterium leiognathi*, ou de *Photobacterium sepia*.

Pour ajuster à 6,5-8 le pH de la dispersion des bactéries dans l'eau, on utilise par exemple de l'ammoniaque 2N et on ajoute ensuite du chlorure de potassium, de préférence du KCl 3M.

On porte ensuite le mélange ainsi constitué à une température de 50 à 60°C, pendant quelques minutes seulement et de préférence pendant 3 à 4 mn. On refroidit alors le mélange à 4°C environ, température à laquelle on effectue toutes les étapes suivantes du procédé selon l'invention.

Chacune des précipitations fractionnées constituant des étapes de ce procédé est réalisée, comme indiqué plus haut, au moyen de sels neutres en solution aqueuse, et de préférence au moyen de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, on réalise la première précipitation fractionnée au moyen de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ajouté en une quantité telle que le mélange ou extrait enzymatique traité soit ainsi amené à une concentration finale de 30 à 35% environ de la saturation à 4°C. Il faut toutefois noter que l'on peut remplacer pour tout ou partie le sulfate d'ammonium par un ou plusieurs autres sels appropriés et la quantité totale desdits sels est alors une quantité équivalente et appropriée pour qu'elle amène le mélange à une concentration finale d'environ 30 à 35% de la saturation à 4°C.

En variante, on peut utiliser un système d'ultrafiltration, tel que par exemple un système mettant en œuvre un dispositif poreux tel que des tubes poreux, et en particulier un système utilisant un premier tube poreux retenant, en les concentrant, les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 40 000, et un second tube poreux laissant passer les molécules d'enzyme désirées mais retenant les bactéries restantes, procurant ainsi un extrait enzymatique stérile.

De même, on réalise avantageusement la seconde précipitation fractionnée au moyen de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ajouté en une quantité telle que le mélange ou extrait enzymatique traité soit ainsi amené à une concentration finale de 70 à 75% environ de la saturation à 4°C.

Les superoxyde dismutases obtenues à partir de différentes souches bactériennes marines par le procédé selon l'invention sont toutes des superoxyde dismutases comprenant du fer non hématinique, alors que les enzymes présentant une activité de superoxyde dismutase qui ont été décrites précédemment et qui sont l'érythrocypréine et l'enzyme extraite d'*Escherichia coli* comportent des cations divalents qui sont respectivement le cuivre et le zinc pour la première, et le manganèse pour la seconde.

La recherche de la présence d'un métal dans les superoxyde dismutases considérés peut être réalisée par une analyse au spectrographe d'absorption atomique.

On peut également effectuer un test colorimétrique qui, dans le cas présent, consiste à colorer un gel de migration électrophorétique d'une préparation de l'enzyme au moyen d'un colorant spécifique du fer ferreux Fe^{2+} , la bathophénanthroline, éventuellement en présence d'un réducteur tel que l'hydrazine. Pour ce test, on coupe le gel en deux dans le sens de la longueur et on place une des deux parties dans du bleu de coomassie, et l'autre partie dans de la bathophénanthroline. Le test est positif si l'on obtient un anneau rose dans le dernier cas, au niveau de la bande protéique. Or, comme il est connu, une telle apparition d'un anneau rosé peut être considérée comme l'indication de la présence de fer ferreux, ici dans la protéine superoxyde dismutase.

On peut aussi utiliser du fer radioactif pour marquer la protéine et en déterminer la stœchiométrie en ce qui concerne le cation métallique divalent présent.

La superoxyde dismutase extraite de cultures bactériennes marines par le procédé présentement décrit a un poids moléculaire de $40\,000 \pm 2\,500$ environ et un pHi ou point isoélectrique de 4 à 7 environ et présente un maximum d'activité enzymatique pour un pH de 8,5 à 10 environ, avec un optimum à pH 9,5 environ.

On peut maintenir l'enzyme active sur une longue période de temps en la conservant dans une solution à 70-80% de sulfate neutre d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 4°C.

L'invention est décrite plus en détail dans les exemples ci-après.

Exemple 1:

On a cultivé des bactéries de *Photobacterium leiognathi* de

souche N° ATCC 25521 sur un milieu synthétique contenant, en grammes par litre:

NaCl	30
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	18,7
KH_2PO_4	2
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5
Glucose	1,5
Glycérol	1,5
Trypticase	5
Extrait de levure	5

On a amené ce milieu au pH de 7,2 avec de la soude et on l'a stérilisé pendant 1 h à 110°C.

On s'est servi d'une préculture de 1 l, poussée pendant la nuit et répartie entre 4 Erlenmeyer contenant 250 ml de milieu chacun, pour ensemer un fermenteur de 12 l de milieu.

On a poursuivi la culture pendant 12 h à 20°C avec forte aération et on a ainsi obtenu 100 g de bactéries, exprimés en poids de produit mouillé.

On a dispersé 135 g en poids mouillé de bactéries de *Photobacterium leiognathi*, provenant de plusieurs cultures, dans 650 ml d'eau et on a laissé reposer à 4°C pendant une nuit. On a ajouté de l'ammoniaque 2N, jusqu'à amener le pH du milieu à 7-8 et on a ensuite ajouté 18 ml de KCl 3M.

On a porté le mélange à 58°C et on l'a maintenu à cette température pendant 4 mn, après quoi on l'a rafraîchi jusqu'à 4°C et centrifugé pendant 10 mn à la vitesse de 10 000 t/mn. Toujours en opérant à 4°C, on a ajusté les surnageants à 35% de saturation avec du sulfate d'ammonium solide à pH 8; on a centrifugé et on a amené le surnageant à 75% de saturation en sulfate d'ammonium et on a laissé reposer pendant une nuit à 4°C. On a récolté par centrifugation la protéine précipitée et on l'a conservée dans une solution de sulfate d'ammonium à 75%.

L'activité d'une solution de 9 mg de protéine par millilitre (biuret) était de 40 unités/mg, alors qu'elle était, à titre comparatif, de 0 unité/mg pour de la catalase en solution à 9 mg de protéine/ml.

Après une nouvelle précipitation fractionnée au moyen de sulfate d'ammonium avec un gradient de concentration de 35 à 75% de la saturation, on a obtenu une superoxyde dismutase qui, en solution à 14,8 mg de protéine/ml (biuret), présentait une activité de 134 unités/mg à 500 unités/mg.

On a dissous le précipité protéique dans du tampon phosphate pH 7,8 et on a dialysé pendant 48 h à 4°C. On a conservé l'enzyme superoxyde dismutase à -20°C.

Pour déterminer l'activité de cette dernière, on a utilisé une cuve placée devant un photomultiplicateur et renfermant le mélange réactionnel ci-après:

Luminol	10^{-3} M	0,3 ml
Tampon phosphate	10^{-3} M pH 7,8	0,3 ml
EDTA	10^{-3} M	0,3 ml
Eau		1,0 ml
Xanthine oxydase (img/ml)		0,050 ml

On a commencé la réaction en injectant dans la cuve 1 ml d'hypoxanthine 3×10^{-4} M.

Un flux de photons était alors émis, qui a donné naissance, sous l'action du photomultiplicateur, à un courant dont on a mesuré l'intensité au picoampèremètre et on a également enregistré les variations de cette intensité.

En introduisant dans le mélange réactionnel, avant initiation de la réaction, 5 µl d'une solution de la superoxyde dismutase préparée comme indiquée plus haut, on a obtenu une inhibition de l'émission de lumière et on a considéré arbitrairement que 1 unité d'enzyme superoxyde dismutase serait la quantité d'enzyme qui provoque une inhibition de 50% de l'émission de lumière.

En spectroscopie UV, la superoxyde dismutase extraite a donné le spectre classique des protéines non hématiniques, avec l'épaulement du tryptophane à 290 m μ .

Pour en déterminer le poids moléculaire, on a utilisé deux techniques connues, l'une consistant à déterminer un gradient de centrifugation au saccharose et l'autre mettant en œuvre un gel de Sephadex G 200.

On a, pour ce faire, utilisé les marqueurs suivants, dont on connaissait le poids moléculaire (p.M.):

	P.M.
ADH de levure	150 000
Albumine bovine	66 000
Peroxydase	40 200

On a conclu à un poids moléculaire de $40\,000 \pm 2500$.

Pour déterminer les sous-unités de la structure protéique de l'enzyme, on a réalisé une électrophorèse en gel de polyacrylamide additionné de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 10%.

On a observé un seul type de sous-unité, de poids moléculaire d'environ 21 000. Le poids moléculaire de la superoxyde dismutase obtenue peut donc être estimé à $21\,000 \times 2$, soit 42 000.

Toujours sur le gel de polyacrylamide, on a obtenu une bande rouge en présence de bathophénanthroline et d'hydrazine, au niveau précisément de la bande de superoxyde dismutase révélée par le bleu de coomassie.

On a effectué un dosage colorimétrique d'une solution de protéine et on a obtenu pour le fer une valeur qui, en estimant le poids moléculaire de l'enzyme à 42 000, donnait environ 2 atomes de fer par mole.

Une spectrométrie d'absorption atomique d'une solution de protéine à 0,2 mg/ml a confirmé ce chiffre.

On peut donc raisonnablement estimer à 2 le nombre d'atomes de fer par mole de la superoxyde dismutase.

Par ailleurs, l'enzyme extraite selon cet exemple s'est révélée ne pas subir de perte appréciable d'activité après 5 mn à la température de 70°C.

Une électrofocalisation de la superoxyde dismutase a permis d'évaluer à 4,4 le pHi ou point isoélectrique de cette enzyme.

L'enzyme présentait un maximum d'activité pour un pH d'environ 9,5.

On a obtenu une enzyme identique avec des caractéristiques semblables à partir d'une souche bactérienne de *Photobacterium leiognathi* N° ATCC 25587.

Exemple 2:

On a soumis une culture de bactéries de *Photobacterium sepia* de souche N° ATCC 15709 à une lyse en l'agitant dans de l'eau froide, à raison de 1 g de poids mouillé de bactéries pour 4 ml d'eau. On a ensuite centrifugé le mélange à 16 000 t/mn pendant 20 mn à 4°C puis on a refroidi le lysat à 4°C et on a ajouté au surnageant jaune clair du KCl 3M jusqu'à une concentration finale de 0,1 M.

On a chauffé la solution pendant 3 à 4 mn dans un bain d'eau porté à 60°C. On l'a ensuite refroidie à 4°C et on l'a clarifiée par centrifugation.

On a soumis le surnageant à une précipitation fractionnée par addition de sulfate d'ammonium solide. La fraction active a précipité entre 45 et 75% de saturation en sulfate d'ammonium et on l'a séparée par centrifugation; on l'a redissoute dans le volume minimal de K_2HPO_4 5×10^{-3} M, pH 7,8, et on a dialysé pendant une nuit contre le même tampon phosphate. Le produit de cette dialyse a ensuite été dirigé sur une colonne de gel de Sephadex G 100 ou G 200, équilibrée avec du tampon phosphate 5×10^{-3} M, pH 7,8. On a concentré la fraction active élue à l'aide d'une membrane d'ultracentrifugation Diaflo PM-10, et on a ensuite dialysé pendant une nuit contre du K_2HPO_4 5×10^{-3} M, pH 7,8.

On a adsorbé l'enzyme superoxyde dismutase sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 tamponnée avec du K_2HPO_4

5×10^{-3} M, pH 7,8. On a élué la protéine de la colonne avec un gradient linéaire de K_2HPO_4 , pH 7,8 (de 5×10^{-3} M à 3×10^{-1} M). La superoxyde dismutase était ainsi élue à une concentration en phosphate de $1,4 \times 10^{-1}$ M et on l'a ensuite concentrée. On a effectué une nouvelle filtration dans les mêmes conditions que la précédente sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50. On a ainsi élué l'enzyme à une concentration en phosphate de $1,6 \times 10^{-1}$ M et on a concentré.

La protéine ainsi extraite et purifiée a donné une bande unique à l'électrophorèse en gel d'acrylamide (100 μ g de protéine pour un gel).

Ainsi, on a obtenu 3 mg de superoxyde dismutase pure à partir de 20 g de cellules congelées de *Photobacterium sepia* (avec une activité de superoxyde dismutase de 250 à 5000 unités/mg).

On a maintenu l'enzyme active sur une longue période de temps en la conservant dans une solution à 70 à 80% de $(NH_4)_2SO_4$ à 4°C.

On a déterminé le poids moléculaire de l'enzyme purifiée au moyen d'une ultracentrifugation à 45 000 t/mn et pendant 16 h, à 4°C. On a mesuré la vitesse de sédimentation par la méthode de Martin et Ames, avec un gradient linéaire en sucrose de 5 à 20 (en poids/volume) et en utilisant un appareillage Beckman Spinco modèle L2-65B, avec un rotor SW 65 K. On a trouvé un coefficient de sédimentation de 3,2 pour cette dismutase, contre un coefficient de 4,82 et 7,4 respectivement pour des alcool déshydrogénases de foie de cheval et de levure. A partir de cette constante de sédimentation, on a donc calculé le poids moléculaire de la superoxyde dismutase extraite comme étant de 42 500 environ.

On a d'autre part établi que la molécule de cette protéine contenait 2 atomes de fer.

L'électrophorèse en gels d'acrylamide a donné pour la dismutase une bande unique correspondant à un poids moléculaire de 20 000 à 20 500, montrant ainsi que la molécule protéinique était composée de deux sous-unités identiques.

La superoxyde dismutase s'est en outre révélée être très résistante à l'action protéolytique de la trypsine, puisqu'un traitement pendant 60 mn de 150 μ g de cette superoxyde dismutase avec 10 μ g de trypsine à 20°C n'a entraîné aucun changement dans l'activité enzymatique, non plus d'ailleurs que dans la mobilité électrophorétique de la protéine non dissociée.

L'enzyme obtenue était très stable vis-à-vis de la chaleur: aucune perte d'activité enzymatique n'est apparue après 30 mn à 20°C, 30°C et même 40°C; après 15 mn à 50°C, une diminution de l'activité de 28% est apparue; après 30 mn à 50°C, la perte d'activité n'était toujours que de 50%, et elle n'était que de 10% et 50% après respectivement 3 mn et 10 mn à 60°C.

Une électrofocalisation de la superoxyde dismutase a permis d'évaluer à 4,1 le pHi ou point isoélectrique de cette enzyme.

On a déterminé au moyen d'une solution d'ions O_2^- préparée par voie électrolytique, que l'enzyme présentait un maximum d'activité pour un pH de 8,5 à 10, avec un optimum à pH 9,5.

Exemple 3:

On a traité une souche N° ATCC 11040 de bactéries *Photobacterium phosphoreum* qui sont des bactéries marines et ont par conséquent une forte concentration saline interne.

La lyse des bactéries était spontanée dans une solution d'EDTA 10^{-3} M, pH 7,8, à 4°C.

On a éliminé les débris cellulaires au moyen d'une centrifugation à 16 000 t/mn pendant 20 mn et à 0°C.

Des études préliminaires avaient montré que l'enzyme superoxyde dismutase était stable à 50°C et on a donc éliminé les autres protéines, elles-mêmes thermolabiles, en portant le lysat pendant 3 mn à 50°C, après une addition de KCl jusqu'à molarité de 0,1, puis on a refroidi le lysat à 4°C et on a séparé les protéines par une centrifugation classique.

Toujours à 4° C, on a réalisé une précipitation fractionnée au moyen de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ ajouté en une quantité telle que le mélange ou extrait enzymatique traité soit amené à un gradient de concentration de 0 à 30% environ de la saturation à 4° C. On a éliminé la fraction précipitée en centrifugeant pendant 45 mn à 16000 t/mn et à 0° C.

On a ajouté au surnageant la quantité de sulfate neutre d'ammonium requise pour l'amener à 75% de la saturation à 4° C.

On a réuni la fraction précipitée par une centrifugation analogue à la précédente.

En vue de purifier la superoxyde dismutase ainsi extraite, on a dissous le précipité recueilli dans un peu de tampon phosphate 5 × 10⁻³ M, pH 7,8 et on a dialysé contre ce même tampon pendant 48 h à 4° C, pour obtenir un extrait (A).

On a ensuite séparé les protéines encore présentes en fonction de la taille de leurs molécules, à l'aide d'un gel de Sephadex G 100, dont la réticulation des grains est telle qu'elle exclut les protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 100000, qui donc sortent très rapidement à l'extérieur du gel. Les molécules dont le poids moléculaire est plus faible pénètrent dans le gel et en sont éluées plus ou moins rapidement selon leur taille.

Pour ce faire, on a mis la résine de Sephadex à gonfler pendant 3 h dans l'eau, on l'a dégazée et on a filtré sur Büchner pour éliminer l'eau; on l'a placée dans le tampon de filtration et on l'a versée dans une colonne de 50 cm de long sur 3 cm de diamètre intérieur. On a équilibré la colonne par passage de 2 l de tampon.

On avait au préalable repris l'extrait enzymatique (A) provenant de la dialyse pour le concentrer sur une membrane Diaflo millipore (P.M. - 10) sous pression d'azote, jusqu'à un volume de 5 ml. On a déposé ce concentrat sur la colonne préparée comme indiqué ci-dessus et on l'a élué par passage de 500 ml de tampon phosphate 5 × 10⁻³ M, pH 7,8. Le débit était de 1 goutte toutes les 8 s et on a recueilli des fractions de 2,5 ml; celles ayant une activité notable ont été réunies et concentrées sur membrane Diaflo. On a ainsi obtenu un extrait concentré (B).

On a réalisé une nouvelle étape de purification par chromatographie sur une résine échangeuse d'ions à base de DEAE Sephadex, résine sur laquelle les protéines sont éluées selon leur charge, par des tampons de force ionique croissante.

Pour préparer la colonne, on l'a mise à gonfler dans l'eau, puis on l'a dégazée et lavée dans les solutions suivantes:

NaOH	0,5 M
KH ₂ PO ₄	0,5 M

en ayant soin de rincer la résine à l'eau distillée entre chaque étape, jusqu'à un pH voisin de la neutralité. Après filtration sur Büchner, on a mis la résine en suspension dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,8 et on l'a placée dans une colonne de 30 cm de long sur 3 cm de diamètre intérieur. On a équilibré la colonne en y faisant passer 300 ml de tampon 0,1 M.

On a placé l'extrait concentré (B) sur la colonne ainsi préparée. Une fois cet extrait complètement adsorbé, on l'a élué par 500 ml de tampon phosphate pH 7,8, composés de 250 ml de tampon phosphate 0,1 M auxquels on a progressivement ajouté 250 ml de tampon phosphate 0,5 M. Le débit était de 1 goutte toutes les 5 s et le volume des fractions recueillies de 2,5 ml. On a réuni les fractions actives et on les a précipitées par du sulfate d'ammonium, puis conservées sous cette forme à -18 à -20° C.

La pureté de l'enzyme superoxyde dismutase a pu être contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Une détermination du poids moléculaire de l'enzyme au moyen d'une étude de l'élution lors d'une filtration sur Sephadex G 200 a permis, à l'aide de la relation Log(PM) = f (volume d'élution) et des marqueurs connus, d'attribuer à la superoxyde dismutase extraite un poids moléculaire d'environ 40000.

On a également déterminé ce poids moléculaire par une centrifugation en gradients de sucrose: on a coulé des gradients de sucrose de 5 à 20% dans du tampon phosphate 5 × 10⁻³ M, pH 7,8 en mélangeant progressivement 2,60 ml de la solution à 20% à 225 ml de la solution à 5%, dans un dispositif approprié.

On a déposé sur ces gradients de sucrose différents marqueurs protéiques de poids moléculaire connu et de la superoxyde dismutase. On a réalisé l'équilibre par une centrifugation à 45000 t/mn, à 5° C et pendant 22 h. On a alors percé les tubes par le fond et on a recueilli les fractions de 10 gouttes, sur lesquelles on a mesuré les activités enzymatiques présentées par les différents marqueurs utilisés. Après avoir tracé la droite représentant la variation du poids moléculaire en fonction du numéro de la fraction d'élution, on a évalué à environ 40000 le poids moléculaire de la superoxyde dismutase extraite de *Photobacterium phosphoreum*, ce qui confirmait le résultat précédent.

Pour déterminer le poids moléculaire des sous-unités de la protéine, on a soumis cette dernière, ainsi que des marqueurs dont le poids moléculaire des sous-unités était connu, à une migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. La résolution graphique des valeurs trouvées a permis d'attribuer la valeur 20000 au poids moléculaire de chaque sous-unité de la molécule de superoxyde dismutase.

Cette dernière s'est révélée être très stable encore à 50° C et présenter un maximum d'activité enzymatique pour un pH de 9,5 environ.

Une électrofocalisation de la superoxyde dismutase a conduit à évaluer à 4,2 le pHi ou point isoélectrique de cette enzyme.

Un test colorimétrique tel que décrit précédemment a permis de relever la présence de fer ferreux dans la protéine, un anneau rose apparaissant au niveau de la bande protéique dans un gel de migration électrophorétique préalablement additionné de bathophénanthroline. Le nombre d'atomes de fer ferreux par molécule a été évalué comme étant pratiquement égal à 2.