

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 01255

(54)

Nouvelle collagénase, procédé d'obtention et applications.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 9/52; A 23 J 1/02, 3/00; A 61 K 37/54.

(22)

Date de dépôt..... 21 janvier 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

**Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 30 du 24-7-1981.**

(71)

Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, résidant en France.

(72)

Invention de : Jean Labadie et Philippe Gouet.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

**Mandataire : Cabinet Harlé et Léchopiez,
21, rue de La Rochefoucauld, 75009 Paris.**

La présente invention concerne une nouvelle collagénase bactérienne, la collagénase de la souche Flavobacterium spec. CRZV.1. Elle concerne également un procédé pour l'obtention de cette collagénase à partir de la souche Flavobacterium spec. CRZV.1. Elle a aussi pour objet la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 à titre de produit nouveau et l'application de la collagénase de cette bactérie, notamment à l'attendrissement de la viande et dans le domaine médical.

- 10 On connaît déjà des collagénases bactériennes, par exemple les collagénases de Cl. histolyticum, d'Achromobacter iophagus, de Ps. marinoglutinosa. Pour plus de détails sur ces collagénases, on pourra se référer aux ouvrages ci-après : KEIL, B., GILLES A.M., LECROISEY A., HURION N., and TONGN T. 15 1975 Specificity of collagenase from Achromobacter iophagus FEBS Letters, 56 (2), 292-296. HANADA K, MIZUTANI T., YAMAGISHI M., TAMAI M., TSUJI M., MISAK T. and SAWADA J. 1973 The isolation of collagenase and its enzymological and 20 physicochemical properties. Agr. Biol. Chem, 37(8) 1771. NORDWIG A. 1971 Collagenolytic enzymes. Adv. in Enzymol. 34 155-205.

- On a maintenant trouvé une nouvelle collagénase qui présente les caractéristiques ci-après :
- 25 -poids moléculaire compris entre 83.000 et 105.000 daltons ;
-pH isoélectrique de 7,9 ;
-activité collagénolytique optimale à pH 7,6 en tampon Tris 0,05 M HCl CaCl₂ 0,003 M et à la température de 30°C ;
-ne possède pas d'activité protéolytique non spécifique et 30 est faiblement inhibée par la cystéine et les agents bloquants des fonctions thiol.

- Le poids moléculaire de la collagénase selon l'invention est situé entre 83.000 et 105.000 daltons. Ces valeurs sont très proches de celles observées pour les collagénases de Cl. histolyticum et d'Achromobacter iophagus 35 qui sont respectivement de 105.000 et 104.000 daltons.

Le pH optimum d'activité pour l'enzyme de Flavobacterium sp CRZV.1 est de 7,6 en tampon Tris 0,05 M HCl CaCl₂ 0,003 M. Pour la collagénase de Cl.histolyticum, de nombreux auteurs, ayant étudié cette enzyme, s'accordent pour situer le pH optimum entre pH 7,0 et pH 8,0 selon les tampons employés.

La température optimale d'activité de la collagénase de la souche CRZV.1 est de 30°C. Cette valeur est la plus basse connue pour une collagénase bactérienne. On note également que l'activité enzymatique à 37°C de la collagénase selon l'invention est inférieure de moitié à celle observée à 30°C. Si l'activité enzymatique est nulle à 45°C, elle est par contre non négligeable à 15°C. D'autre part, on a trouvé que la collagénase de Flavobacterium sp. est encore active à + 4°C; ce résultat original différencie nettement l'enzyme de la souche CRZV 1. des autres collagénases bactériennes. L'activation de la collagénase de la souche CRZV.1 par les ions calcium et l'inhibition de cette enzyme par les agents chélatants montrent que les ions Ca⁺⁺ favorisent l'activité catalytique. Cette activité peut également être favorisée par les cations Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Co⁺⁺. L'effet activateur du calcium, du manganèse, du magnésium et du cobalt est une caractéristique des collagénases de Ps.marinoglutinosa et de Cl. histolyticum. L'inhibition par les métaux lourds Pb⁺⁺, Cu⁺⁺ est une autre propriété des collagénases de ces mêmes bactéries et de la collagénase de la souche CRZV.1; le mercure, fortement inhibiteur des enzymes de PS. marinoglutinosa et de Cl. histolyticum, inhibe également celle de Flavobacterium sp. CRZV.1.

La cystéine et les agents bloquants des fonctions thiols exercent une inhibition faible sur l'enzyme de Flavobacterium sp.; la faible inhibition observée avec la cystéine s'explique mal par les propriétés chélatantes de cet aminoacide. Il est possible, comme dans le cas de la collagénase de Ps.marinoglutinosa, que cette inhibition puisse provenir d'une rupture de liaisons disulfures dans la molécule enzymatique et de la formation de liaisons entre

la cystéine libre et les groupements thiols de l'enzyme.

La collagénase selon la présente invention est obtenue à partir de la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 par le procédé qui consiste:

5 1) à faire fermenter la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 sur des milieux appropriés pour la croissance de la souche à une température comprise entre 15 et 35°C environ, le pH desdits milieux étant compris entre 7 et 9 environ;

10 2) à extraire la collagénase produite par la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 des milieux de culture, et

 3) éventuellement, à purifier la collagénase ainsi recueillie.

15 La souche Flavobacterium spec. CRZV.1 est une nouvelle souche, qui a été isolée dans la nature par le laboratoire de Microbiologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique au Centre de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Theix (63110 BEAUMONT).

20 Une culture de cette bactérie a fait l'objet d'un dépôt auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes à l'Institut Pasteur de Paris, 28, rue du Docteur Roux; ce dépôt a été enregistré sous le N° I-108 le 20 Décembre 1979.

25 La souche Flavobacterium spec. CRZV.1 a été identifiée d'après les critères physiologiques et biochimiques pris en considération par la 8ème édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Cette souche appartient au groupe des bacilles à Gram négatif aérobies stricts pigmentés en jaune dont les deux genres
30 principaux sont Flavobacterium et Cytophaga. Dans le tableau I ci-après on a rassemblé les principaux caractères physiologiques et biochimiques de quatre bactéries à Gram négatif, pigmentées en jaune, à savoir ceux de
 Flavobacterium breve; Flavobacterium meningo-septicum;
35 Flavobacterium lutesceus et Flavobacterium spec. CRZV.1.

Les indications portées dans le tableau I montrent que les principales caractéristiques de la souche Flavo-

bacterium spec. CRZV.1 sont une faible activité glucidolytique et une forte activité protéolytique sur la gélatine et sur le collagène.

De plus, on notera que cette souche ne dégrade pas la caséine et l'albumine bovine. Elle ne produit pas d'indole ni d'hydrogène sulfuré. Elle possède une catalase et n'est pas pathogène.

D'autres caractéristiques de la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 ont été étudiées et sont rassemblées dans les tableaux II à IV ci-après. On indiquera que la dégradation des sucres (tableau I) a été étudié par la méthode de MAC MEEKIN [J. Appl. Bact. (1971), 34 (4), 699-716]. La dégradation des acides aminés a été déterminée par la méthode de MAC MEEKIN [J. Appl. Bact. (1973), 36, 101-108].

Les autres caractères consignés dans le tableau III ont été déterminés conformément aux travaux de PACHA R.E. [Appl. Mic., (1968), 16 (1), 97-101] et de HAYES G. et STECK T.L. [Biochem. (1971), 10, 2606-2607].

Le pourcentage de guanine et de cytosine de l'ADN bactérien, déterminé par la méthode de MARMUR J., DOTY P. [J. Mol. Biol. 5, 109-118] est de 65%.

La souche Flavobacterium spec. CRZV.1 est l'élément essentiel pour l'obtention de la nouvelle collagénase selon le procédé de l'invention.

En effet, la première étape du procédé de l'invention consiste à faire fermenter sur des milieux de culture appropriés la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 dans des conditions spécifiques pour permettre la production de la collagénase par ladite souche.

Les milieux de culture qui conviennent aux fins de l'invention doivent contenir les substances nécessaires à la croissance de la bactérie Flavobacterium spec. CRZV.1. Ces milieux doivent contenir principalement des peptides et des vitamines.

On a trouvé que les milieux de culture à base de collagène ou les milieux de culture contenant des substances ayant des séquences protéiques similaires à celle du collagène sont particulièrement appropriés. Parmi ces milieux, on

peut citer notamment les milieux à base de collagènes polymériques, de collagènes dénaturés thermiquement, c'est-à-dire les gélatines et les extraits de viande, tels que ceux connus sous les dénominations commerciales :

- 5 "Beef extract" (HUMEAU) "Difco 126", "Merck 3979", "Oxoid L 29" "Pasteur 285".

Les extraits de viande contiennent en général du collagène et des substances ayant des séquences protéiques similaires à celle du collagène, par exemple la myosine.

- 10 Dans les milieux de culture, cités ci-dessus à titre d'exemples, l'apport vitaminique peut être fourni par un extrait de levures. On peut utiliser par exemple l'extrait de levure connu sous la dénomination anglaise "YEAST EXTRACT" vendu par DIFCO.

- 15 A titre d'exemple de milieux de culture préférés aux fins de l'invention, on citera :

- les milieux de culture constitués d'extraits de viandes à une concentration de 5 à 25g par litre, de préférence 10g/l, et contenant 0,1 à 25 g/l d'extrait de levures, de préférence 2,5g/l.

-les milieux à base de collagènes à une concentration de 1 à 25g par litre, de préférence 12g/l, et contenant 0,1 à 25g par litre d'extrait de levure, de préférence 2,5g/l.

- 25 Afin d'obtenir une monoculture de Flavobacterium spec. CRZV.1 il y a lieu de stériliser, avant ensemencement, les milieux de culture appropriés, ajustés au pH adéquat, en autoclave à 120°C pendant 30 minutes à 2 heures. Au cours de la fermentation, le pH est, au besoin, ajusté par des moyens appropriés.

- 30 Les gélatines peuvent être utilisées sans aucun traitement ou sont soumises à une hydrolyse enzymatique avec de la ficine ou de la broméline. L'utilisation d'autres enzymes, telles que subtilisine, pronase, papaine, protéases, B500, K500, trypsine, chymotrypsine, pepsine, collagénases

- 35 Cl. histolyticum, A. iophagus, Fl. Sp. CRZV.2 est favorable à la production enzymatique. Ces enzymes peuvent être utilisées dans des rapport enzymes/substrat de 1/10 à 1/5000 pendant 5 mn à 10 heures à pH situé entre pH1 et pH 9; le temps de traitement optimum est de 3 h à 37°C avec de la ficine dans un rapport enzyme/substrat de

1/50. Après addition de l'extrait de levure, elles sont ensuite stérilisées comme indiqué ci-dessus.

A titre d'exemple de collagène polymérique approprié on citera le collagène polymérique préparé selon Kopp [Ann. Technol. Agric. (1971) 20 (2), 185-192].

5 Les conditions optimales de production de collagénase sont réunies lorsque:

-le milieu de culture contient 10g d'extrait de viande ou 12g/l de gélatine, 2,5g d'extraits de levure, et que la température est de 30°C, le pH de 7,6.

10 Dans ces conditions, la production enzymatique est optimale après 20-24 heures de culture en milieu aéré et agité.

Pour 15 litres de milieu, on extrait entre 500 et 2000 mg de protéines dont l'activité est de 300 à 500 U
15 Mandl/mg.

L'extraction de la collagénase produite est réalisée par précipitation du moût de fermentation à une température comprise entre 0°C et 38°C, entre 30 et 60% de saturation en sulfate d'ammonium et entre pH 6,0 et pH
20 8,0 environ, après élimination des cellules bactériennes par centrifugation.

Les conditions optimum de précipitation sont réunies à +4°C entre 30 et 60% de saturation de sulfate d'ammonium à pH 6,5 après 18 h.

25 Les protéines de collagénase sont récupérées par centrifugation dialysées contre un tampon Tris 0,005 M HCl pH 7,4 CaCl₂ 0,5 mM et lyophilisées.

Entre +4°C et -20°C, l'activité enzymatique de la collagénase est stable pendant au moins un an.

30 L'extrait brut de collagénase ainsi obtenu peut être purifié par différentes techniques bien connues de l'homme de l'art, telles que par exemple la chromatographie par échange d'ions, la filtration moléculaire.

La chromatographie par échange d'ions peut être
35 réalisée avec des colonnes de DEAE-cellulose [diéthylamino-éthylcellulose] telle que la DEAE-cellulose commercialisée par Biorad.

La filtration moléculaire est avantageusement réalisée après la purification par chromatographie d'échange d'ions. On utilise avantageusement des gels de dextrane convenablement équilibrés. Les gels connus sous la dénomination commerciale SEPHADEX, par exemple SEPHADEX G200, 5 équilibrés par un tampon tris 0,05 M HCl pH 7,6 CaCl_2 0,0004 M sont particulièrement appropriés aux fins de l'invention. Avec de tels gels, l'élution est réalisée à la température ambiante avec le même tampon. L'élution est 10 enregistrée à 280 nm 24 h après le dépôt de l'échantillon.

L'absence de protéases non spécifiques contaminant les milieux de culture et les préparations de collagénases selon l'invention rend la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 compétitive des autres sources de collagénases connues.

15 La collagénase selon la présente invention trouve une application particulière dans le domaine alimentaire, notamment pour l'attendrissement de la viande. On a en effet constaté, comme le montrent les résultats d'essais ci-après, que la collagénase selon l'invention solubilise le 20 collagène musculaire extrait et qu'une injection de collagénase dans un muscle chaud, c'est-à-dire un muscle d'un animal qui vient d'être abattu, accroît l'extractibilité du collagène de ce muscle.

Comme les autres collagénases bactériennes, la 25 collagénase selon l'invention a un très large domaine d'application et peut être utilisée notamment dans le domaine médical, par exemple pour le débridement des plaies de grands brûlés, au cours de transplantations dentaires, pour la résorption des hernies discales et la dissociation des 30 cellules. Pour plus de détail sur ces applications des collagénases connues, on pourra se référer aux articles ci-après:

CHUNGHEE K. KANG and ELDON E. RICE 1970
Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. J. Of Food Science 35, 563.

35 SIZER I.N. 1972
Medical applications of microbial enzymes -Adv.in Appl. Mic.15 ,1-11.

- LEE L.K., AMBRUS J.L. 1975-Collagenase therapy for decubitus ulcers. *Geriatrics* 30, 91-98.
- RAO D.B., SANE P.G., GEORGIEV E.L. 1975
Collagenase in the treatment of dermal and decubitus ulcers.
5 J. Of the American geriatrics society.
23 (1) p.22-30.
- MOSEROVA J., KONICKOVA Z., BEHOUNKOVA E., JANECEK J. 1974
Experimental use of collagenase in the debridement of thermally damaged skin.
10 J. of Hygienic, Epidemiology, Microbiology and Immunology
18 (4) 238-239.
SAFAR F. 1974.
Experience with collagenase in skin complications during post traumatic rehabilitation.
- 15 J. of Hyg. Epid. Mic and Immunol. 18 (4) 247-249.
MUSIL J., MAROVA E., MOSEROVA J., LETTL A. 1974
J. of Hyg. Ep. Mic and Immunol. 18 (4) 488-493.
VRABEC R., MOSEROVA J., KONICKOVA Z., BEHOUNKOVA E., BLAHA J.
1974, J. of Hyg. Ep. Mic and Immunol. 18 (4) 496-498.
- 20 L'invention va être maintenant décrite plus en détail par les exemples illustratifs ci-après.
Les extraits de viande et de levures mis en oeuvre dans ces exemples sont les produits disponibles dans le commerce sous les dénominations commerciales
- 25 "Beef extract" (HUMEAU).
"Difco 126"
"MERCK 3979"
"OXOID L 29"
"PASTEUR 285"
- 30 L'activité enzymatique de la collagénase selon l'invention est exprimée en unités Mandl ou en unité Wunsch et Heidrich dont la définition est donnée ci-après:
-1 Unité Mandl = quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μ mole d'équivalent leucine par mg de protéine pendant 18 heures d'incubation de l'enzyme avec du collagène de tendon d'Achille de bovin. Le rapport enzyme/ substrat est de 1/100. Le tampon utilisé
- 35

est un tris 0,02M HCl pH 7,6 CaCl_2
0,004 M.

Le dosage des μ moles d'équivalent
leucine libérées s'effectue par la métho-
de de ROSEN (1957).

1 Unité WUNSCH et HEIDRICH = quantité de collagénase
qui libère dans les conditions du test
0,01 μ Mol de Pr-Pro-Leu dans 5 ml d'acé-
tate d'éthyle.

- le substrat est le peptide :
Pr-Pro-Leu-Gly-Pro-DArg.

-le tampon est du tris 0,02M HCl pH 7,6
NaCl 0,15M , CaCl_2 4mM.

-Le rapport E/S est de 1/50

-La réaction a lieu 15 minutes à 30°C,
elle est arrêtée par de l'acide citrique à
5%.

EXEMPLE 1

A. Obtention de collagénase sur des milieux de cul-
ture à base d'extrait de viande.

On a mis en oeuvre le procédé de l'invention dans
les conditions ci-après;

1) milieu de culture:

-extrait de viande : 10 g/l

-extrait de levure : 2,5 g/l

-pH = 7,6 ajusté avec NaOH (1N)

-eau désionisée.

-stérilisation en autoclave à 120°C.

2) température: 30°C environ.

On a laissé la souche Flavobacterium spec. CRZV.1
se développer sur 15 l de ce milieu aéré et agité pendant
24 heures.

On a ensuite procédé à une précipitation au sulfa-
te d'ammonium entre 30 et 60% de saturation, à pH 6,5
et à la température de 4°C. On a ainsi obtenu 2000 mg d'un
extrait brut de collagénase ayant une activité enzymatique
comprise entre 6000 et 1000 UWH/mg.

- En opérant sensiblement selon le mode opératoire ci-dessus, mais en faisant varier les concentrations en extraits de viande et de levures dans les gammes indiquées précédemment, on a obtenu sensiblement les mêmes résultats.
- 5 Aucune activité protéolytique non spécifique n'a été mise en évidence dans le milieu de culture et sur le précipité au sulfate d'ammonium.

B. Obtention de collagénase sur des milieux de culture à base de collagène.

- 10 On a répété le mode opératoire ci-dessus dans les conditions ci-après:
- 1) milieu de culture:
- gélatine 12g/l (Merck ou Difco)
 - extrait de levure 2,5 g/l
 - 15 -eau désionisée
 - pH = 7,6 ajusté avec NaOH (1N)
 - stérilisation en autoclave à 120°C.
- 2) température: 30°C environ.

- La gélatine mise en oeuvre a été soumise à une hydrolyse enzymatique avec de la ficine pendant 3 heures à 37°C dans un rapport enzyme/collagène de 1/50.
- 20

L'extrait brut de collagénase obtenu après précipitation du moût de fermentation avec du sulfate d'ammonium entre 30 et 60% de saturation avait également une activité enzymatique de 6000 et 10000 UWH/mg.

- 25 On a obtenu des résultats semblables en utilisant de la gélatine soumise à une hydrolyse enzymatique avec de la broméline, de la subtilisine, de la pronase, de la papaine, des protéases, de la trypsine, de la chymotrypsine, de la pepsine ou des collagénases bactériennes.

- 30 De même, on a obtenu sensiblement les mêmes résultats en utilisant de la gélatine non soumise à une hydrolyse enzymatique et avec du collagène polymérique préparé selon Kopp [Ann. Technol. Agric. (1971) 20 (2), 185-192].

35 EXEMPLE 2

Purification de l'extrait brut de collagénase.

-Chromatographie par échange d'ions.

Trois cents milligrammes d'extrait brut de

collagénases obtenu selon l'un des modes opératoires de l'exemple 1 ont été appliqués à une colonne (25 x 1 cm) de DEAE cellulose Biorad (0,71 meq/g) à l'aide d'un tampon Tris 0,005 M HCl pH 8,6 NaCl 0,1M. L'utilisation d'un tel
5 tampon entraîne la fixation de l'enzyme collagénolytique sur la DEAE-cellulose. L'élution a été réalisée à la température ambiante par application d'un tampon Tris 0,05 M HCl pH 8,6 CaCl_2 0,004 M de molarité croissante en chlorure de sodium, 0,2 M, 0,4 M, 0,8 M. Le débit était de 30 ml/
10 heure. Les fractions étaient de 6 ml chacune. Le densitogramme d'élution a été enregistré à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DB) muni d'une cuve à circulation.

La figure 1 donne les résultats de la chromatographie sur DEAE cellulose réalisée dans les conditions ci-dessus. Cette figure montre que l'enzyme collagénolytique
15 apparaît sous forme d'un seul pic après utilisation d'un tampon Tris 0,05 M HCl pH 8,6 NaCl 0,4 M CaCl_2 0,004 M. Sur la figure 1, on a indiqué, en ordonnées, à gauche, la densité optique à 280 nm, en ordonnées, à droite, l'activité enzymatique en unités Mandl/ml, et en abscisses le volume élué en ml.
20 -Filtration moléculaire

30 mg de l'extrait purifié sur DEAE cellulose ont été appliqués sur une colonne (1m x 2,5 cm) K26 (Pharmacia) de Séphadex G 200 équilibrée par un tampon Tris
25 0,05 M HCl pH 7,6 CaCl_2 0,004 M. L'élution a été effectuée à la température ambiante à l'aide du même tampon. Le débit était de 12 ml/heure. Les fractions éluées étaient de 6ml chacune. L'élution a été enregistrée à 280 nm 24 heures après le dépôt de l'échantillon.

30 Cette purification sur gel SEPHADEX G 200 a permis de séparer la collagénase des pigments qu'elle contenait encore après l'étape de chromatographie sur échange d'ions.

La courbe d'élution de cette purification est représentée sur la figure 2 sur laquelle on a porté, en ordonnées, la densité optique à 280 nm (à gauche) et l'activité collagénolytique en unités Mandl/ml (à droite), le volume élué étant noté en abscisses.
35

L'homogénéité de la collagénase ainsi obtenue a été déterminée par le mode opératoire ci-après :

5 Trois lapins ont subi deux injections sous-cutanées d'un extrait purifié de collagénase à trois semaines d'intervalle. Pour chaque injection, on a préparé une émulsion de la solution enzymatique (1 ml d'eau physiologique avec 1 ml de protéines dans 1 ml d'adjuvant complet de Freund). Les antisérums ont été récupérés 15 jours après la deuxième injection et la présence d'anticorps anticollagénase a été contrôlée par immunoélectrophorèse selon la méthode de SHEIDEGGER. [Int. Arch. Allergy, (1955), 7, 103-110]. L'apparition d'un seul arc de précipitation en immunoélectrophorèse permet de dire que l'enzyme obtenue est homogène.

15 La détermination du poids moléculaire de la collagénase ainsi obtenue a été effectuée par électrophorèse d'une solution purifiée de collagénase, en gel de polyacrylamide à 5 et 7,5% contenant du SDS à 1% selon la méthode de WEBER et OSBORN [J. Biol. Chem. (1969), 244, 4406-4412] dans un appareil "Isco modèle 419". Les protéines étalons utilisées sont la sérumalbumine bovine PM 67.000, l'ovalbumine PM 45.000, le chymotrypsinogène PM 25.000.

25 Les résultats de ces électrophorèses sont portés sur le graphique de la figure 3 sur lequel on a porté, en abscisses, le coefficient R_f et, en ordonnées, le poids moléculaire en daltons.

Les électrophorèses ainsi réalisées permettent de situer le poids moléculaire de la collagénase entre 83.000 et 105.000 daltons.

30 La détermination du pH isoélectrique de la collagénase selon l'invention a été réalisée selon la méthode de FAIRBANKS et al. [Biochim., (1971) 10, 2606-2617] sur des gels cylindriques de polyacrylamide. Après la migration des protéines, les gels réalisés en double exemplaire ont été sectionnés en rondelles de 2 mm d'épaisseur. L'élution des rondelles a été effectuée dans 0,5 ml d'une solution de NaCl 0,15 M; le pH et l'activité catalytique ont été déterminés

sur ces éluats.

Un pH_i de 7,9 a été observé après électrofocalisation comme le montrent les résultats rassemblés sur la figure 4 qui est un graphe donnant le pH (ordonnées à gauche) et l'activité collagénolytique (ordonnées à droite). Cette valeur a été retrouvée à plusieurs reprises à partir d'extraits obtenus avec des cultures effectuées sur plusieurs milieux différents.

EXEMPLE 3

10 Mesure de l'activité collagénolytique

Elle a été effectuée par la méthode de KOPP [Ann. Technol. Agric. (1971) 20 (2), 185-192] en utilisant comme substrat du collagène épymisial de porc préparé selon la méthode décrite par cet auteur, ou du collagène de tendon d'Achille (Merck).

L'activité collagénolytique a également été mesurée par la méthode de WUNSCH et HEIDRICH en utilisant le substrat synthétique ou Pz-peptide (Serva) (4-phénylazo-benzoyloxycarnyl-L-prolyl-L leucyl-glycyl-L prolyl D arginine). Une troisième méthode a été également utilisée. Elle a été mise au point pour la collagénase de la souche CRZV.1 à partir de la méthode de YANKEELOV et al [Biochem. Biophys. Acta 482(1) 159] et est décrite ci-après. Le substrat était composé de gélose (Agar Noble (Difco)) à 1% et de gélatine à 3 ou 5% dans un tampon Tris 0,05M HCl pH 7,6 $CaCl_2$ 0,004 M NaCl 0,1M contenant de l'azide de sodium à 0,2%.

100 ml de gélose à 2% ont été mélangés à 100 ml de gélatine à 10 ou 6%. Ce mélange a été autoclavé 20 minutes à 120°C et refroidi à 45°C. On a ajouté alors 200 ml de tampon tris 0,1 M HCl pH 7,4 $CaCl_2$ 0,004 M stérilisé par filtration et porté à 45°C. Le mélange gélatine-tampon Tris a été ensuite coulé en boîtes de Pétri à raison de 15 ml (mesurés exactement) par boîte. Les boîtes ont été disposées sur des plateaux parfaitement horizontaux pendant la gélification du milieu. Elles ont alors été conservées 4 heures à +4°C et des trous ont été pratiqués à l'aide d'un emporte-pièce de 2 mm de diamètre stérilisé dans de l'alcool à 60°C.

Une gamme étalon a été effectuée avec une solution de collagénase purifiée de Cl.histolyticum (Serva) de 453 U Mandl/mg avec des dilutions allant de 1/2 à 1/512 réalisées dans le même tampon que celui utilisé dans la gélase. La solution mère de collagénase contenait 1 mg de protéines par ml de tampon.

Sur chaque boîte de Pétri, les solutions de la gamme étalon et des échantillons à doser ont été déposées à raison de 10 l par puits à l'aide d'une seringue "Hamilton".

La diffusion des solutions a duré 24 heures à une température de 37°C sur des plateaux parfaitement horizontaux.

Les zones de lyse de la gélatine sont apparues translucides et leur diamètre a été mesuré à l'aide d'un micromètre oculaire monté sur une loupe binoculaire (Wild). Les résultats ont été exprimés en dixièmes de millimètre.

Une deuxième lecture est effectuée après 48 heures à +4°C, ce qui améliore la netteté des zones de lyse. En se rapportant à la gamme étalon (figure 5), il est possible d'évaluer précisément le nombre d'unités enzymatiques dans 1 mg de protéines de l'échantillon dosé.

L'activité collagénolytique mesurée selon la méthode de KOPP est maximale à pH 7,6, le tampon utilisé étant un tampon Tris 0,05 M(HCl)pH variable CaCl₂ 4mM. La figure 6 est la courbe de l'activité collagénolytique (en ordonnées) mesurée selon cette méthode en fonction du pH (en abscisses).

La température optimale a été recherchée entre 15 et 45°C dans le tampon Tris 0,05 M HCl pH 7,6 CaCl₂ 0,004 M. La figure 7, qui représente l'activité collagénolytique (en ordonnées) en fonction de la température (en abscisses), montre qu'à 22°C l'activité callogénolytique est deux fois moins forte qu'à 30°C. A 37°C, l'activité est nettement plus faible qu'à 30°C. Aucune activité n'a pu être notée à 45°C.

EXEMPLE 4-

Influence des métaux lourds et des agents chélatants.

Les ions métalliques et les agents chélatants ont

été testés à trois concentrations 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M. Les activités collagénolytiques ont été mesurées par la méthode de WUNSCH et HEIDRICH et exprimés en % d'activité par rapport à un dosage témoin [HOPPE SEYLER Z.

5 Physiol., (1963) 333 149-151_7.

En ce qui concerne le calcium, l'activité collagénolytique d'un extrait purifié de collagénase est mesurée selon la méthode de WUNSCH et HEIDRICH en utilisant 6 concentrations de chlorure de calcium. Les activités
10 sont exprimées en % par rapport à la valeur maximum trouvée.

Les résultats consignés sur la figure 8, qui est la courbe de l'activité enzymatique en % (en ordonnées) en fonction de la quantité de chlorure de calcium, montrent
15 que le calcium est activateur de la collagénase jusqu'à 5mM. Les plus fortes concentrations utilisées ne semblent exercer aucune action inhibitrice jusqu'à 8mM.

En ce qui concerne les autres cations et les agents chélatants, les résultats sont rassemblés dans les
20 tableaux V et VI ci-après et montrent que les cations divalents Mg^{++} , Ca^{++} sont activateurs (tableau V). Par contre, les ions Pb^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} sont fortement inhibiteurs à 10^{-2} M. A 10^{-3} M les inhibitions exercées par le cuivre, le fer et le plomb sont encore très importantes. Les agents
25 chélatants EDTA, o-phénanthroline, exercent une inhibition totale à 10^{-2} M. La cystéine est faiblement inhibitrice à 10^{-3} M et 10^{-2} M (tableau VI). Les agents bloquants des fonctions thiols sont faiblement inhibiteurs à concentration élevée.

30 EXEMPLE 5-

Application de la collagénase selon l'invention.

Influence de la collagénase sur la stabilité du collagène musculaire.

I. Solubilisation du collagène musculaire extrait

35 On a utilisé comme substrat (S) du collagène intramusculaire extrait de muscle Pectoralis profundus de vache de 12 ans.

On a fait incuber la collagénase (E) (selon l'invention dans des conditions correspondant sensiblement à son optimum d'action, c'est-à-dire à pH 7,4 (tampon Tris HCl 0,02 M, NaCl 0,23 M, CaCl₂ 0,44 g/l); température de 30°C, le rapport E/S (protéines) étant de 1/100.

On a étudié d'une part la cinétique de solubilisation à 30°C et d'autre part l'incidence de la quantité d'enzyme sur la solubilisation en 3 heures à 30°C.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux ci-après:

A-cinétique de la solubilisation à 30°C

	: temps (heures)	: % solubilisation (n=4)	
15	: 0,5	: 6,46 ± 0,95	:
	: 1	: 14,57 ± 1,15	:
	: 2	: 26,44 ± 0,80	:
	: 3	: 38,75 ± 1,08	:
	: 6	: 65,77 ± 1,88	:
	: 16	: 89,47 ± 0,62	:

20

n= nombre d'essais.

Dans les conditions optimales d'action (pH, températures, rapport E/S, il apparaît que l'enzyme solubilise assez rapidement le collagène intramusculaire pourtant très réticulé puisqu'il a été préparé à partir d'un muscle de vache de réforme de 12 ans.

25

B-Incidence de la quantité d'enzyme sur la solubilisation en 3 heures à 30°C.

Dans cet essai, des quantités croissantes de substrat ont été utilisées en présence de 400µg de collagénase selon l'invention.

30

: Rapport E/S	: % solubilisation	
: (protéines)	: (n=4)	
: 1/50	: 40,07 ± 3,55	:
: 1/75	: 37,44 ± 1,30	:
: 1/100	: 34,28 ± 0,72	:
: 1/150	: 26,27 ± 0,49	:
: 1/200	: 21,62 (n= 2)	:

n=nombre d'essais.

La construction de la droite de Lineweaver et Burk
[Biochimie Médicale, Polonovsky (Masson 1967)] permet
d'estimer la vitesse maximale V_m et la constante de
Michaelis K_m :

$$\begin{aligned} V_m &= 1,80 \cdot 10^{-5} \text{ mole/l (en 3 heures à } 30^\circ\text{C)} \\ K_m &= 3,31 \cdot 10^{-5} \text{ mole/l.} \end{aligned}$$

Ces résultats montrent que le collagène musculaire
est solubilisé "in situ" par la collagénase selon l'inven-
tion.

10 II. Influence d'une injection d'enzyme dans le muscle "chaud" sur la solubilisation du collagène.

On a utilisé des morceaux de muscle Pectoralis
profundus de vache de 9 ans (morceaux de 300-400g)

On a injecté à l'aiguille, 1 heure post-mortem, une
15 solution contenant 1 mg de collagénase par ml dans du
tampon pH 7,4 (contenant NaCl et CaCl_2) à raison de 10 mg
d'enzyme pour 100 g de muscle.

Le muscle témoin a reçu une injection de tampon
sans enzyme.

20 Après l'injection, les échantillons ont été
conservés pendant 7 jours à $+10^\circ\text{C}$ pour assurer une
maturation normale.

Après maturation, le muscle a été broyé à la
moulinette et l'extractibilité^{du} collagène a été déterminée
25 à 40°C (tampon pH 7,4; homogénéisation, centrifugation).

Les résultats obtenus sont indiqués ci-après:

Après l'injection de l'enzyme, le pH du muscle se
situait entre 6 et 6,20. En fin de maturation, le pH des
deux séries d'échantillons (muscles témoins et muscles
30 traités) était de l'ordre de 5,60.

: Extractibilité du collagène à		:
: 40°C après 7 jours à $+10^\circ\text{C}$		:
: Témoin (n = 4)	: Traité avec collagénase	:
:	: (n = 4) selon	:
:	: l'invention	:
: $1,11 \pm 0,14(\%)$	: $11,92 \pm 0,57\%$	:

n = nombre d'essais.

Dans les conditions du muscle (pH et température) il semble donc que l'enzyme soit capable, si elle est injectée tôt après l'abattage, de solubiliser significativement une fraction du collagène musculaire ; cette fraction est cependant beaucoup plus faible que dans le cas où on utilise du collagène purifié (dans des conditions optimales de pH et température).

TABLEAU I

Principaux caractères physiologiques et biochimiques de 4 bactéries à Gram négatif, pigmentées en jaune

	Fl.breve	Fl.meningo-septicum	Souche CRZV.1	Fl. lute-scens
Mobilité	-	-	-	-
Pigment	jaune	jaune	jaune	jaune
15 Croissance à 37°C		⊕	⊖	- ou +
Tolérance au NaCl	+	+	+	+
Exigence en NaCl	-	-	-	-
Hydrolyse:				
gélatine	⊖	⊕	⊕	+
caséine	⊖	⊕	⊖	+
20 amidon			-	+
gélose			-	-
cellulose			-	-
chitine			-	-
albumine bovine			-	-
Acide à partir du:				
glucose	+	+	+	+
25 lactose	⊖	⊕	⊖	-
saccharose		-	-	-
maltose	⊕	⊕	⊖	-
Rouge de méthyle	-		-	+
Citrate	-		-	+
30 Indole	⊖	⊕	⊖	-
H ₂ S		V	-	-
Uréase		-	-	-
NO ₃ - NO ₂		-	-	-
Catalase		+	+	+
35 Pathogénicité	⊕	⊕	⊖	-
GC%	26%	36%	65%	65%

V= caractère variable

+ = caractère positif

- = caractère négatif ⊕, ⊖ = caractère différenciant les 4 espèces bactériennes

GC%=pourcentage de guanine et de cytosine du DNA bactérien

TABLEAU II
Oxydation des glucides par la souche CRZV.1

Temps d'incubation en jours		1	7	14	21
Sucres					
5	Inositol	-	-	-	-
	Ribose	-	-	-	+
	Cellobiose	-	-	-	-
	Glycérol	-	-	-	-
	Fructose	-	-	-	-
10	Melibiose	-	-	-	-
	Erythritol	-	-	-	-
	Raffinose	-	-	-	-
	Arabinose	-	-	-	-
	Rhamnose	-	-	-	-
15		+ = Réaction positive			
		- = Réaction négative			

TABLEAU III
Critères biochimiques et physiologiques complémentaires observés sur la souche CRZV.1

20	pH maximum de croissance	pH 11
	pH minimum de croissance	pH 6,0
	Concentration maximale en	
	chlorure de sodium tolérée	10%
	Croissance à + 4°C	+
25	Croissance à + 10°C	+
	Hémolyse	-
	Hydrolyse de la tributyrine	-
	Hydrolyse du Tween 80	-
	Hydrolyse de l'albumine bovine	-
30	Hydrolyse du DNA	+
	Capsule	+
	Oxydase	-

TABLEAU IV
Dégradation des amino-acides par la souche CRZV.1

Amino acides	Temps d'incubation en jours						
	1	2	3	4	5	6	7
Acide aspartique	-	-	-	-	-	-	-
Asparagine	-	-	-	-	-	-	-
Cystine	-	-	-	-	-	-	-
Acide glutamique	-	-	-	-	-	-	-
Glycine	-	-	-	-	-	-	-
Histidine	-	-	-	-	-	-	-
Hydroxyproline	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-
Leucine	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	-	-	-	-
Méthionine	-	-	-	-	-	-	-
Phényl alanine	-	-	-	-	-	-	-
Proline	(+)	+	+	+	+	+	+
Sérine	-	-	-	-	-	-	-
Thréonine	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-
Valine	-	-	-	-	-	-	-

(+) = réaction faiblement positive

+ = réaction positive

- = réaction négative

TABLEAU V

Influence des ions métalliques sur l'activité de la collagénase de Flavobacterium sp. CRZV.1

(les résultats sont exprimés en % d'activité par rapport à un dosage témoin).

5	Cations divalents	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M
	MnCl ₂	120	110	110
	MgCl ₂	100	105	100
10	CoCl ₂	100	105	95
	CuSO ₄	67	33	0
	Pb(CH ₃ -COO) ₂	70	47	6
	FeCl ₃	80	50	0
	CuCl ₂	55	35	0
15	ZnCl ₂	10	0	0
	ZnSO ₄	0	0	0
	Zn(CH ₃ -COO) ₂	10	0	0
	HgCl ₂	90	0	0

20

TABLEAU VI

Influence des agents chélatants et des agents bloquants des fonctions thiols sur la collagénase de Flavobacterium sp. CRZV.1 (les résultats sont exprimés en % d'activité par rapport à un dosage témoin).

25

	Inhibiteurs	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M
	p-chloromercuribenzoate	110	105	104
	Thioglycolate	105	108	106
	Iodoacétate	107	110	103
30	EDTA	40	10	0
	o-phénanthroline	35	5	0
	Cystéine	90	75	67
	Histidine	110	80	60

REVENDEICATIONS

1.A titre de produit nouveau, la collagénase de Flavobacterium spec. CRZV.1 ayant les caractéristiques ci-après:

- poids moléculaire compris entre 83000 et 105000 daltons;
- 5 -pH isoélectrique de 7,9;
- activité collagénolytique optimale à pH 7,6 en tampon Tris 0,05 M HCl CaCl₂ 0,003 M et à la température de 30°C;
- ne possède pas d'activité protéolytique non spécifique et est faiblement inhibée par la cystéine et les agents
- 10 bloquants des fonctions thiol.

2. Procédé pour l'obtention de la collagénase selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste:

- 1) à faire fermenter la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 sur des milieux appropriés pour la croissance de la souche à
- 15 une température comprise entre 15 et 35°C environ, le pH desdits milieux étant compris entre 7 et 9 environ;
- 2) à extraire la collagénase produite par la souche Flavobacterium spec. CRZV.1 des milieux de culture, et
- 3) éventuellement, à purifier la collagénase ainsi recueillie.

20 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les milieux de culture sont à base de collagène ou de substances ayant des séquences protéiques similaires à celle du collagène, et en ce qu'ils contiennent des vitamines nécessaires à la croissance de la souche.

25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les vitamines sont apportées dans le milieu de culture par un extrait de levure.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture contient

30 1 à 25 g par litre de collagène et 0,1 à 25 g par litre d'extrait de levures.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture contient

5 à 25 g par litre d'extrait de viande et 0,1 à 25g par li-

35 tre d'extrait de levures.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que le pH est de 7,6 et la tempé-
rature

re de 30°C.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que la collagénase produite est extraite par précipitation du moût de fermentation à une température
5 comprise entre 0°C et 38°C ,entre 30 et 60% de saturation en sulfate d'ammonium et entre pH 6,0 et pH 8,0 environ après élimination des cellules bactériennes par centrifugation.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que la collagénase est purifiée par chromatographie d'échange d'ions puis par filtration moléculaire.
10

10. Application de la collagénase selon la revendication 1 à l'attendrissement de la viande.

11. Application de la collagénase selon la revendication 1 dans le domaine médical, notamment au traitement des brûlures ,aux
15 transplantations dentaires, à la résorption des hernies discales et pour la dissociation des cellules.

1/3

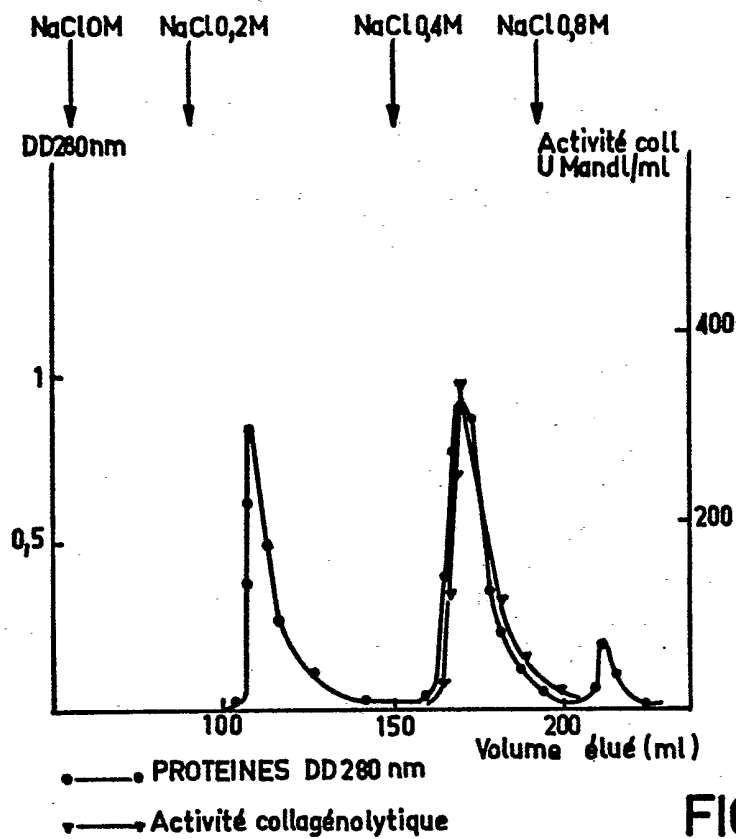


FIG.1

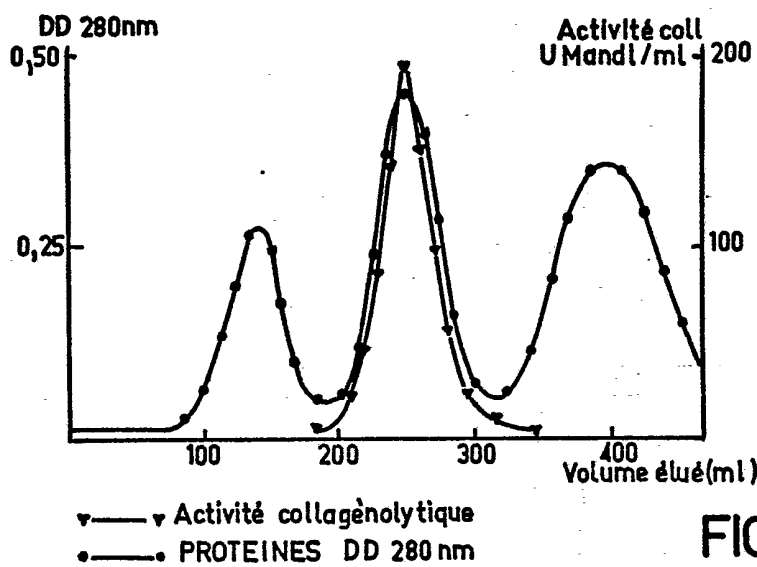


FIG.2

2/3

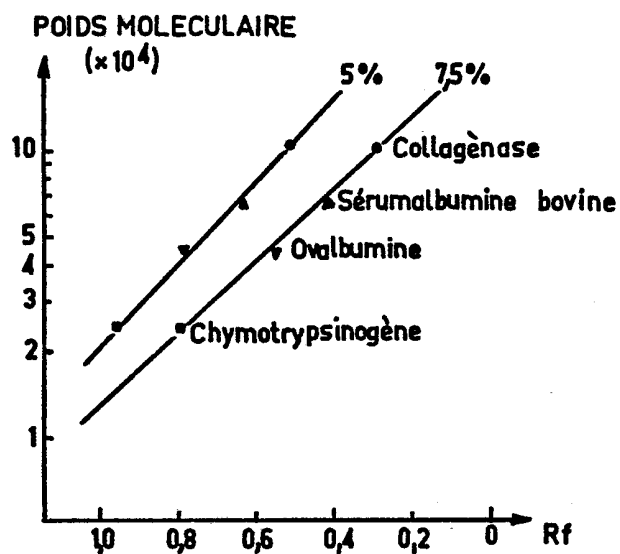


FIG.3

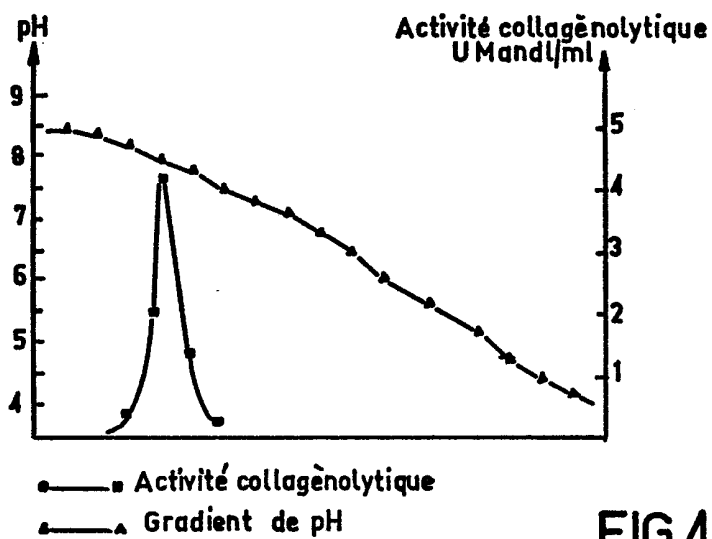


FIG.4

3/3

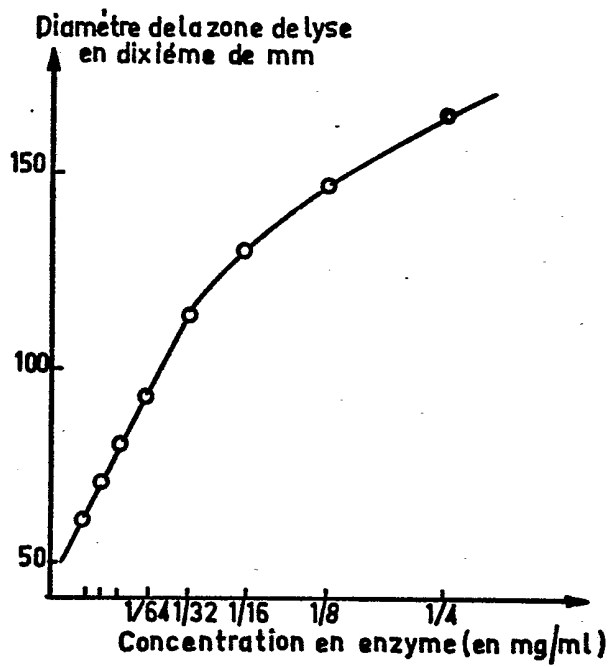


FIG.5

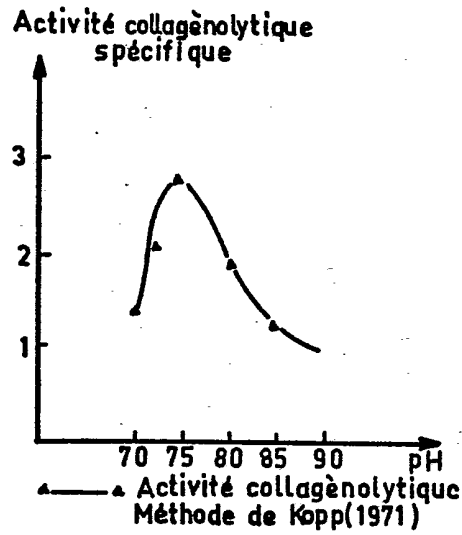


FIG.6

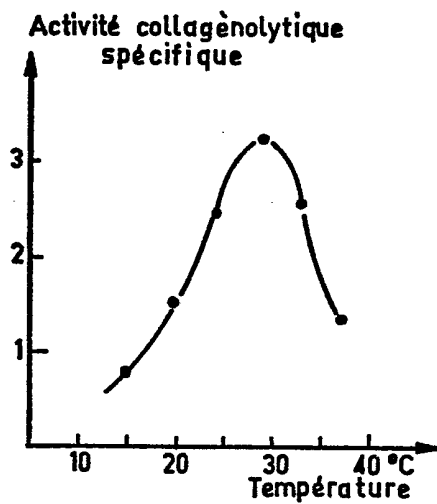


FIG.7

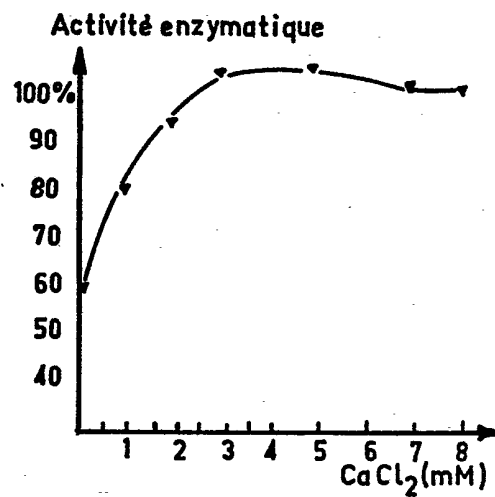


FIG.8