



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



FACULTE DES SCIENCES

UFR Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Biologie – Santé

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1**

en Biologie Structurale Moléculaire et Cellulaire

par **Sophie PAYOT**



ETUDE DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES INFLUANCANT LA  
CROISSANCE, LE CATABOLISME DU CELLOBIOSE ET LA  
SPORULATION DE  
*CLOSTRIDIUM CELLULOLYTICUM* ATCC 35319

Soutenue le 5 novembre 1999 devant la commission d'examen :

### Membres du jury :

<b>Président :</b>	G. BRANLANT	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1
<b>Rapporteurs :</b>	J.P. VANDECASTEELE	Chef de projet à l'Institut Français du Pétrole
	A. KLIER	Professeur, Université Paris VII
	A. DELECLUSE	Chargée de Recherche à l'Institut Pasteur
<b>Examineur :</b>	H. PETITDEMANGE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1

---

**Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram+**  
**Faculté des Sciences, 54500 Vandoeuvre lès Nancy**

*'Comprendre c'est compliquer, c'est enrichir  
en profondeur'* L. Febvre

*A David,*

*A mes parents  
et à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué  
à la réalisation de ce travail, ils se reconnaîtront...*

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Henri Petitdemange pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir dirigé cette thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur J.P. Vandecasteele, chef de projet à l'Institut Français du pétrole et Madame A. Delecluse, Chargée de Recherches à l'Institut Pasteur d'accepter d'être rapporteurs de ce mémoire. J'exprime également toute ma gratitude à Monsieur A. Klier, Professeur à l'Université Paris VII qui a accepté d'être co-rapporteur de cette thèse. Je remercie aussi vivement Monsieur le Professeur Guy Branlant qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse tout particulièrement à Eric Gelhaye et à Catherine Cailliez-Gnimal pour leur contribution à ce travail et pour leur sympathie.

J'associe également à mes remerciements Bruno Charpentier et Sandrine Jacquenet pour leurs précieux conseils en biologie moléculaire et leur disponibilité.

Enfin, mes pensées vont tout particulièrement à mes amis et collègues de laboratoire, en particulier Sophie et Philippe, pour leurs conseils, leur amitié et leur bonne humeur.





# Sommaire

AVANT-PROPOS.....	6
ABREVIATIONS.....	8
<b>CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>11</b>
<b>I. Métabolisme carboné chez les clostridia.</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1. Caractéristiques générales.</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2. Régulation du métabolisme des glucides.</b> .....	<b>13</b>
<b>I.3. Mécanisme et contrôle de l'assimilation des glucides.</b> .....	<b>13</b>
<b>II. L'assimilation de substrats insolubles: l'exemple de la cellulose.</b> .....	<b>13</b>
<b>II.1. Structure de la cellulose.</b> .....	<b>14</b>
<b>II.2. La cellulolyse.</b> .....	<b>15</b>
<b>II.3. Les micro-organismes cellulolytiques.</b> .....	<b>15</b>
<b>II.4. Les cellulases.</b> .....	<b>17</b>
II.4.1. Définition. ....	17
II.4.2. Les systèmes cellulolytiques. ....	19
II.4.3. Le cellulosome de <i>C. cellulolyticum</i> . ....	21
<b>II.5. Cellulose et hémicellulose.</b> .....	<b>24</b>
<b>III. L'assimilation des substrats solubles.</b> .....	<b>25</b>
<b>III.1. Mécanismes et régulation du transport des substrats solubles.</b> .....	<b>25</b>
III.1.1. Systèmes de transport.....	25
✓ Système PTS (système phosphotransférase PEP dépendant).....	25
✓ Système de transport non PTS.....	27
III.1.2. Régulation de l'incorporation des substrats solubles.....	29
III.1.3. Mécanisme de répression catabolique.....	30
<b>III.2. Orientation du flux d'électrons chez les clostridia.</b> .....	<b>32</b>
<b>III.3. Orientation du flux carboné chez les clostridia.</b> .....	<b>34</b>

III.3.1 Régulation du flux de carbone chez <i>C. acetobutylicum</i> (fermentation acétono- butylique). .....	34
III.3.2. Régulation du flux de carbone chez les clostridia producteurs d'éthanol (fermentation alcoolique). .....	36
IV. Facteurs d'adaptation des bactéries à un stress carboné.....	39
<b>IV.1. Bactéries non sporulées. ....</b>	<b>40</b>
<b>IV.2. Bactéries sporulées. ....</b>	<b>44</b>
IV.2.1. Induction de protéines de stress chez <i>Bacillus subtilis</i> : Régulon $\sigma^B$ . .....	44
IV.2.1.1. Protéines de stress de classe I. ....	45
IV.2.1.2. Protéines de stress de classe II: régulon $\sigma^B$ . ....	46
IV.2.1.2.1. Opéron $\sigma^B$ . ....	46
IV.2.1.2.2. Modèle de régulation de $\sigma^B$ . ....	46
IV.2.1.2.3. Gènes contrôlés par $\sigma^B$ : régulon $\sigma^B$ . ....	48
IV.2.1.3. Protéines de stress de classe III. ....	49
IV.2.2. Induction de protéines de stress chez les clostridia .....	49
IV.2.3. Sporulation. ....	50
IV.2.3.1. Déroulement de la sporulation. ....	51
IV.2.3.1.1. Les différentes étapes du processus de sporulation. ....	51
IV.2.3.1.2. Facteurs sigma intervenant dans la sporulation. ....	52
IV.2.3.1.3. Intégration de multiples signaux environnementaux via le système de phosphorelais. ....	54
IV.2.3.1.4. <i>SpoOA~P</i> et déclenchement de la sporulation. ....	56
IV.2.3.1.5. Contrôle de l'activité de $\sigma^F$ . ....	58
IV.2.3.1.6. Contrôle de l'activité de $\sigma^K$ . ....	60
IV.2.3.2. Conditions physiologiques déclenchant la sporulation. ....	61
V. Implication d'une protéine fer-soufre particulière, la rubrédoxine, dans le transport des électrons et la réponse au stress chez les bactéries. ....	62
<b>V.1. Protéines fer-soufre et rubrédoxine. ....</b>	<b>62</b>
<b>V.2. La rubrédoxine: une protéine 'ubiquitaire'.....</b>	<b>62</b>
<b>V.3. Structure de la rubrédoxine. ....</b>	<b>63</b>
V.3.1. Structure primaire de la rubrédoxine.....	63
V.3.2. Structure tridimensionnelle de la rubrédoxine.....	64



V.4. Rôle de la rubrédoxine.....	65
VI. Approche du travail. ....	66
<u>CHAPITRE 2. ETUDE DU CATABOLISME DU CELLOBIOSE PAR <i>CLOSTRIDIUM CELLULOLYTICUM</i> CULTIVE SUR MILIEU COMPLEXE EN CULTURE CONTINUE.....</u>	<u>68</u>
I. Introduction.....	68
II. Résultats. ....	68
<hr/>	
<b>Article n°1:</b> Metabolism of cellobiose by <i>Clostridium cellulolyticum</i> growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. S. Payot, E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye, H. Petitdemange. Microbiology. 1998. 144: 375-384.	
<hr/>	
III. Conclusion.....	80
<u>CHAPITRE 3. APPORT D'UN MILIEU SYNTHETIQUE CONCERNANT LES FLUX DE CARBONE ET D'ELECTRONS CHEZ <i>C. CELLULOLYTICUM</i> CULTIVE EN CULTURE CONTINUE.....</u>	<u>82</u>
I. Introduction.....	82
II. Résultats. ....	82
<hr/>	
<b>Article n°2:</b> Carbon and electron flow in <i>Clostridium cellulolyticum</i> grown in chemostat culture on synthetic medium. E. Guedon, S. Payot, M. Desvaux, H. Petitdemange. Journal of Bacteriology. 1999. 181: 3262-3269.	
<hr/>	
III. Conclusion.....	91
<u>CHAPITRE 4. ANALYSE DU PROCESSUS D'INHIBITION DE CROISSANCE ET DE SA LEVEE LORS DE CULTURES EN BATCH DE <i>C. CELLULOLYTICUM</i> SUR MILIEU COMPLEXE. ....</u>	<u>93</u>
I. Introduction.....	93
II. Résultats. ....	93

---

**Article n°3:** Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose. S. Payot, E. Guedon, E. Gelhaye, H. Petitdemange. Research in Microbiology. 1999. 150: 465-473.

---

III. Conclusion..... 103

**CHAPITRE 5. EFFET DE LA VITESSE DE CROISSANCE ET DE LA DISPONIBILITE EN CELLOBIOSE ET EN AMMONIUM SUR LA SPORULATION DE *C. CELLULOLYTICUM*.** ..... 105

I. Introduction..... 105

II. Résultats. .... 106

---

**Article n°4:** Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation. S. Payot, E. Guedon, M. Desvaux, E. Gelhaye and E. Petitdemange. Applied Microbiology and Biotechnology. 1999. *In press*.

---

III. Conclusion..... 119

**CHAPITRE 6: CLONAGE, SEQUENCAGE ET CARACTERISATION DE LA REGION PROMOTRICE DU GENE DE LA RUBREDOXINE CHEZ *C. CELLULOLYTICUM* ET DETERMINATION DE LA TENEUR DES CELLULES EN RUBREDOXINE DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE STRESS.** ..... 121

I. Introduction..... 121

II. Résultats. .... 122

**II.1. Mise au point des conditions de stress chez *C. cellulolyticum*.** .....122

**II.2. Caractérisation du gène de la rubrédoxine chez *C. cellulolyticum* et détermination de la teneur en rubrédoxine dans différentes conditions de stress.** .....126

---

**Article n°5:** Cloning, sequencing and promoter characterisation of the rubredoxin gene of *Clostridium cellulolyticum* and examination of the rubredoxin cell content in different stress conditions. S. Payot, P. Gérard, C. Cailliez-Grimal, H. Petitdemange. Article soumis au journal 'Research in Microbiology'.

---

III. Conclusion.....	145
<u>CHAPITRE 7. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u> .....	148
BIBLIOGRAPHIE.....	154



# Avant-Propos



## AVANT-PROPOS

En cette fin de siècle et de millénaire, face aux problèmes touchant à l'environnement, on assiste à la montée d'une prise de conscience 'citoyenne' d'une bonne partie de la population, dans les actes de la vie quotidienne. Les résultats d'une enquête montrent que les Français sont convaincus des risques que la pollution atmosphérique fait peser sur leur santé. Un Français sur deux est prêt à renoncer à prendre son véhicule les jours de forte pollution, à s'impliquer dans une meilleure gestion des déchets et à consommer des produits plus biologiques (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (Ademe, 1998)).

En 1995, la production de déchets (municipaux, industriels et agricoles) est estimée en France à 600 millions de tonnes par an, dont 26 millions correspondant aux déchets ménagers (soit 434 kg/habitant/an). Ces déchets ménagers sont constitués pour moitié de déchets putrescibles et de papiers cartons qui peuvent être valorisés (Miquel, 1999).

En France, cependant, en 1995, près de la moitié des ordures ménagères a été stockée dans des décharges et 40 % incinérés, entraînant nuisances et pollution. Seuls 12 % de ces déchets ont été recyclés en France, contre 43 % aux Pays-Bas ou 39 % en Suisse (Miquel, 1999).

L'une des voies de valorisation des déchets organiques (fraction organique des ordures ménagères, effluents d'élevages, déchets industriels et agroalimentaires) est la méthanisation, c'est-à-dire la production industrielle de biogaz.

Le biogaz, valorisable en tant que source d'énergie, est un gaz combustible, mélange de méthane (65 %) et de gaz carbonique (35 %), provenant de la dégradation de matières organiques mortes (végétales ou animales) dans un milieu anoxique (La Farge, 1995). Le gisement de biogaz en France est estimé à 3,25 Mtep (tonne équivalent pétrole)/an, ce qui équivaut à 11 % de la consommation nationale en gaz naturel et constitue un gisement d'énergie important, jusque-là presque totalement inexploité (Miquel, 1999).

La production industrielle de biogaz consiste à stocker la matière organique dans une cuve hermétique ou 'digesteur', dans laquelle les déchets organiques sont soumis à l'action de micro-organismes. L'étape limitante de ce procédé est l'étape initiale d'hydrolyse des macromolécules organiques en composés plus simples. L'amélioration de ce processus passe donc par une optimisation de cette étape d'hydrolyse, en particulier d'un composé majeur des déchets, la cellulose (cellulolyse).

L'optimisation de la cellulolyse ne peut se concevoir sans une connaissance approfondie des micro-organismes responsables de cette fermentation, les micro-organismes cellulolytiques. Nous avons donc entrepris d'analyser le métabolisme d'un de ces micro-organismes cellulolytiques, *Clostridium cellulolyticum*, ainsi que les conditions influant sur son métabolisme. L'essentiel de notre étude repose sur des cultures effectuées en chemostat puisque la majorité des digesteurs fonctionnent en continu (La Farge, 1995). Avant d'exposer et de discuter nos résultats expérimentaux, nous ferons le bilan des caractéristiques et des études ayant porté sur les bactéries cellulolytiques.



## Abréviations

## ABREVIATIONS

**A:** Absorbance

**(Acétyl-)CoA:** (Acétyl)-coenzyme A

**Acétyl-P:** Acétyl-phosphate

**ADN/ARN:** Acide désoxyribonucléique/Acide ribonucléique

**ADP/ATP:** Adénosine di ou triphosphate

**AMPc:** Adénosine monophosphate cyclique

**Aro:** acide aminé aromatique

**ATC:** anticorps

**ATCC:** 'American Type Culture Collection'

**Bet:** Bromure d'Ethidium

**CBD:** Domaine de fixation à la cellulose ('Cellulose Binding Domain')

**Ccp:** Protéine de contrôle catabolique ('Catabolite Control Protein')

**CD/DD:** Domaine de cohésion/d'ancrage ('Cohesin'/'Dockerin Domain')

**CFU:** Colonie Formant Unité

**Cip:** 'Cellulose Integrating Protein'

**CIRCE:** Répétition inversée contrôlant l'expression des protéines chaperons ('Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression')

**CMC/ CMC<sub>case</sub>:** Carboxy-méthyl-cellulose/ Carboxy-méthyl-cellulase

**CO:** Monoxyde de carbone

**CO<sub>2</sub>:** Dioxyde de carbone

**CRE:** Element de réponse catabolique ('Catabolite Response Element')

**CRP:** Protéine réceptrice impliquée dans la répression catabolique ('Catabolite receptor protein')

**CSPD:** Disodium 3-(4-methoxyspiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decane)-4-yl)phenyl phosphate

**DEAE:** DiEthylAminoEthyl

**(d)dNTP:** (di)désoxynucléoside triphosphate

**Dig:** Digoxygénine

**DO:** Densité optique

**DTT:** Dithiothréitol

**EC:** Classification enzymatique ('Enzyme classification')



**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra Acétate  
**fd:** ferrédoxine  
**FDP:** fructose diphosphate  
**FNR:** Fumarate nitrate réductase  
**GAPDH:** Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**Gpp:** pppGpp 5'-phosphohydrolase  
**GT:** Giga tonne  
**GTPase:** Guanosine triphosphate hydrolase  
**Ho:** acide aminé hydrophobe  
**HrcA:** régulation thermique au niveau de l'élément CIRCE ('Heat Regulation at CIRCE')  
**HSP/GSP:** Protéines de choc thermique ou protéines de stress générales ('Heat Shock Proteins'/'General Stress Proteins')  
**IPTG:** Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside  
**IR:** séquence répétée inversée ('Inverted Repeat')  
**kb:** kilobase  
**kDa:** kilodalton  
**LB:** milieu de Luria Bertani  
**Mb:** Metmyoglobine  
**NAD(H):** Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit)  
**Ndk:** Nucléosie diphosphate kinase  
**NRO:** NADH rubrédoxine oxydoréductase  
**ORF:** cadre ouvert de lecture ('Open Reading Frame')  
**PAGE:** Electrophorèse en gel de polyacrylamide ('PolyAcrylamide Gel Electrophoresis')  
**PCR:** Réaction de polymérisation en chaîne ('Polymerase Chain Reaction')  
**PEP:** Phosphoénolpyruvate  
**PMSF:** Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride  
**(p)ppGpp:** Guanosine penta ou tétraphosphate  
**PTS:** système à phosphotransférase  
**p/v:** poids/volume  
**Qsp:** Quantité suffisante pour  
**Rd:** Rubrédoxine  
**RNase:** Ribonucléase  
**r.p.m:** Rotation Par Minute  
**rsb:** régulateur du facteur sigma B ('regulator of sigma B')

**SAB:** Sérum Albumine Bovine

**SDS:** Sodium Dodécyl Sulfate

**SSC:** Solution Saline de Citrate de sodium

**TBE:** Tampon Tris-Borate EDTA

**TE:** Tampon Tris-EDTA

**TEMED:** N-N-N'-N'-tétraméthylènediamine

**U:** Unité (enzymatique)

**UV:** UltraViolet

**X-Gal:** 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside



Revue Bibliographique



## CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Métabolisme carboné chez les clostridia.

#### I.1. Caractéristiques générales.

Les clostridia représentent un groupe très diversifié de bactéries sporulées, anaérobies strictes et à Gram positif.

En tant que chimiohétérotrophes, les clostridia 'saccharolytiques' tirent leur énergie et les précurseurs biosynthétiques de la dégradation de substrats carbonés. L'adénosine triphosphate (ATP) est produit par phosphorylation au niveau du substrat et la majeure partie du carbone métabolisé est libérée sous forme de produits de fermentation terminaux (Tableau I). La quantité et la gamme de produits sont influencées par les conditions de culture (Mitchell, 1998).

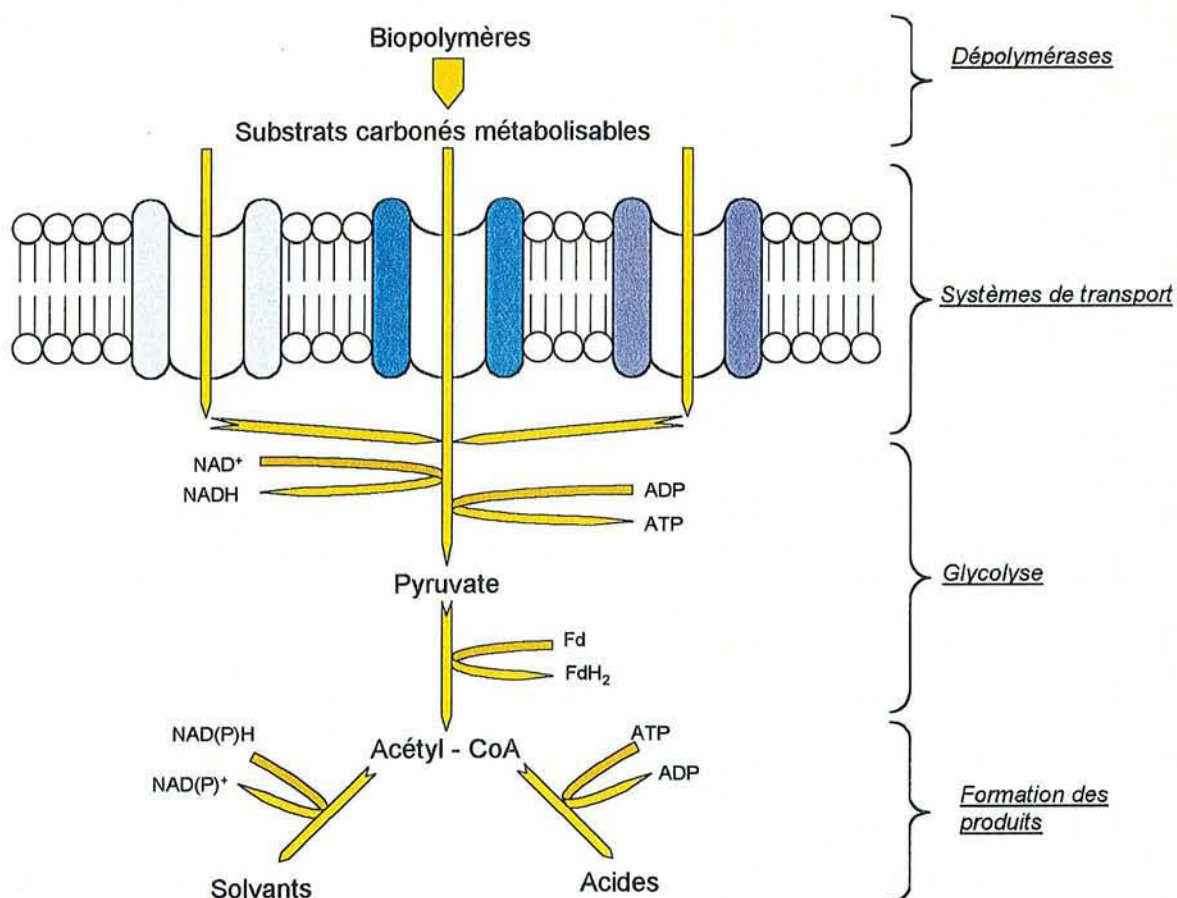
**Tableau I : Profils de fermentation chez les *clostridia* (d'après Mitchell, 1998).**

Micro-organisme	Reclassifié	Substrats	Produits
<i>C. acetobutylicum</i> dont <i>C. acetobutylicum</i> NCIMB 8052	<i>C. beijerinckii</i>	Amidon, oses	Acétone, butanol, isopropanol, acétate, butyrate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<i>C. thermocellum</i>		Cellulose, oses	Ethanol, acétate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<i>C. thermohydro- sulfuricum</i>	<i>T. ethanolicus</i> <sup>a</sup> <i>T. thermohydrosulfuricus</i> <sup>b</sup>	Amidon, oses	Ethanol, acétate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<i>C. thermosaccharo- lyticum</i>	<i>T. thermosulfurigenes</i>	Amidon, oses	Ethanol, acétate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<i>C. butyricum</i>		Amidon, oses	Acétate, butyrate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> (1,3-propanediol)
<i>C. pasteurianum</i>		Oses	Acétate, butyrate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> (butanol)

<sup>a</sup> Souche 39E reclassifiée en *Thermoanaerobacter ethanolicus*;

<sup>b</sup> Souche E100-69 reclassifiée en *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*.

Les clostridia peuvent fermenter une large gamme de substrats. Des polymères tels que l'amidon, la cellulose et l'hémicellulose sont dégradés par des dépolymérase pour produire des composés de faible poids moléculaire qui sont assimilés par les cellules. Ces derniers, ainsi que d'autres composés solubles, sont incorporés dans la cellule par des systèmes de transport spécifiques liés à la membrane et sont dégradés par des enzymes cytoplasmiques. La voie principale servant à dégrader les hexoses est la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas conduisant à la production de pyruvate avec formation de 2 molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et 2 molécules d'adénine triphosphate par hexose métabolisé. Le pyruvate est oxydé par une pyruvate-ferrédoxine (fd)-oxydoréductase pour former de l'acétyl-CoA et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) avec transfert d'électrons à un transporteur: la ferrédoxine (fd). L'acétyl-CoA est alors métabolisé par une série de voies caractéristiques de chaque micro-organisme (Figure 1) (Mitchell, 1998).



**Figure 1:** Schéma général du métabolisme de conversion de substrats carbonés en solvants et en acides chez les clostridia (d'après Mitchell, 1998).

Il existe une interaction critique entre les voies conduisant les flux de carbone et d'électrons. Une altération du flux d'électrons peut avoir un effet important sur la nature des produits de fermentation terminaux (Girbal *et al.*, 1995a; Mitchell, 1998; Rogers, 1986; Rogers and Gottschalk, 1993).

### **I.2. Régulation du métabolisme des glucides.**

Il existe deux points de branchement majeurs dans le schéma catabolique des clostridia: au niveau de l'assimilation des sources de carbone et au niveau du métabolisme de l'acétyl-CoA (Figure 1). En contrôlant la synthèse et l'activité des enzymes-clés à ces points de branchement, la cellule peut répondre à son environnement d'une façon appropriée.

La régulation de l'assimilation du substrat détermine la forme sous laquelle la matière première va entrer dans la voie métabolique, ce qui peut influencer la nature et la quantité des produits formés. Le contrôle du métabolisme de l'acétyl-CoA influence clairement la formation des produits terminaux (Mitchell, 1998).

### **I.3. Mécanisme et contrôle de l'assimilation des glucides.**

Les clostridia 'saccharolytiques' sont généralement capables de métaboliser une variété de substrats allant de monomères à des composés de degré de polymérisation plus élevé (5 à 6 résidus).

Les clostridia comme les autres bactéries répondent à leur environnement en modifiant la gamme et la quantité des activités enzymatiques permettant de mobiliser des substrats carbonés potentiels. Des stratégies de régulation métabolique similaires à celles décrites chez d'autres bactéries doivent exister, c'est-à-dire induction et répression de la synthèse d'enzymes et régulation directe de l'activité enzymatique (Mitchell, 1998).

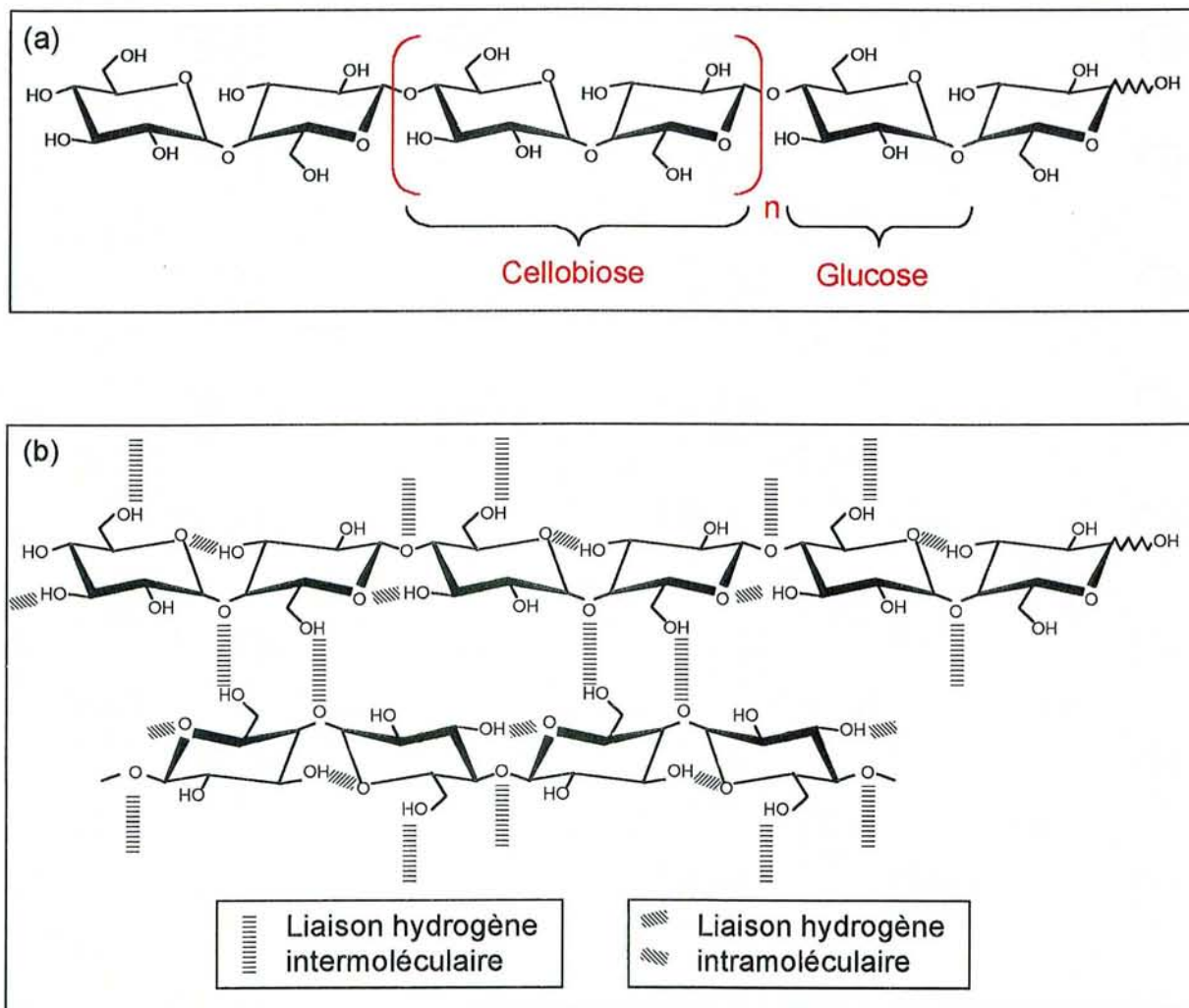
## **II. L'assimilation de substrats insolubles: l'exemple de la cellulose.**

La cellulose est le composé organique le plus abondant sur la terre. En effet, l'accumulation de déchets cellulosiques dans le sol et les sédiments est estimée à 700 GT (Béguin and Aubert, 1992). L'étude de sa dégradation par les micro-organismes présente un intérêt fondamental (aussi bien pour les enzymologistes, les microbiologistes, les écologistes que les généticiens) mais aussi appliqué: secteur agroalimentaire (brasserie, alimentation animale, ...), environnement (recyclage des déchets cellulosiques) (Béguin and Aubert, 1992; 1994).

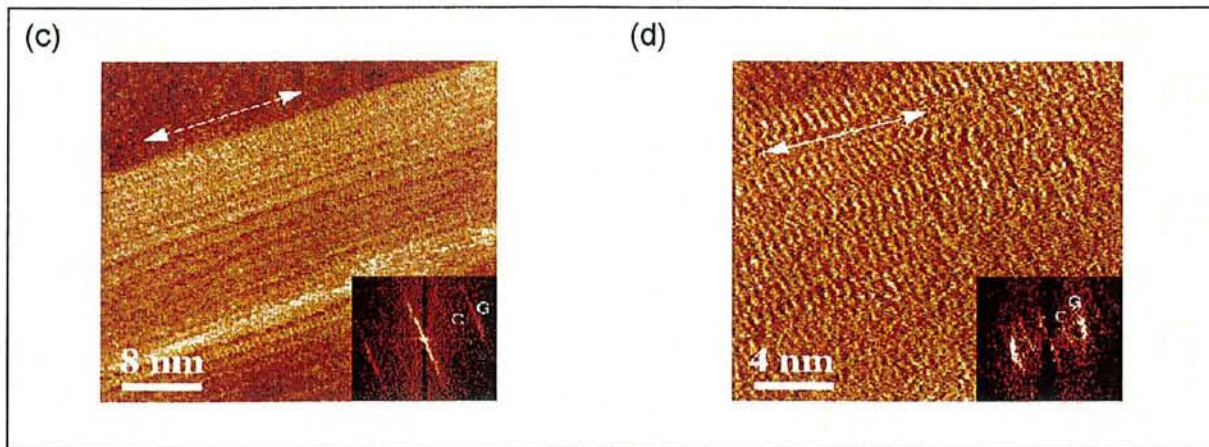


## II.1. Structure de la cellulose.

La cellulose est un polymère linéaire de sous-unités D-anhydroglycopyranosyles reliées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4. Le motif répété de base est le cellobiose (Figure 2a). Les chaînes linéaires sont regroupées en microfibrilles, elles-même regroupées en fibrilles. De nombreuses liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes assurent la cohésion de l'ensemble qui présente des domaines cristallins séparés par des régions amorphes (Baker *et al.*, 1997; O'Sullivan, 1997)(Figure 2b). Une analyse très fine de la structure d'une cellulose native (de l'algue verte *Valonia*) a été récemment obtenue par une technique de pointe (microscopie de force atomique à haute résolution) (Baker *et al.*, 1997)(Figure 2c, 2d).



**Figure 2:** Structure de la cellulose. (a) Structure primaire (enchaînement d'unités cellobiose); (b) liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes assurant la cohésion de la cellulose.



**Figure 2 (tiré de Baker *et al.*, 1997)(suite) :**

(c) analyse par microscopie de force atomique à haute résolution de la cellulose native de *Valonia*.

(d) agrandissement montrant l'espacement entre les unités glucose; les flèches indiquent la direction de la chaîne cellulosique dans l'axe de la microfibrille .

## II.2. La cellulolyse.

La cellulolyse est l'hydrolyse microbienne de la cellulose en molécules de plus petite taille telles que les cellodextrines, le cellobiose et le glucose.

## II.3. Les micro-organismes cellulolytiques.

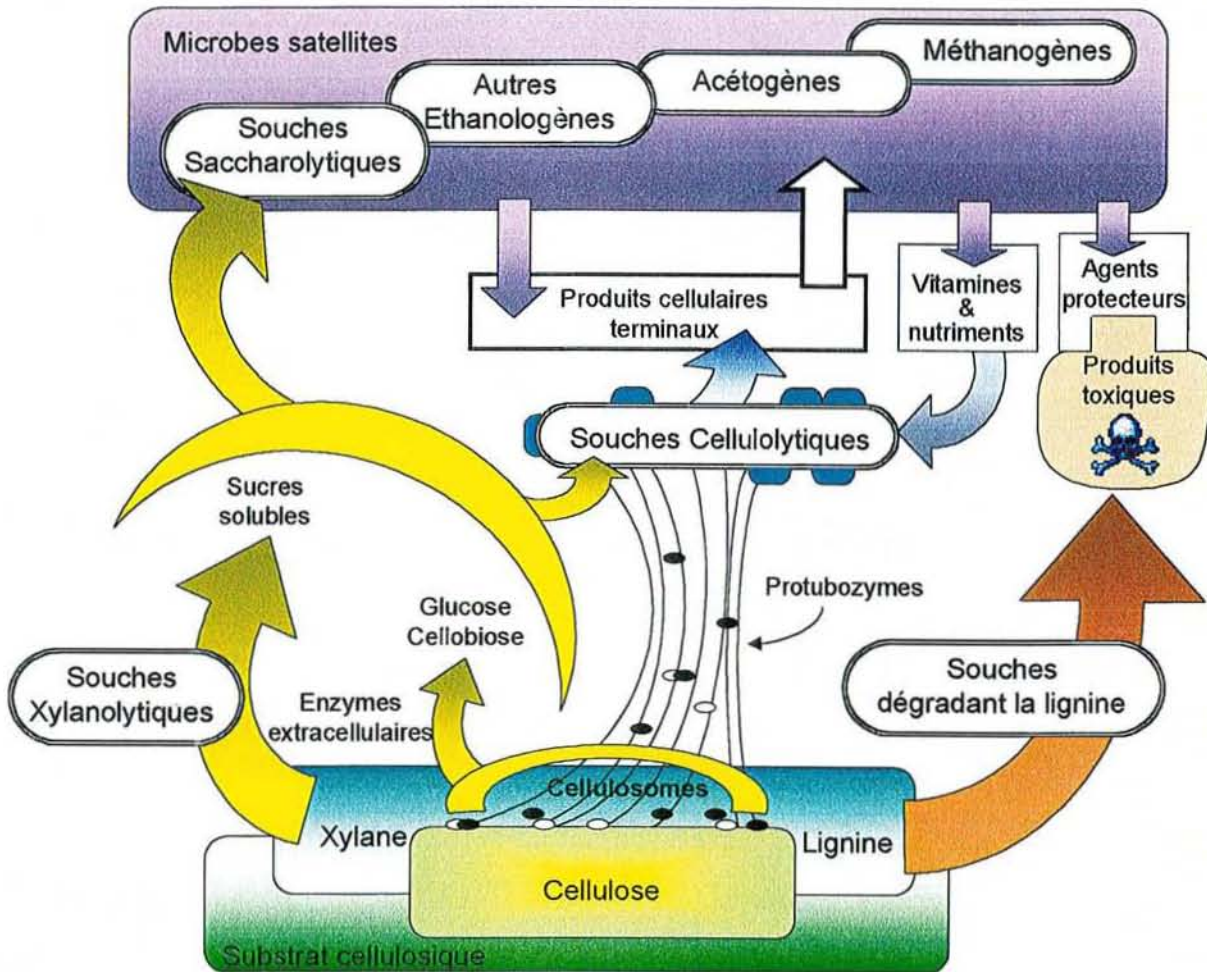
Dans les niches écologiques naturelles (fumiers, boues, ...), champignons et bactéries sont souvent associés en populations mixtes comprenant des espèces cellulolytiques et non cellulolytiques agissant en synergie (Béguin and Aubert, 1992; 1994).

Plusieurs catégories de micro-organismes participent au processus de dégradation biologique de la cellulose (Figure 3) (Bayer *et al.*, 1996; Béguin and Aubert, 1992; 1994 ; Quesnel, 1982):

- ✓ Les cellulolytiques fermentaires, qui hydrolysent la cellulose et produisent à partir des oses formés (en majorité du cellobiose et des cellodextrines) de l'acétate, du formiate, du lactate, de l'éthanol, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène.
- ✓ Les saprophytes non cellulolytiques, qui libèrent divers produits de fermentation, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène à partir de l'excès d'oses solubles.
- ✓ Les micro-organismes acétogènes, qui forment de l'acétate à partir du dioxyde de carbone et de l'hydrogène.



✓ Les micro-organismes méthanogènes, qui transforment l'acétate, le formiate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène en méthane.



**Figure 3:** Représentation schématique de l'écosystème cellulosique (Bayer *et al.*, 1996)

Les micro-organismes cellulolytiques, qui interviennent au niveau de la première étape du processus (qui s'avère être l'étape limitante), constituent un large groupe très disparate comprenant des champignons et des bactéries pouvant être aérobies ou anaérobies, thermophiles ou mésophiles. On distingue, chez les bactéries, les cellulolytiques vrais des pseudocellulolytiques selon la capacité du micro-organisme à sécréter ou non toutes les enzymes nécessaires à l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Béguin and Aubert, 1992; 1994).

## II.4. Les cellulases.

### II.4.1. Définition.

On désigne sous le terme de cellulases une large classe d'enzymes capables d'hydrolyser à différents degrés divers substrats cellulotiques et apparentés contenant des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 (Béguin and Aubert, 1992; 1994; Tomme *et al.*, 1995).

On distingue:

- ✓ Les endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucane glucohydrolases, EC 3.2.1.4): Elles procèdent par hydrolyse aléatoire à l'intérieur des chaînes de cellulose. Elles ne sont généralement pas actives sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC), forme soluble de la cellulose. On les appelle également CMCase.
- ✓ Les exoglucanases: Elles catalysent le clivage successif de sous-unités glucose (glucohydrolase ou 1,4- $\beta$ -D-glucosidase, EC 3.2.1.74) ou cellobiose (cellobiohydrolase ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes cellulotiques.
- ✓ Les  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21): Elles libèrent du glucose à partir de l'extrémité non réductrice de  $\beta$ -glucosides de petite taille (cellobiose, cellodextrines).
- ✓ Les phosphorylases: le cellobiose (cellobiose-orthophosphate- $\alpha$ -D-glucosyl transférase, EC 2.4.1.20) et les cellodextrines (1,4- $\beta$ -oligoglucano-orthophosphate-glucosyl transférase, EC 2.4.1.49) peuvent être clivés par phosphoryse permettant à la bactérie d'économiser une molécule d'ATP par mole de cellobiose par rapport à la voie hydrolytique.

Les cellulases sont des enzymes composées d'unités structurales et fonctionnelles appelées domaines ou modules. Elles sont classées en différentes familles selon la séquence en acides aminés de leur domaine catalytique. Certaines familles forment un clan puisque, malgré des différences de séquence, les membres de ces familles ont un repliement similaire et la position des résidus catalytiques est conservée (Tableau II) (Bayer *et al.*, 1998).



**Tableau II : Classification des domaines catalytiques des cellulases (et des enzymes qui leur sont apparentées) et motif de repliement correspondant (d'après Bayer *et al.*, 1998).**

Motif de repliement	Clan	Famille	Classification précédente	Type d'enzyme (spécificité de substrat)	Distribution taxonomique	Nombre d'enzymes
<b>Structures ayant été déterminées et réparties en différents clans:</b>						
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH <sup>a</sup> -A	1	-	$\beta$ -glucosidases et glycosyl hydrolases apparentées essentiellement	Très large : bactéries et champignons, plantes et animaux	71
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	5	Famille A (5 sous-familles)	Endoglucanases essentiellement	Bactéries et champignons	119
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	10	Famille F	Xylanases essentiellement	Bactéries et champignons	59
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	17	-	$\beta$ -glucosidases, endo-1,3- $\beta$ -glucosidases et lichenases	Champignons et plantes	59
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	26	Famille I	Endo-1,4- $\beta$ -mannosidases essentiellement	Bactéries	14
( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	39	-	$\beta$ -xylosidases	Bactéries	7
Tonneau $\beta$	GH-B	7	Famille C	Endoglucanases et cellobiohydrolases	Champignons	17
Tonneau $\beta$	GH-B	16	-	$\beta$ -glucanases essentiellement	Bactéries	71
Tonneau $\beta$	GH-C	11	Famille G	Xylanases essentiellement	Bactéries et champignons	65
Tonneau $\beta$	GH-C	12	Famille H	Endoglucanases	Bactéries et champignons	14
<b>Structures déterminées mais clans non établis:</b>						
Feuillet ( $\beta/\alpha$ ) distordu	-	6	Famille B	Endoglucanases et cellobiohydrolases	Bactéries et champignons	18
( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	-	8	Famille D	Endoglucanases essentiellement	Bactéries	10
( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	-	9	Famille E (2 sous-familles)	Endoglucanases essentiellement	Bactéries et champignons	45
Feuillet $\beta$	-	45	Famille K	Endoglucanases	Bactéries et champignons	5
( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	-	48	Famille L	Endoglucanases processives et/ou cellobiohydrolases	Bactéries	6

<sup>a</sup>GH: Glycosyl Hydrolase

Motif de repliement	Clan	Famille	Classification précédente	Type d'enzyme (spécificité de substrat)	Distribution taxonomique	Nombre d'enzymes
<b>Structures non déterminées:</b>						
-	-	3	-	$\beta$ -glucosidases essentiellement	Bactéries et champignons	58
-	-	44	Famille J	Endoglucanases	Bactéries	5
-	-	51	-	Endoglucanases et arabinofuranosidases	Bactéries et champignons	9
-	-	52	-	$\beta$ -xylosidases	Bactéries	2
-	-	55	-	Exo et endo-1,3-glucanases	Champignons	2
-	-	61	-	Endoglucanases	Champignons	1

#### II.4.2. Les systèmes cellulolytiques.

L'insolubilité de la cellulose exige que les cellulases soient sécrétées dans le milieu ou exposées à la surface de la cellule. Tous les systèmes cellulolytiques efficaces sur la cellulose cristalline mettent en jeu plusieurs enzymes de spécificité différente, organisées ou non en complexes protéiques structurés.

Deux types d'organisation sont bien connus (Béguin and Aubert, 1992; 1994; Leschine, 1995, Tomme *et al.*, 1995 pour revues):

✓ Chez les champignons cellulolytiques, dont le genre *Trichoderma* (Teeri *et al.*, 1991), des endo et des exoglucanases sont sécrétées de façon non associée et agissent en synergie. Plusieurs bactéries procèdent de façon similaire: *Clostridium fimi* (Gilkes *et al.*, 1984; Meinke *et al.*, 1994), *Clostridium stercorarium* (Bronnenmeier *et al.*, 1991; Creuzet *et al.*, 1983), *Microbispora bispora* (Yablonsky *et al.*, 1988), ...

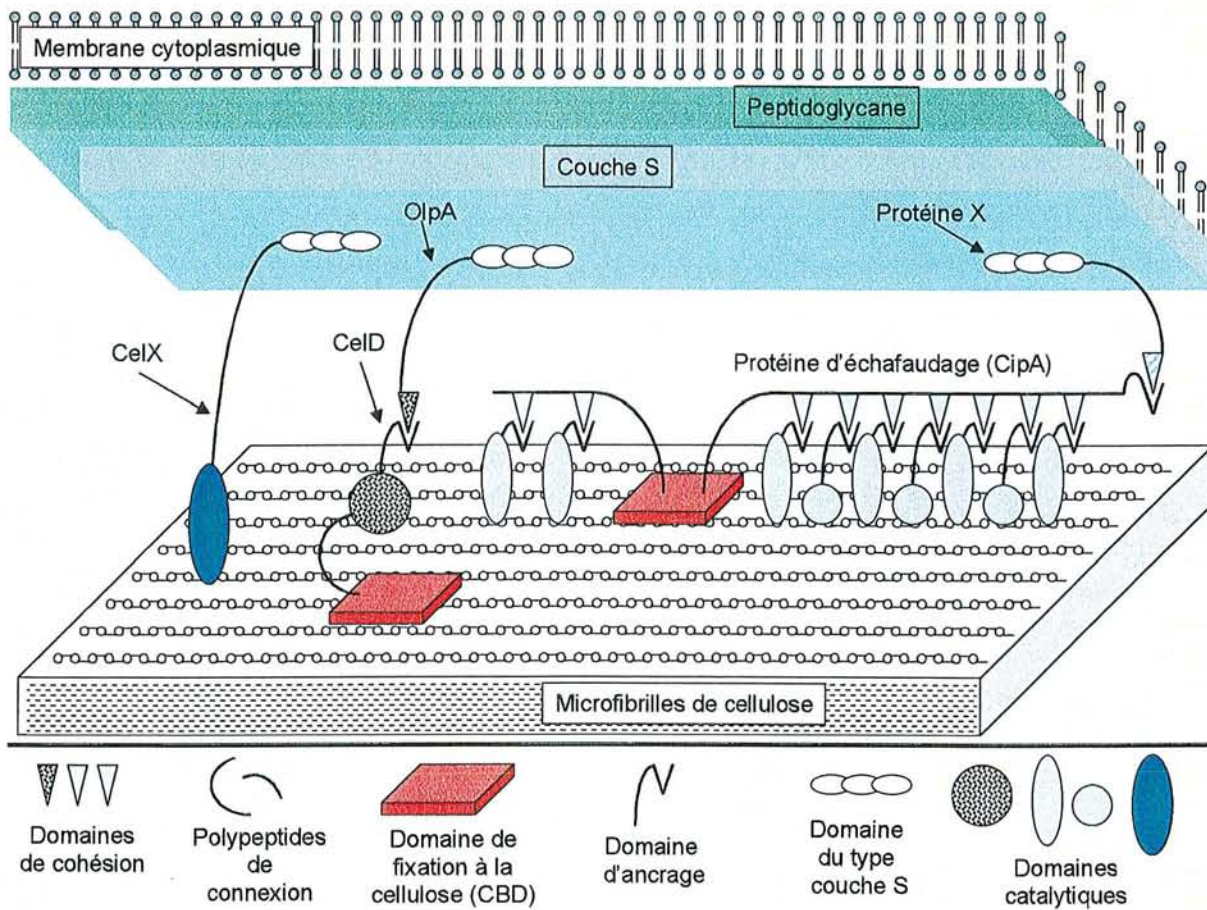
✓ Les cellulases de *Clostridium thermocellum* sont regroupées au sein d'un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire appelé cellulosome. Le cellulosome est présent à la fois à l'état soluble dans le milieu et associé à la surface des cellules sous forme de protubérances polycellulosomales regroupant une ou plusieurs centaines de cellulosomes. Ces protubérances permettent aux bactéries de s'attacher à la cellulose (Bayer and Lamed, 1986; Mayer *et al.*, 1987; Wiegel and Dykstra, 1984).

Des complexes de haut poids moléculaire liés à la surface des cellules ont été décrits chez d'autres bactéries anaérobies cellulolytiques: *Clostridium cellulovorans* (Shoseyov and Doi, 1990), *C. papyrosolvans* C7 (Cavedon *et al.*, 1990), *C. cellulolyticum* (Madarro *et al.*, 1991), *Ruminococcus albus* (Wood *et al.*, 1982), *Fibrobacter succinogenes* (Groleau and

Forsberg, 1981), *Bacteroides cellulosolvens* (Lamed *et al.*, 1991) et *Acetivibrio* (MacKenzie *et al.*, 1985).

Les cellulases associées au cellulosome possèdent un domaine particulier, appelé 'domaine d'ancrage' ('dockerin domain'), qui interagit avec un domaine de cohésion ('cohesin domain') présent sur une protéine dite d'«échafaudage» dépourvue d'activité catalytique ('scaffolding protein') (Bayer *et al.*, 1998) (Figure 4). Cette protéine d'«échafaudage» (CipA chez *C. thermocellum* et CbpA chez *C. cellulovorans*) possède un domaine N terminal particulier appelé 'CBD' ('Cellulose Binding Domain') nécessaire à la fixation du cellulosome sur la cellulose (Bayer *et al.*, 1998; Béguin and Aubert, 1994; Tomme *et al.*, 1995)(Figure 4). Contrairement à CipA de *C. thermocellum*, CbpA de *C. cellulovorans* possède quatre domaines hydrophiles et ne possède pas de domaine d'ancrage C terminal (Doi *et al.*, 1994). Ces domaines hydrophiles joueraient le même rôle que l'association domaine d'ancrage C terminal de CipA/domaine de cohésion d'une protéine de surface cellulaire (protéine X: OlpB, SdbA ou ORF2p) chez *C. thermocellum* (Leibovitz and Béguin, 1996; Leibovitz *et al.*, 1997; Fujino *et al.*, 1993; Lemaire *et al.*, 1995) (Figure 4). Ces domaines hydrophiles, qui possèdent une homologie avec des protéines de la couche S de certains micro-organismes, permettraient d'assurer la fixation du cellulosome à la surface cellulaire (Tamaru and Doi, 1999).





**Figure 4:** Modèle hypothétique d'organisation du cellulosome de *Clostridium thermocellum* (d'après Tomme *et al.*, 1995).

#### II.4.3. Le cellulosome de *C. cellulolyticum*.

Comme *C. thermocellum* et *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* dégrade la cellulose grâce à un complexe extracellulaire multiprotéique, le cellulosome, de masse moléculaire d'environ 600 kDa (Bélaïch *et al.*, 1997; Gal *et al.*, 1997; Madarro *et al.*, 1991). Chez *C. cellulolyticum*, treize cellulases ont été identifiées ainsi qu'une protéine d'«échafaudage» de 160 kDa dépourvue d'activité catalytique appelée CipC (pour 'cellulosome-integrating protein') (Gal *et al.*, 1997). Les gènes correspondant à 8 cellulases ont été séquencés chez *C. cellulolyticum* (celA, C, D, E, F, G, H, I) (Tableau III) (Bagnara-Tardif *et al.*, 1992; Faure *et al.*, 1988; Faure *et al.*, 1989; Gal *et al.*, 1997; Reverbel-Leroy *et al.*, 1996, Shima *et al.*, 1991).

**Tableau III:** Descriptif des cellulases de *Clostridium cellulolyticum* (d'après Bélaich *et al.*, 1997)

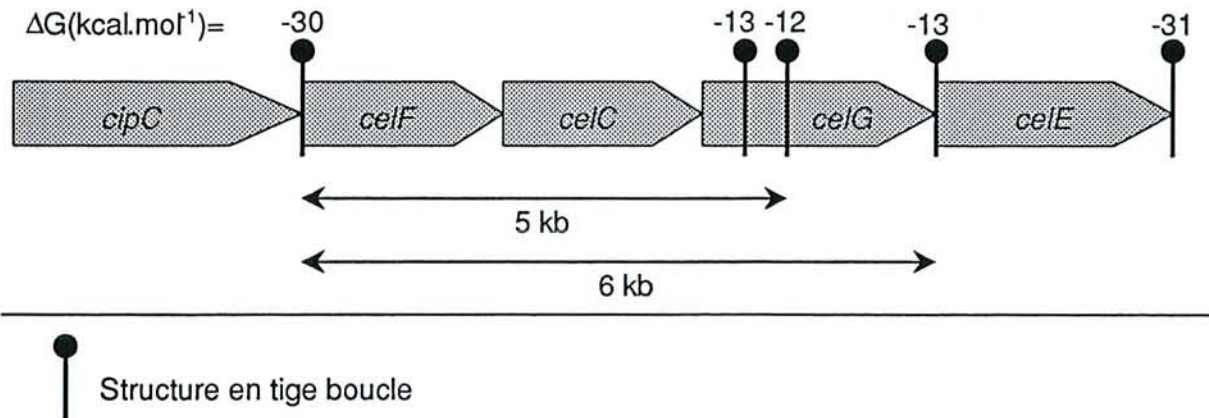
Type	Mr	Famille	Domaines
Cel A	50.000	5	CD <sup>a</sup> + DD <sup>b</sup>
Cel C	47.200	8	CD + DD
Cel D	63.300	5	CD + DD + CBD <sup>c</sup>
Cel E	94.300	9	CD + DD + CBD
Cel F	77.600	48	CD + DD
Cel G	76.000	9	CD + DD + CBD
Cel H	?	9	CD + DD + CBD
Cel J	?	9	CD + DD + CBD

<sup>a</sup>CD= 'Cohesin Domain'

<sup>b</sup>DD= 'Dockerin Domain'

<sup>c</sup>CBD= 'Cellulose Binding Domain'

Contrairement à *C. thermocellum* où les gènes des cellulases sont dispersés sur le chromosome (Béguin *et al.*, 1988), certains gènes de *C. cellulolyticum* sont regroupés au sein d'un cluster d'au moins 16 kb (Bagnara-Tardif *et al.*, 1992) (Figure 5).



**Figure 5:** Cluster de gènes chez *C. cellulolyticum*. Les flèches indiquent la taille des ARNm (d'après Bélaich *et al.*, 1997).

L'assemblage du cellulosome est dû à des interactions fortes entre les domaines de cohésion de CipC, homologue à CipA de *C. thermocellum* et CbpA de *C. cellulovorans*, et les



domaines d'ancrage ('dockerin domain') des sous-unités catalytiques (Pagès *et al.*, 1996) (Figure 6). Les cellulases peuvent posséder un domaine de fixation à la cellulose ('CBD'). Les CBD, comme les domaines catalytiques des cellulases, sont classées en 12 familles sur la base de similarités au niveau de leur structure primaire (Bayer *et al.*, 1998; Tomme *et al.*, 1995). La fonction des CBD ne se limiterait pas à l'attachement des enzymes à la surface du substrat. Ils pourraient jouer un rôle direct dans l'hydrolyse de la cellulose. Chez *C. cellulolyticum*, le CBD de CipC (i) ancrerait l'enzyme à la surface de la cellulose augmentant ainsi sa concentration à proximité du substrat et (ii) pourrait modifier la structure de la cellulose (Pagès *et al.*, 1997). Cette action pourrait exposer de nouveaux sites pouvant être hydrolysés par l'enzyme.

CipC est composée d'un domaine de fixation à la cellulose ('CBD'), de deux domaines hydrophiles et de huit domaines de cohésion (Figure 6) (Bélaich *et al.*, 1997). Les domaines de cohésion présents dans CipC présentent une forte homologie entre eux mais contrairement à CipA sont séparés par des régions de liaison ('linker') très courtes (Bayer *et al.*, 1997). CipC possède 8 domaines de cohésion alors que 13 protéines possédant un domaine d'ancrage ont été détectées dans la fraction cellulosomale de *C. cellulolyticum*. Cela suggère que différentes particules cellulosomales avec des compositions enzymatiques différentes sont produites par *C. cellulolyticum* comme cela a été observé pour *C. papyrosolvans* C7 (Pagès *et al.*, 1999).

Comme CbpA de *C. cellulovorans*, CipC ne possède pas de domaines d'ancrage C terminal (Bélaich *et al.*, 1997). Le mécanisme d'attachement des cellulosomes à la surface des cellules serait donc différent de celui de *C. thermocellum* (Figure 4) et pourrait être similaire à celui proposé pour *C. cellulovorans* (Tamaru and Doi, 1999)(Figure 6).





La dégradation de l'hémicellulose s'effectue par des endoxylanases et des  $\beta$ -xylosidases en association avec des enzymes débranchantes retirant les chaînes latérales (Mitchell, 1998).

Plusieurs souches de clostridia produisent des xylanases (Biely, 1985). L'étendue de la dégradation du substrat dépend alors de l'activité des enzymes produites.

*C. thermocellum* synthétise plusieurs activités xylanasiques dont certaines appartiennent au cellulosome et pourraient intervenir dans la dégradation de l'hémicellulose des substrats cellulosiques. Le rôle physiologique des xylanases de *C. thermocellum* serait d'augmenter l'accessibilité de la cellulose aux enzymes de dégradation du cellulosome (Morag *et al.*, 1990). L'activité xylanase de *C. thermocellum* est détectée lors de cultures sur cellobiose ou cellulose (Morag *et al.*, 1990), contrairement à celle détectée chez *C. stercorarium* ou à *C. acetobutylicum* où elle est sujette à une répression catabolique (Mitchell, 1998).

*C. cellulolyticum* est capable également d'utiliser le xylane comme source de carbone. Une  $\beta$ -xylosidase, produite intracellulairement chez cette bactérie, a été caractérisée (Saxena *et al.*, 1995).

### III. L'assimilation des substrats solubles.

Qu'ils proviennent de l'hydrolyse des polymères ou soient disponibles en tant que glucides libres, les mono, di ou oligosaccharides et leurs dérivés constituent les substrats assimilés par la cellule permettant sa croissance. Ces substrats sont accumulés via des protéines de transport liées à la membrane et sont convertis en intermédiaires des voies métaboliques principales.

#### III.1. Mécanismes et régulation du transport des substrats solubles.

##### III.1.1. Systèmes de transport.

###### ✓ Système PTS (système phosphotransférase PEP dépendant)

Chez les bactéries anaérobies strictes ou facultatives, un mécanisme répandu de transport des glucides est le système PTS. Ce système est un exemple de translocation de groupe où le substrat passe la membrane cytoplasmique en subissant une modification chimique, dans le cas présent une phosphorylation (Saier, 1989; Postma *et al.*, 1993). Ainsi, deux étapes métaboliques sont réalisées tout en fournissant une seule fois de l'énergie, ce qui

expliquerait l'adoption d'un tel mécanisme par les bactéries anaérobies dont le rendement énergétique issu du métabolisme est faible.

Le système PTS est mis en évidence dans des cellules perméabilisées ou des extraits acellulaires en suivant la phosphorylation PEP dépendante du substrat et apparaît comme un mécanisme de transport majeur chez les clostridia (Tableau IV) (Mitchell, 1998).

**Tableau IV : Mécanismes de transport chez les *clostridia* 'saccharolytiques' (d'après Mitchell, 1998).**

Micro-organisme	PTS	Non PTS
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucose, mannitol	-
<i>C. beijerinckii</i>	Glucose, fructose, mannose, sucrose, glucitol, mannitol	Galactose, maltose
<i>Clostridium</i> sp. P262	Glucose, galactose, lactose	(Galactose)
<i>C. thermocellum</i>	Fructose, mannitol	Glucose, cellobiose, fructose
<i>T. ethanolicus</i> <sup>a</sup>	-	Glucose, cellobiose
<i>T. thermohydrosulfuricus</i> <sup>a</sup>	-	Glucose, xylose
<i>T. thermosulfurigenes</i> <sup>b</sup>	Glucose	Maltose
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	-	Glucose, xylose
<i>C. pasteurianum</i>	Glucose, fructose, sucrose, glucitol, mannitol	Galactose, gluconate

PTS, système phosphotransférase.

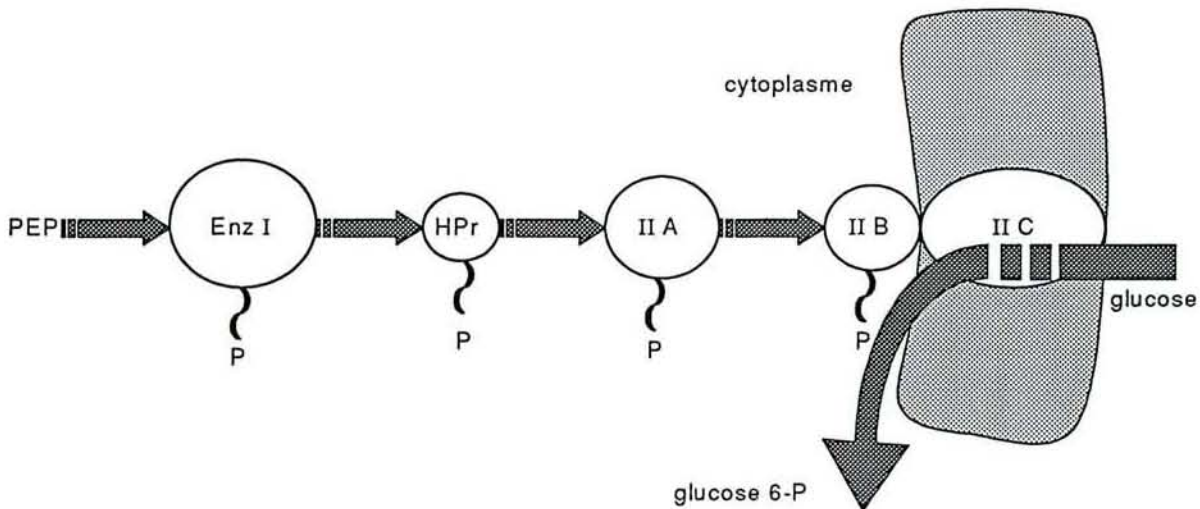
<sup>a</sup> A l'origine *C. thermohydrosulfuricum*.

<sup>b</sup> A l'origine *C. thermohydrosulfurogènes*

Le système PTS bactérien est constitué d'une chaîne de transfert de groupement phosphorylé comprenant plusieurs protéines, entre le donneur PEP et le substrat qui est phosphorylé lorsqu'il rentre dans la cellule. Les deux premiers composants, enzyme I et HPr sont communs à toutes les phosphotransférases et se trouvent en général dans la fraction soluble des extraits cellulaires. Les composants restants forment le complexe 'enzymatique II' qui est spécifique d'un ou d'un petit nombre de substrats apparentés. Il comprend une perméase liée à la membrane soit seule, soit en association avec un ou plusieurs polypeptides. Bien que plusieurs complexes enzymatiques II puissent avoir une architecture différente, l'analyse de leur séquence révèle une organisation en domaines identifiables, présents dans



des configurations différentes. Les domaines IIA et IIB contiennent des sites de phosphorylation et font partie de la chaîne de transfert du groupement phosphorylé tandis que le domaine IIC intervient dans le passage (translocation) du substrat à travers la membrane (Saier, 1989; Postma *et al.*, 1993) (Figure 7).



**Figure 7:** Le système phosphotransférerase (PTS) bactérien (d'après Mitchell, 1998).

L'incorporation du glucose, par exemple, via le système PTS conduit à la formation d'un dérivé phosphorylé. Le glucose-6-phosphate peut alors pénétrer directement dans la voie glycolytique et les autres produits sont convertis en intermédiaires glycolytiques.

Dans le cas des diholosides, le produit du système PTS doit être clivé par une hydrolase, libérant ainsi une molécule d'hexose phosphorylée et une molécule d'hexose non phosphorylée.

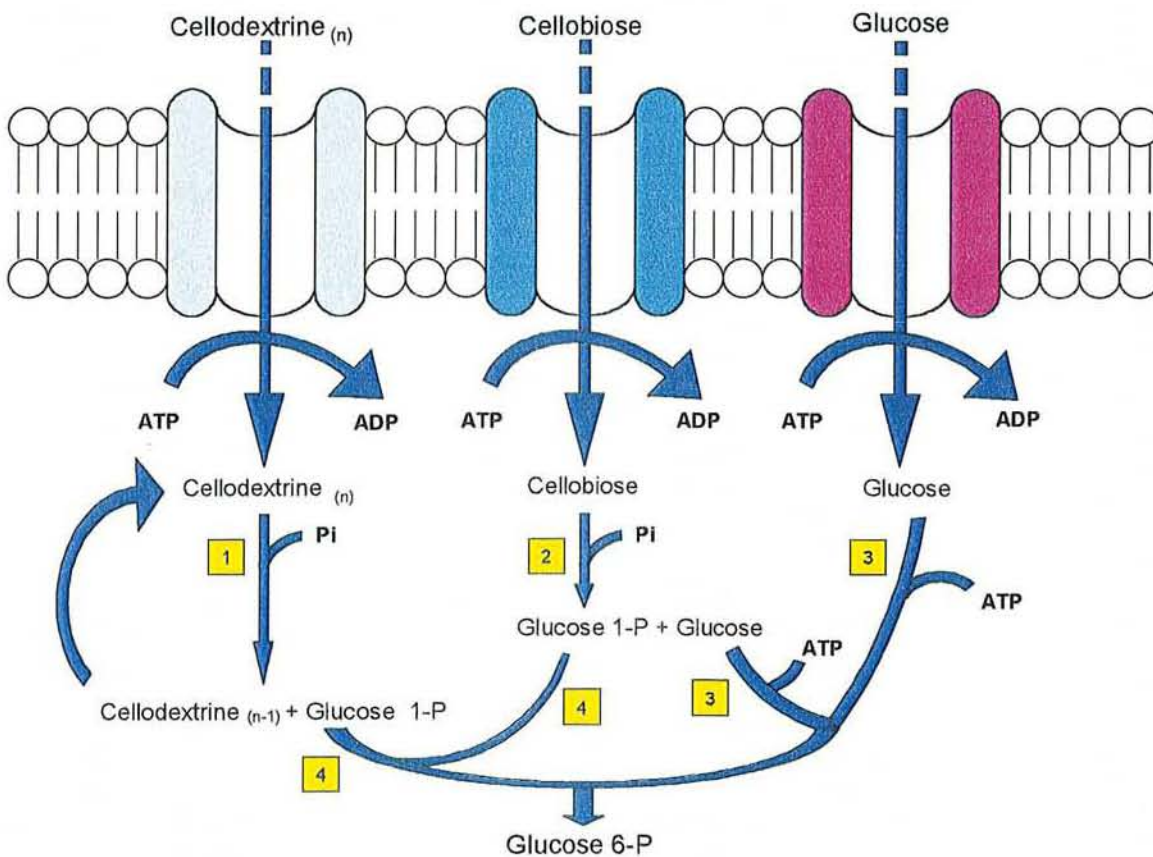
#### ✓ Système de transport non PTS

Certains glucides n'empruntent pas le système PTS chez les clostridia (Tableau IV) et sont transportés dans la cellule sans modification chimique. La source d'énergie pour ce type de transport est vraisemblablement l'ATP ou des gradients d'ions transmembranaires (Mitchell *et al.*, 1995). L'utilisation de différents inhibiteurs métaboliques a permis de démontrer que le transport du glucose et du cellobiose chez *C. thermocellum* est ATP-dépendant (Hernandez, 1982; Ng and Zeikus, 1982). Strobel *et al.* (Strobel *et al.*, 1995) ont par ailleurs corrélé le défaut de transport du glucose et du cellobiose chez *C. thermocellum* avec une diminution du pool intracellulaire d'ATP, alors que la destruction du gradient transmembranaire de protons



n'a aucun effet sur le transport des oses, confirmant ainsi la dépendance du transport de ces sucres vis-à-vis de l'ATP.

Le système de transport du cellobiose permet également le transport des cellodextrines, indiquant par là-même que ces produits d'hydrolyse de la cellulose peuvent entrer directement dans la cellule. Ces molécules (cellobiose et cellodextrines) sont alors métabolisées, par des cellodextrine et cellobiose phosphorylases avec conservation de l'énergie de la liaison  $\beta$ -glycosidique (Figure 8). Ces activités ont été mises en évidence notamment chez *C. thermocellum* (Alexander, 1972a, b).



**Figure 8:** Schéma du modèle du système de transport et de phosphorylation des substrats carbonés chez *C. thermocellum* LQRI (d'après Strobel *et al.*, 1995).

1: cellodextrine phosphorylase (EC 2.4.1.49); 2: cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20); 3: hexokinase (EC 2.7.1.1); 4: phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2).

Enfin, bien que le processus soit relativement rare chez les bactéries, certains substrats peuvent être transportés à l'intérieur des cellules par un mécanisme ne nécessitant pas d'énergie, par diffusion facilitée comme le transport du glycérol chez *C. pasteurianum* (Booth, 1976) ou chez *E. coli* (Lin, 1986), le transport du glucose ou du xylane chez

*C. thermohydrosulfuricum* (Cook *et al.*, 1993a, b) et le transport du glucose chez *Streptococcus bovis* (Russell, 1990).

### III.1.2. Régulation de l'incorporation des substrats solubles.

L'entrée du substrat dans la cellule ainsi que les premières étapes du métabolisme représentent un point de contrôle important des processus métaboliques.

Ce contrôle peut s'exercer soit sur la synthèse, soit sur l'activité des systèmes de transport et des enzymes qui leur sont associées. Les cellules sont capables de réguler la concentration cytoplasmique des inducteurs de l'expression des gènes selon la demande, tout en exerçant un contrôle global sur la transcription des gènes impliqués dans le catabolisme. Il en résulte une hiérarchie de substrats, certains étant métabolisés plus facilement et favorisés énergiquement par rapport à d'autres (Mitchell, 1998).

Les clostridia présentent le même type de régulation que les autres bactéries : ils sont capables d'induire ou de réprimer les systèmes de transport et les activités métaboliques. Cependant, les mécanismes responsables de ces phénomènes chez les clostridia ne sont pas encore élucidés et nécessiteraient une analyse approfondie notamment au niveau de l'organisation des gènes.

Contrairement à *C. thermohydrosulfuricum* (Ng and Zeikus, 1982) où le métabolisme du cellobiose est réprimé par le glucose, *C. thermocellum* LQR1 montre une préférence pour le cellobiose par rapport au glucose lorsque l'inoculum est préparé sur cellobiose (Cook and Morgan, 1994; Mitchell, 1996). Par ailleurs, cette souche métabolise les deux sources de carbone lorsque l'inoculum est préparé sur glucose. *C. cellulolyticum* montre la même préférence pour le cellobiose par rapport au glucose que *C. thermocellum* (Giallo *et al.*, 1983).

L'activité de transport du cellobiose et la cellobiose phosphorylase sont présentes dans les cellules de *C. thermocellum* cultivées sur cellobiose ou sur glucose bien que ces activités soient plus faibles sur glucose. Le transport de glucose et l'activité hexokinase ne sont, elles, détectées que lorsque les cellules sont cultivées sur glucose (Ng and Zeikus, 1982).

Le métabolisme du cellobiose apparaît donc être constitutif chez *C. thermocellum* alors que le métabolisme du glucose serait inductible. La préférence de *C. thermocellum* pour le cellobiose peut s'expliquer par l'utilisation d'une cellobiose phosphorylase comme enzyme hydrolytique pour cliver le substrat tout en conservant l'énergie de la liaison  $\beta$ -glycosidique (Figure 8)(Ng *et al.*, 1977). Ainsi, le rendement molaire de croissance de *C. thermocellum* sur cellobiose est deux fois plus élevé que sur glucose et la vitesse de croissance est également plus élevée (Ng and Zeikus, 1982). Les mêmes phénomènes sont observés chez



*C. cellulolyticum* (Giallo *et al.*, 1983) ce qui laisse supposer qu'un mécanisme du même type que chez *C. thermocellum* pourrait exister.

### III.1.3. Mécanisme de répression catabolique.

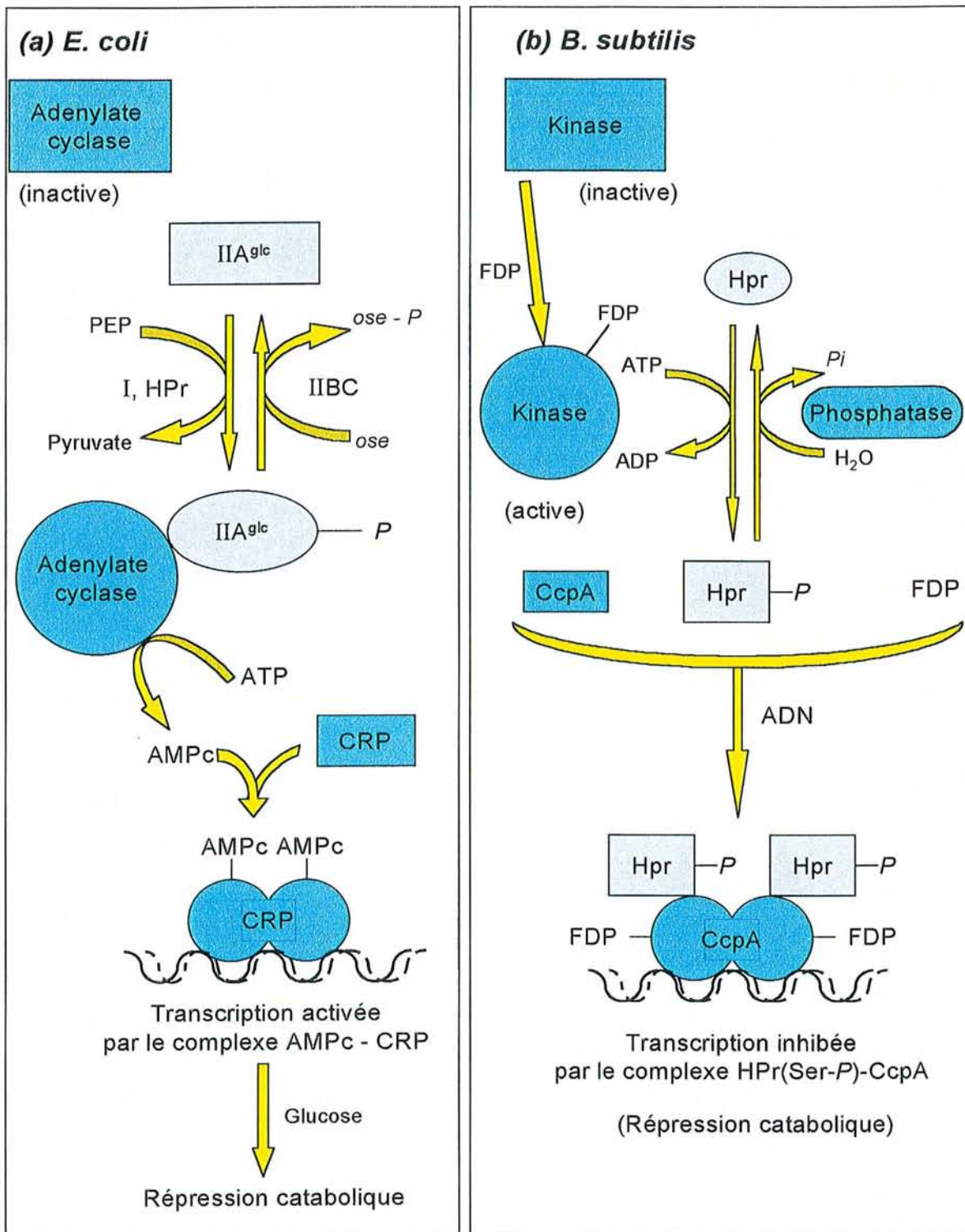
Le processus de répression catabolique nécessite de la part des cellules qu'elles soient capables de détecter la présence d'une source de carbone et de transmettre l'information aux circuits de contrôle adéquats.

L'exemple le mieux connu est la répression catabolique du métabolisme d'autres sucres par le glucose chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Figure 9).

La glucose phosphotransférase, en particulier le composant IIA<sup>Glc</sup> joue un rôle central. La protéine IIA<sup>Glc</sup> peut exister sous forme phosphorylée ou déphosphorylée. La forme phosphorylée est un activateur de l'adénylate cyclase, enzyme responsable de la synthèse d'AMPc tandis que la forme non phosphorylée est un inhibiteur des systèmes de transport non PTS (Postma *et al.*, 1993; Saier, 1989; Saier *et al.*, 1995). L'entrée de glucose entraîne une déphosphorylation des protéines de la chaîne de transfert des phosphoryles et donc une inhibition des systèmes de transfert non PTS avec désactivation de l'adénylate cyclase conduisant à une diminution de la concentration en AMPc. Comme l'AMPc, en se complexant avec une protéine réceptrice CRP, agit en tant qu'activateur de la transcription de plusieurs systèmes de gènes, il en résulte donc un double contrôle, à la fois sur l'incorporation de l'inducteur et sur l'expression des gènes (Maganasik and Neidhardt, 1987). Il existe d'autres mécanismes de répression à la fois chez les entérobactéries et les autres micro-organismes à Gram négatif (Saier, 1991; Saier, 1996) mais ils sont pour la plupart mal définis.

Chez les bactéries à Gram positif, un modèle de régulation différent est proposé. Il a été montré chez *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*, que deux protéines jouent un rôle central dans la répression catabolique de l'utilisation de sources de carbone: CcpA ('Catabolite Control Protein') et HPr, protéine du système PTS (Figure 9) (Chauvaux, 1996; Deutscher *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1995; Gösseringer *et al.*, 1997; Hueck *et al.*, 1995)





**Figure 9:** Modèles illustrant le contrôle du mécanisme de répression catabolique (a) chez *E. coli*, (b) chez *B. subtilis* (d'après Saier *et al.*, 1996).

CcpA est une protéine agissant en *trans* du même type que les répresseurs LacI et GalR chez *E. coli* (Henkin *et al.*, 1991; Weickert and Adhya, 1992). HPr, phosphorylée au niveau d'un résidu sérine par une kinase ATP-dépendante activée par différents métabolites intermédiaires (notamment le fructose 1-6 diphosphate) (Reizer *et al.*, 1998), se fixe à CcpA

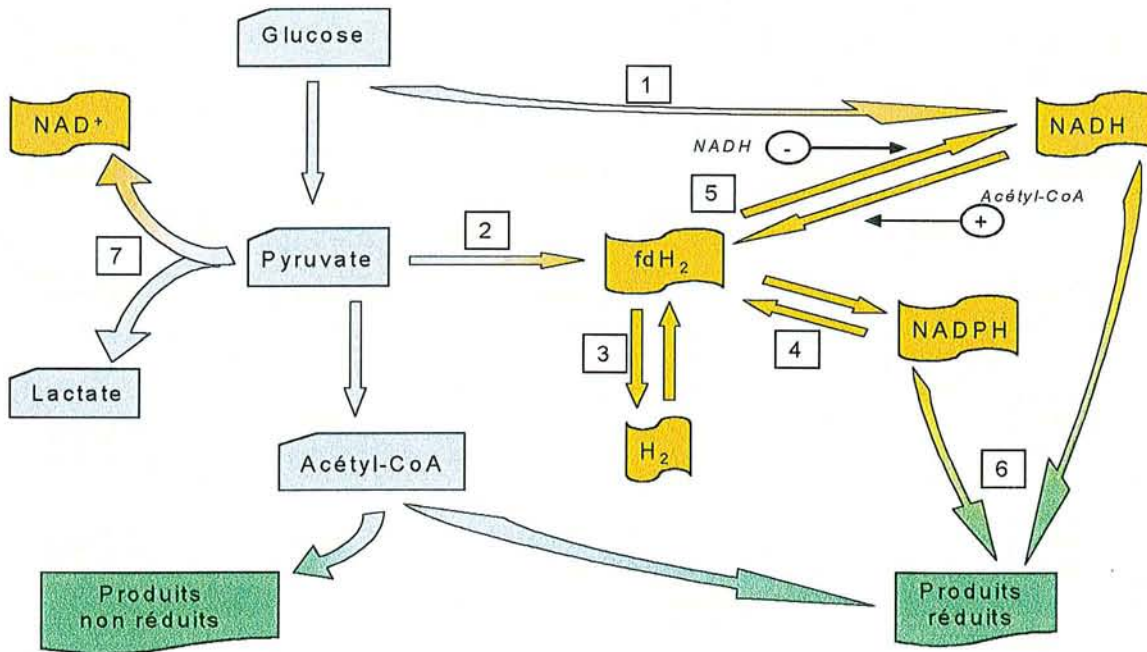
(Deutscher *et al.*, 1995). Le complexe HPr(Ser-P)-CcpA se fixe au niveau de séquences d'ADN appelées 'CRE' ('Catabolite Response Element') retrouvées en amont de plusieurs gènes et opérons cataboliques soumis à une répression catabolique (Grundy *et al.*, 1993; Henkin, 1996). Des protéines homologues à CcpA ont été mises en évidence chez d'autres bactéries à Gram positif notamment *C. acetobutylicum* (Chauvaux, 1996; Davison *et al.*, 1995), *Staphylococcus xylosus* (Egeter and Brückner, 1996), *Lactobacillus casei* (Monedero *et al.*, 1997), *Lactobacillus pentosus* (Lokman *et al.*, 1997), *Lactobacillus lactis* (Luesink *et al.*, 1998) et *Listeria monocytogenes* (Behari and Youngman, 1998). Par ailleurs, une phosphorylation de HPr a été mise en évidence chez *C. beijerinckii* et *C. pasteurianum*. Le mécanisme de répression catabolique HPr(ser-P)-CcpA serait donc un mécanisme répandu chez les bactéries à Gram positif (Mitchell, 1998).

### **III.2. Orientation du flux d'électrons chez les clostridia.**

Chez les clostridia, les voies de métabolisme du carbone sont inextricablement reliées aux réactions de transfert d'électrons. Le métabolisme du glucose fournit du NADH au niveau de la voie glycolytique et une deuxième étape d'oxydation intervient lors de la conversion du pyruvate en acétyl-P (réaction phosphoroclastique). La réaction phosphoroclastique fait intervenir trois enzymes: la pyruvate-fd-oxydoréductase (EC 1.2.7.1), l'hydrogénase (EC 1.18.99.1) et la phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8) et nécessite la présence de coenzyme A, de phosphate et d'un transporteur d'électrons, la ferrédoxine.

La pyruvate-fd-oxydoréductase (EC 1.2.7.1) produit de la ferrédoxine réduite (fd-H<sub>2</sub>) et le devenir des électrons va conditionner le profil de fermentation (Figure 10).





**Figure 10:** Schéma général des interactions entre les voies du flux carboné et celles du flux d'électrons chez les clostridia (d'après Mitchell, 1998).

1: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12); 2: Pyruvate-fd-oxdoréductase (EC 1.2.7.1); 3: Hydrogénase (EC 1.18.99.1); 4: NADPH-fd-oxdoréductase (EC 1.18.1.2); 5: NADH-fd-oxdoréductase (EC 1.18.1.3); 6: Déshydrogénase NAD(P)H dépendante; 7: Lactate déshydrogénase NADH dépendante (EC 1.1.1.27).

En plus de cette enzyme, trois autres oxydoréductases peuvent transférer des électrons entre la ferrédoxine et un accepteur ou donneur.

L'hydrogénase (fd-H<sub>2</sub> oxydoréductase) (EC 1.18.99.1) forme de l'hydrogène (Adams *et al.*, 1980) permettant de métaboliser le pyruvate en acétate avec formation d'un ATP supplémentaire (via l'acétate kinase (EC 2.7.2.1)).

Si la production de H<sub>2</sub> est limitée, les électrons doivent être dirigés vers la formation de composés réduits. L'enzyme NADPH-fd oxydoréductase a une fonction anabolique chez les clostridia, elle fournit le NADPH nécessaire aux synthèses (Jungermann *et al.*, 1973). L'enzyme NADH-fd oxydoréductase pourrait être utilisée pour régénérer le NAD<sup>+</sup> (Petitdemange *et al.*, 1976) mais dans cette direction la réaction met en jeu un changement de potentiel rédox défavorable et nécessite l'acétyl-CoA comme activateur (Jungermann *et al.*, 1973).



La totalité de l'acétyl-CoA peut être convertie en acétate uniquement si le NADH formé lors de la glycolyse est réoxydé par formation d'H<sub>2</sub> via la ferrédoxine.

En pratique, l'accumulation d'hydrogène entraîne une inhibition de l'activité hydrogénase obligeant ainsi la cellule à produire des composés réduits. Un tel phénomène a été décrit notamment chez *C. acetobutylicum* (Doremus *et al.*, 1985; Jungermann *et al.*, 1973; Yerushalmi *et al.*, 1985).

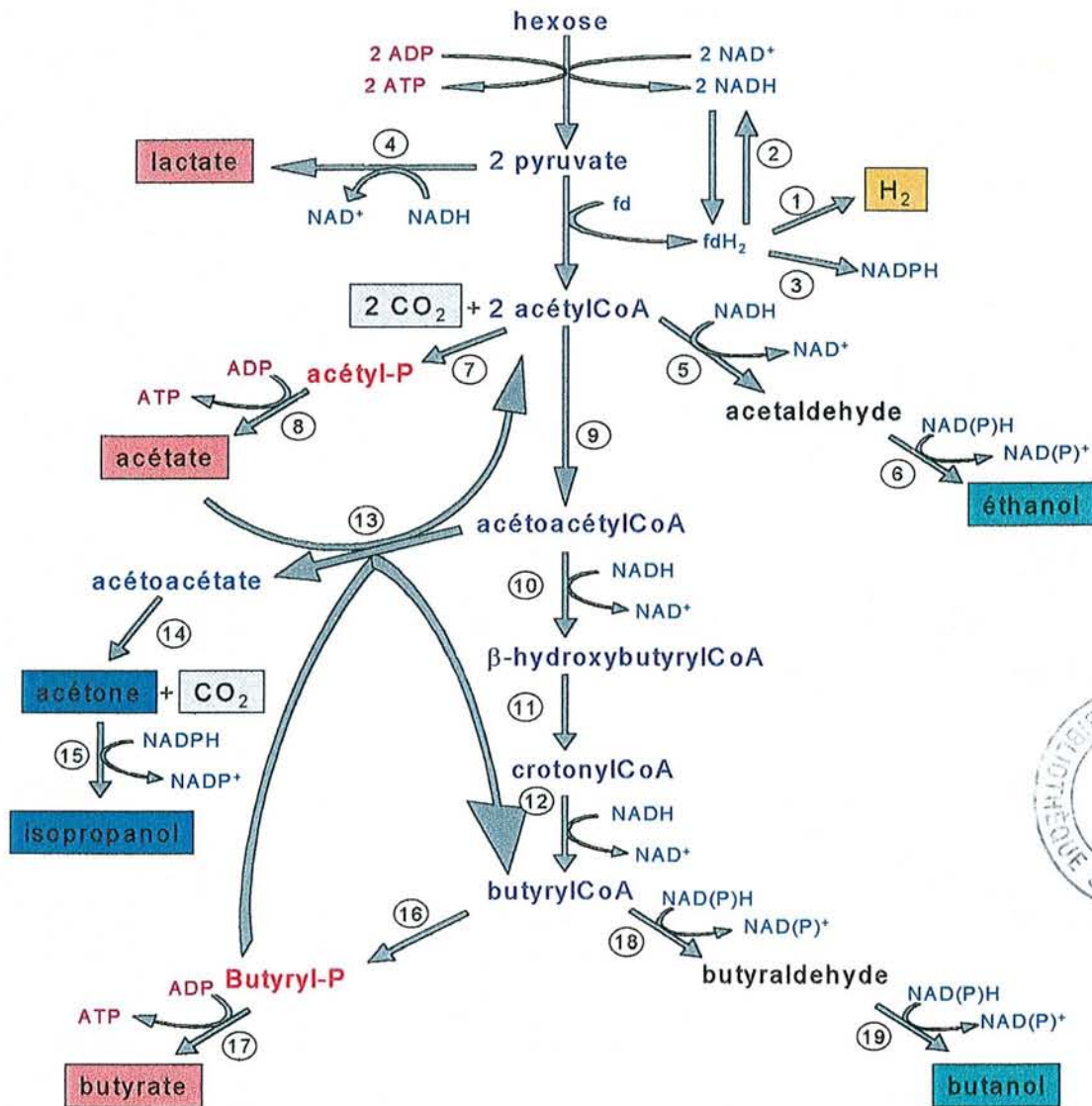
Plusieurs souches sont, par ailleurs, capables de réduire le pyruvate en lactate, ce qui constitue une voie alternative de régénération du NAD<sup>+</sup>.

### III.3. Orientation du flux carboné chez les clostridia.

III.3.1 Régulation du flux de carbone chez *C. acetobutylicum* (fermentation acétonobutylique).

De nombreuses études portant sur le métabolisme de *C. acetobutylicum* ont été réalisées ce qui a permis d'établir un modèle pour la compréhension des mécanismes intervenant dans les régulations métaboliques chez cette bactérie (Girbal *et al.*, 1995a; Girbal and Soucaille, 1998).

*C. acetobutylicum* convertit hexoses et pentoses en pyruvate, ATP et NADH (Figure 11). Le pyruvate est alors décarboxylé en acétyl-CoA par une pyruvate-fd-oxydoréductase. Les équivalents réducteurs générés sont convertis en H<sub>2</sub> par une hydrogénase. L'acétyl-CoA est un point de branchement, conduisant à la production d'acides organiques (acétate et butyrate) et de solvants (acétone, butanol et éthanol). L'acétyl-CoA est converti en acétate par une phosphotransacétylase et une acétate kinase. Une enzyme (thiolase) permet la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former une molécule d'acétoacétyl-CoA, précurseurs des solvants à quatre carbones. Cette réaction joue un rôle important pour définir le rapport entre produits à deux carbones (acétate, éthanol), trois carbones (acétone) et quatre carbones (butyrate et butanol). Son activité est régulée par le rapport entre coenzyme A et acétyl-CoA. L'acétoacétyl-CoA est alors réduit en deux étapes en butyryl-CoA puis converti en butyrate ou donne naissance à de l'acétone. Ethanol et butanol sont produits, en deux étapes, à partir d'acétyl-CoA et de butyryl-CoA respectivement (Girbal and Soucaille, 1998; Matta-El-Ammouri *et al.*, 1987; Papoutsakis, 1984) (Figure 11).



**Figure 11: Fermentation acétono-butylque (Matta-El-Ammouri *et al.*, 1987).**

1: Hydrogénase (EC 1.18.99.1); 2: fd-NAD-oxydoréductase (EC 1.18.1.3); 3: fd-NADP-oxydoréductase (EC 1.18.1.2); 4: Lactate déshydrogénase NADH dépendante (EC 1.1.1.27); 5: acétaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10); 6: éthanol déshydrogénase (EC 1.1.1.1); 7: phosphotransacétylase (EC 2.3.1.8); 8: acétate kinase (EC 2.7.2.1); 9: acéto-acétyl CoA thiolase (EC 2.3.1.9); 10:  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.1.1.157); 11: crotonase (EC 4.2.1.55); 12: butyryl-CoA déshydrogénase (EC 1.3.99.2); 13: acétoacétyl-CoA: acyl-CoA transférase (EC 2.8.3.8); 14: acétoacétate décarboxylase (EC 4.1.1.4); 15: isopropanol déshydrogénase (EC 1.1.1.80); 16: phosphotransbutyrylase (EC 2.3.1.19); 17: butyrate kinase (EC 2.7.2.7); 18: butyraldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.57); 19: butanol déshydrogénase (EC 1.1.1.1 ou EC 1.1.1.2).

### ✓ Régulation de la solvantogénèse:

L'initiation et le maintien de la production de solvant (butanol, éthanol et acétone) ont été dans un premier temps associés à un pH faible et à une accumulation d'acides à l'intérieur de la cellule (Girbal and Soucaille, 1998).



Lors de cultures en batch, une corrélation a été mise en évidence entre concentration d'acide butyrique non dissocié et induction de la production de solvant (Hüsemann and Papoutsakis, 1989; Monot *et al.*, 1984; Terraciano and Kashket, 1986).

Pour Grupe et Gottschalk (Grupe and Gottschalk, 1992), ce serait la forme ionisée de l'acide butyrique qui serait impliquée dans la régulation. Par ailleurs, la disponibilité en ATP joue un rôle important. Une faible concentration en ATP conduit à un métabolisme acidogène, c'est le cas lors de cultures de *C. acetobutylicum* en limitation de carbone (Hüsemann and Papoutsakis, 1989). Au contraire, une disponibilité importante en ATP (c'est à dire une demande en ATP faible) favorise la production de solvant. C'est le cas lors de cultures en saturation de carbone en utilisant un procédé de recyclage des cellules ce qui diminue la vitesse de croissance et ainsi décroît la demande en ATP (Meyer and Papoutsakis, 1989a, b).

#### ✓ Régulation de la production d'alcool:

L'initiation et le maintien de la production d'alcools (butanol et éthanol sans production d'acétone) ont été associés à une augmentation en NAD(P)H à l'intérieur de la cellule (Girbal and Soucaille, 1998). Une telle augmentation peut être obtenue en diminuant le flux d'électrons vers la production de H<sub>2</sub> soit en modifiant l'activité hydrogénase (utilisation de CO, gaz inhibiteur de l'hydrogénase ou dans des conditions de limitation en fer)(Hüsemann and Papoutsakis, 1989), soit en utilisant des transporteurs artificiels d'électrons (méthyl viologène ou rouge neutre)(Girbal *et al.*, 1995b; Grupe and Gottschalk, 1992; Rao and Mutharasan, 1987).

III.3.2. Régulation du flux de carbone chez les clostridia producteurs d'éthanol (fermentation alcoolique).

L'éthanol est le produit majeur du métabolisme fermentatif de plusieurs clostridia, en particulier des souches thermophiles (Wang *et al.*, 1979; Zeikus, 1980). Malgré quelques travaux, la connaissance de la physiologie de ces micro-organismes est loin d'égaliser celle de la fermentation acétonobutylique. Il apparaît néanmoins que ces souches montrent un comportement qui, sous certains aspects, est similaire à celui de *C. acetobutylicum*. La gamme et le rendement en produits terminaux sont également influencés par la nature et la concentration du substrat et par des paramètres environnementaux tels que le pH. Les voies métaboliques des clostridia producteurs d'éthanol sont similaires à celles décrites pour la fermentation acétonobutylique (Figure 11). L'éthanol est formé par réduction de l'acétyl-CoA via l'acétaldéhyde et les autres produits majeurs sont l'H<sub>2</sub>, le CO<sub>2</sub>, le lactate et l'acétate (couplé à la production d'ATP) (Jones and Woods, 1989; Rogers, 1986; Rogers and



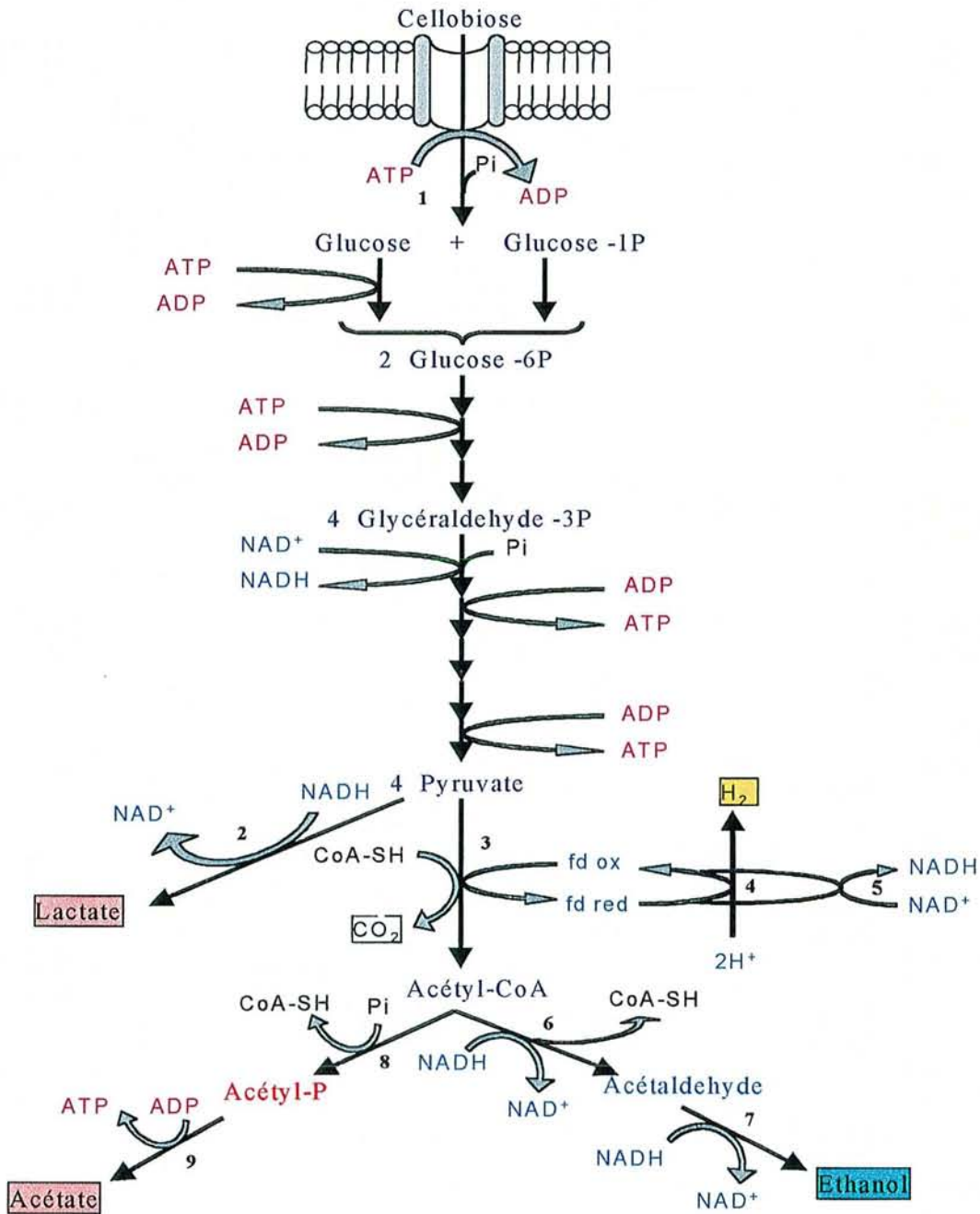
Gottschalk, 1993). Les enzymes impliquées dans ces voies sont généralement mal caractérisées. *C. thermocellum* possède une alcool déshydrogénase NADH-dépendante (Lamed and Zeikus, 1980) qui fonctionne de façon unidirectionnelle et est inhibée par de faibles concentrations en NAD<sup>+</sup> et éthanol ce qui limite le rendement en éthanol. D'autres souches possèdent des enzymes distinctes avec des spécificités de coenzyme différentes. Une alcool déshydrogénase NADPH dépendante a été mise en évidence notamment chez *C. thermohydrosulfuricum* (Lamed and Zeikus, 1981; Turunen *et al.*, 1987). Le profil de formation d'éthanol et de lactate chez *C. thermosaccharolyticum*, en cultures continues limitées en glucose, est influencé par le pH et le taux de dilution. A pH 7, la production d'éthanol est maximale alors qu'à pH 5, la production de lactate devient maximale. De même la diminution du taux de dilution favorise la production de lactate. Ces changements reflètent des différences d'activités des lactate et éthanol déshydrogénases, ce qui indique une régulation de la synthèse des enzymes (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Un autre facteur qui pourrait influencer les quantités respectives des deux produits est l'activation de la lactate déshydrogénase par le fructose 1,6-diphosphate (Russell *et al.*, 1996). Chez *C. thermohydrosulfuricum*, cette activation est due à une augmentation de l'affinité pour le pyruvate et le NADH, ce qui entraînerait une réorientation du flux de carbone et d'électrons vers la production de lactate plutôt que vers les autres produits (Germain *et al.*, 1986).

Comme pour la fermentation acétono-butylique, les produits du métabolisme peuvent être affectés par des facteurs modifiant le flux d'électrons dans le système fd-NAD(P)-H<sub>2</sub>. Dans certaines souches, la concentration en H<sub>2</sub> affecte le rapport éthanol/acétate produit en limitant la capacité des cellules à régénérer les transporteurs d'électrons réduits. Ainsi la formation d'éthanol par *C. saccharolyticum* est stimulée en présence d'hydrogène tandis que la production d'acétate et de H<sub>2</sub> diminue (Murray and Khan, 1983). De même, une culture de *C. thermocellum* réalisée sous atmosphère d'H<sub>2</sub> produit plus d'éthanol, exceptée la souche LQR1 dépourvue d'activité fd-NAD<sup>+</sup> réductase (Freier *et al.*, 1988; Lamed *et al.*, 1988; Lamed and Zeikus, 1980).

Chez *C. cellulolyticum*, les produits de la fermentation du cellobiose ou du glucose sont les mêmes que chez *C. thermocellum* (Figure 12). Cependant, en culture discontinue, le profil fermentaire varie en fonction de la concentration initiale en substrat. Lorsque la concentration initiale en cellobiose est inférieure à 4 g/l, l'acétate est le produit majoritaire tandis que pour des concentrations supérieures, la production de lactate augmente pour atteindre en final celle de l'acétate (Giallo, 1984; Giallo *et al.*, 1983). Au cours de la phase

exponentielle de croissance, *C. cellulolyticum* ne métabolise qu'une faible quantité de substrat (3 g/l) en raison d'une inhibition précoce de la croissance (Giallo *et al.*, 1983).



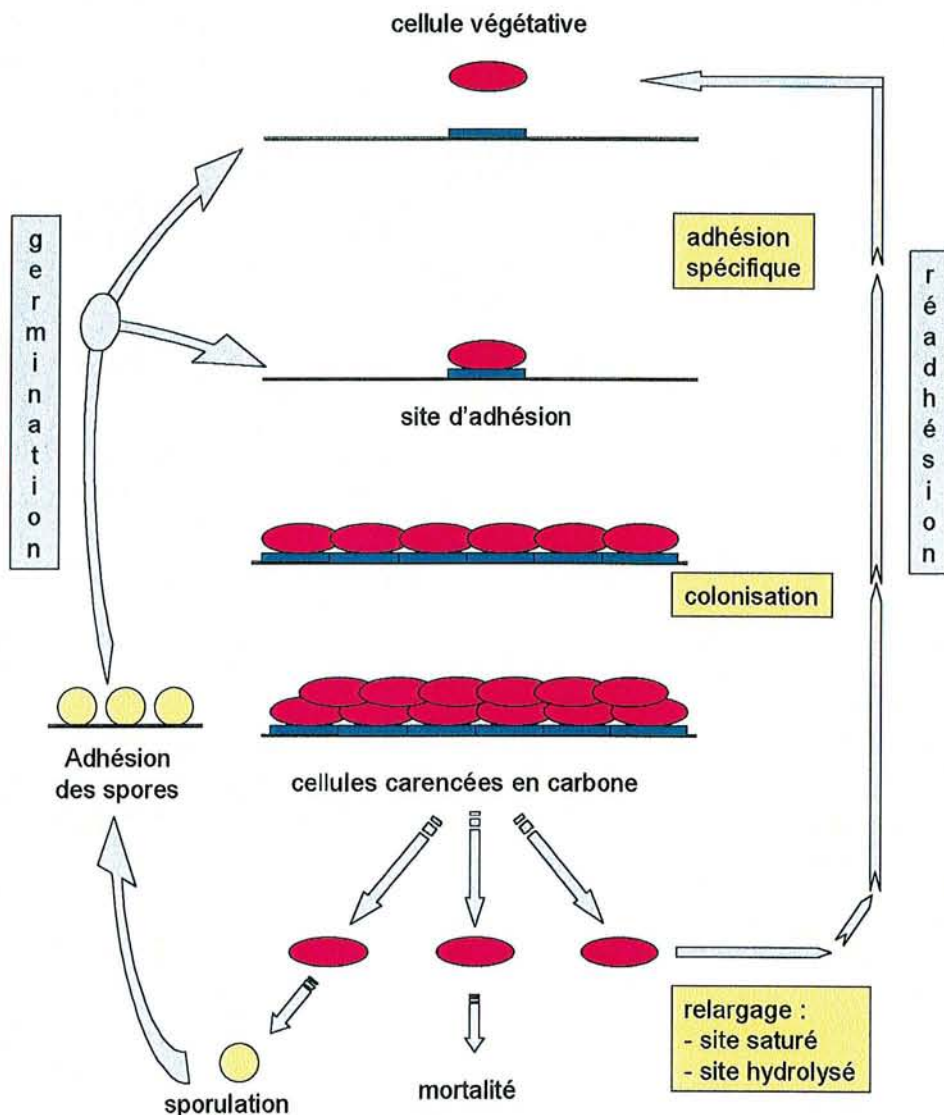
**Figure 12:** Schéma du métabolisme du cellobiose par *C. cellulolyticum*.

1: Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20); 2: L-lactate déshydrogénase NADH dépendante (EC 1.1.1.27); 3: Pyruvate-fd-oxydoréductase (EC 1.2.7.1); 4: Hydrogénase (EC 1.18.99.1); 5: NADH-fd-oxydoréductase (EC 1.18.1.3); 6: Acétylaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.10); 7: Alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1); 8: Phosphate acétyl transférase (EC 2.3.1.8); 9: Acétate kinase (EC 2.7.2.1).

#### IV. Facteurs d'adaptation des bactéries à un stress carboné.

Dans la nature, de nombreux écosystèmes sont oligotrophes et l'insuffisance nutritionnelle est le stress rencontré le plus fréquemment par les micro-organismes (Morita, 1988).

L'étude de l'adhésion de *Clostridium cellulolyticum* a permis de proposer un modèle de colonisation de la cellulose comprenant 4 étapes (Gelhaye, 1993; Gelhaye *et al.*, 1993a, b) (Figure 13):



**Figure 13:** Modèle de colonisation de la cellulose proposé pour *C. cellulolyticum* (d'après Gehin *et al.*, 1996).

- ✓ une étape d'adhésion à un site spécifique
- ✓ une étape de colonisation de ce site



✓ un relargage bactérien dû probablement à une saturation ou/et à une hydrolyse du site d'adhésion

✓ une réadhésion des bactéries à un nouveau site.

Lorsque les sites du substrat insoluble sont saturés ou hydrolysés, *C. cellulolyticum* se retrouve vraisemblablement relargué dans le milieu environnant et se retrouve en compétition avec d'autres bactéries, cellulolytiques ou non, pour l'utilisation des nutriments, notamment le carbone. Cette étape de relargage place donc les bactéries dans une situation de stress carboné.

De nombreuses bactéries ont développé, au cours de l'évolution, des mécanismes complexes leur permettant de résister à ces variations nutritionnelles (ou physicochimiques).

#### **IV.1. Bactéries non sporulées.**

##### **✓ Taille des cellules:**

Les bactéries marines telles que les *Vibrio* forment des cellules de très petite taille, des ultramicrocellules, qui proviennent de cellules ayant subi plusieurs divisions cellulaires sans augmentation de biomasse. Cela permettrait d'éviter qu'elles ne soient ingérées par des bactériovores et d'augmenter la surface bactérienne par unité de volume de façon à capturer le substrat de façon plus efficace (Siegele and Kolter, 1992; Srinivasan and Kjelleberg, 1998). Les cellules d'*E. coli* deviennent, quant à elles, plus petites et presque sphériques lorsqu'elles entrent en phase stationnaire (Siegele and Kolter, 1992).

##### **✓ Surface cellulaire:**

La surface cellulaire de nombreuses bactéries devient plus hydrophobe, les cellules deviennent plus adhésives lors d'une carence et on observe une modification de la composition en acides gras des membranes cellulaires (Kjelleberg *et al.*, 1987; Siegele and Kolter, 1992).

##### **✓ Capacité de transport:**

La cellule peut augmenter sa capacité de transport du nutriment limitant, en augmentant la synthèse du système de transport ou en induisant la synthèse d'un système de plus haute affinité (Harder and Dijkhuizen, 1983).

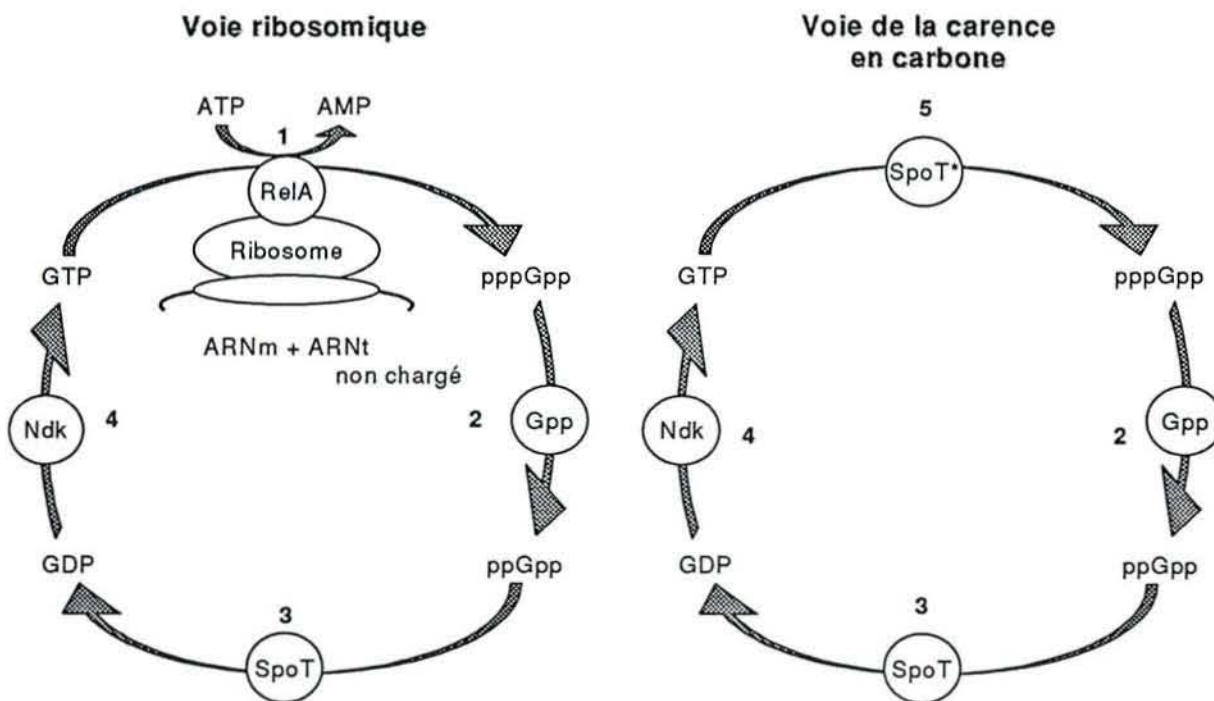
##### **✓ Réaction d'austérité (ou contrôle stringent):**

De nouvelles voies métaboliques endogènes, moins exigeantes d'un point de vue énergétique, peuvent être mises en place.

Au niveau des enzymes intracellulaires, le micro-organisme tend à déréguler la machinerie enzymatique catabolique alors que la synthèse des fonctions anaboliques est ajustée de façon à conserver le taux de croissance.

La réaction d'austérité s'accompagne d'une diminution brutale de la synthèse des protéines et des ARN stables (ARNt et ARNr). La réplication de l'ADN se poursuit uniquement aux fourches de réplication qui existaient au moment de la carence. Ces mesures apportent à la cellule un gain important d'énergie (Cashel, 1975; Spira *et al.*, 1995).

Au cours de la réaction d'austérité, chez *E. coli* et les *Vibrio* marins notamment, deux nucléotides inhabituels s'accumulent: les guanosines tétra et pentaphosphates (ppGpp et pppGpp). Deux voies de synthèse de ces nucléotides existent (Figure 14): une voie *relA*-dépendante (déclenchée par la fixation d'un ARNt non chargé sur le ribosome) et une voie *relA*-indépendante faisant intervenir le produit du gène *spoT* (Flärdh *et al.*, 1994; Neidhardt *et al.*, 1994). SpoT possède une double activité: elle intervient dans la dégradation du ppGpp et dans la synthèse du pppGpp faisant suite à une carence (en carbone notamment). Le ppGpp inhibe la synthèse protéique et la transcription des gènes d'ARNt et d'ARNr, il agirait en se fixant sur la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (Gentry *et al.*, 1993; Svitil *et al.*, 1993).



**Figure 14:** Voies de synthèse des nucléotides à guanosine impliqués dans la réaction d'austérité chez les entérobactéries (d'après Neidhardt *et al.*, 1994).

- |   |  |
|---|--|
| 1: <u>Protéine RelA</u> : (p)ppGpp-synthétase I         | 4: <u>Ndk</u> : nucléoside diphosphate-kinase    |
| 2: <u>Gpp</u> : pppGpp 5'-phosphohydrolase              | 5: <u>Protéine SpoT*</u> : forme dérivée de SpoT |
| 3: <u>Protéine SpoT</u> : (p)ppGpp pyrophosphohydrolase |  |

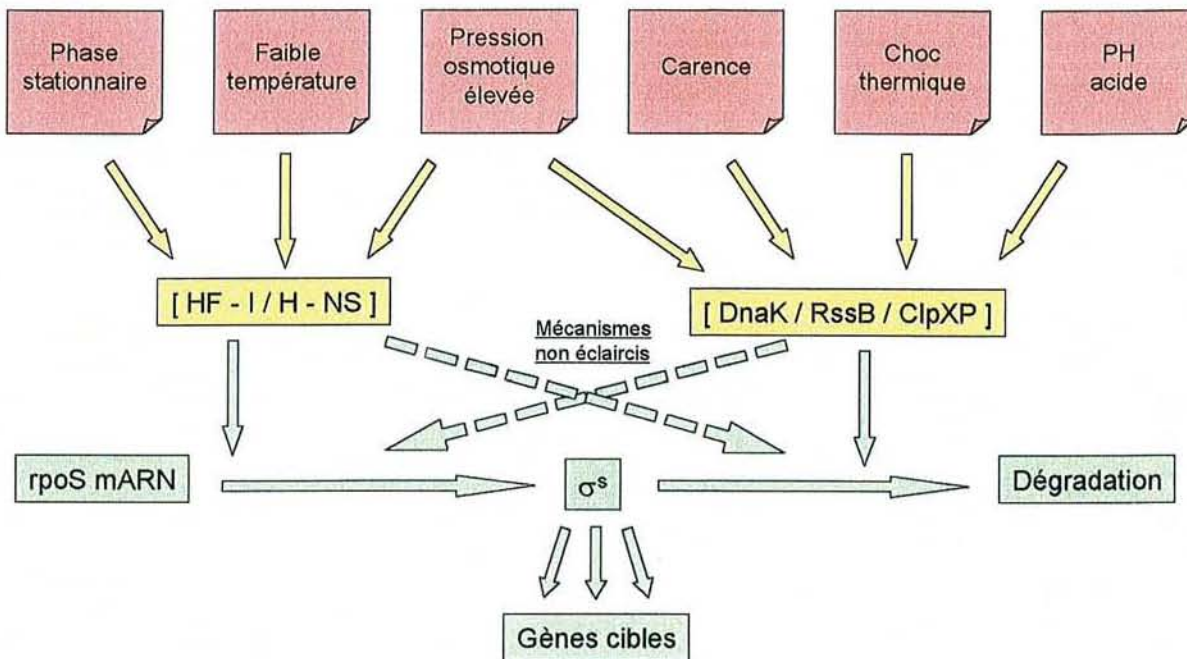
Récemment, il a été montré que le ppGpp active la synthèse du facteur  $\sigma^S$  (Lange *et al.*, 1995).  $\sigma^S$  est essentiel pour la transcription de plusieurs gènes de la phase stationnaire et apparaît comme un régulateur majeur de la réponse à une carence carbonée (Lange and Hengge-Aronis, 1991; McCann *et al.*, 1991).

Chez les bactéries, en effet, la régulation de l'expression des gènes se fait majoritairement au niveau transcriptionnel. La spécificité de reconnaissance du promoteur fait intervenir une des sous-unités de l'ARN polymérase: le facteur sigma qui est relargué après l'initiation de la transcription. De nombreux facteurs sigma existent, avec une spécificité de reconnaissance qui leur est propre, ce qui constitue un outil de contrôle de l'expression des gènes (par reprogrammation de l'ARN polymérase) (Haldenwang, 1995; Helmann and Chamberlin, 1988).

#### ✓ Modification de l'expression génique:

Une carence carbonée chez *E. coli*, est responsable de l'induction de plus de cinquante protéines (Groat *et al.*, 1986; Matin, 1991; McCann *et al.*, 1991; Schultz *et al.*, 1988) dont au moins trente deux nécessitent le facteur sigma katF ou  $\sigma^S$  (*rpoS*) pour leur induction (Lange and Hengge-Aronis, 1991; McCann *et al.*, 1991). Le facteur  $\sigma^S$  est induit notamment en phase stationnaire (Hengge-Aronis, 1993; Hengge-Aronis, 1996b; Lange and Hengge-Aronis, 1991) ou après un stress osmotique (Hengge-Aronis, 1993; Hengge-Aronis, 1996a). La régulation de  $\sigma^S$  est multiple : au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Lange and Hengge-Aronis, 1994; Loewen *et al.*, 1993; McCann *et al.*, 1993) (Figure 15).





**Figure 15:** Représentation schématique des régulations s'exerçant sur le facteur  $\sigma^S$  (ou  $\sigma^{38}$ , KatF, AppR) chez *E. coli* (d'après Muffler *et al.*, 1997).

Le mécanisme de cette régulation complexe n'est pas totalement élucidé. La 'RNA-binding protein' HF-I (Muffler *et al.*, 1996b) et la protéine de type histone H-NS (Barth *et al.*, 1995; Yamashino *et al.*, 1995) pourraient notamment intervenir dans la traduction de  $\sigma^S$ . Par ailleurs, la protéine RssB et la protéase ClpXP seraient impliquées dans le turn-over de  $\sigma^S$  (Muffler *et al.*, 1996a; Pratt and Silhavy, 1996; Schweder *et al.*, 1996). De plus, une protéine de choc thermique DnaK, jouerait un rôle positif dans le contrôle traductionnel de  $\sigma^S$  (Muffler *et al.*, 1997) et la guanosine tétraphosphate (ppGpp) pourrait également être impliquée dans la régulation de *rpos* (Lange *et al.*, 1995) (Figure 15).

Deux classes de gènes sont induites en cas de carence carbonée chez *E. coli* (Schultz *et al.*, 1988): les gènes *cst*, nécessitant l'AMP cyclique pour leur induction, et les gènes *pex* pour lesquels l'AMP cyclique n'intervient pas. Seuls les gènes *pex* semblent associés à la résistance. Ils comprennent notamment les gènes induits en cas de choc thermique (*hsp*) (Craig *et al.*, 1993; Lindquist and Craig, 1988). Certaines protéines Pex dont DnaK, GroEL et HtpG nécessitent un facteur sigma mineur pour leur synthèse:  $\sigma^{32}$  (produit du gène *rpoH*) (Jenkins *et al.*, 1991). Le facteur  $\sigma^{32}$  contrôle le régulon  $\sigma^{32}$ , regroupant des gènes induits uniquement lors d'un stress thermique (Bukau, 1993; Gross, 1996; Nakahigashi *et al.*, 1998; Segal and Ron, 1998; Yura *et al.*, 1993). DnaK, GroEL et HtpG sont homologues, respectivement, aux protéines Hsp70, HSP mitochondriales et HSP83 eucaryotes. Ce sont des

molécules chaperons, impliquées dans la biogénèse et le repliement des protéines depuis la naissance de la chaîne jusqu'à l'assemblage de complexes multimériques (Morange, 1993). Ces protéines pourraient prévenir les conformations anormales des macromolécules provoquées par un stress.

Chez les bactéries marines telles que les *Vibrio*, un stimulon de carence existe également. Il code plus de 60 protéines et est induit de façon séquentielle lors d'une carence (en carbone, azote ou phosphate) (Nyström *et al.*, 1992; Srinivasan and Kjelleberg, 1998).

## **IV.2. Bactéries sporulées.**

Certaines bactéries, typiquement à Gram positif et la plupart étant des bacilles, sont capables, dans des conditions bien particulières, de donner naissance à des endospores.

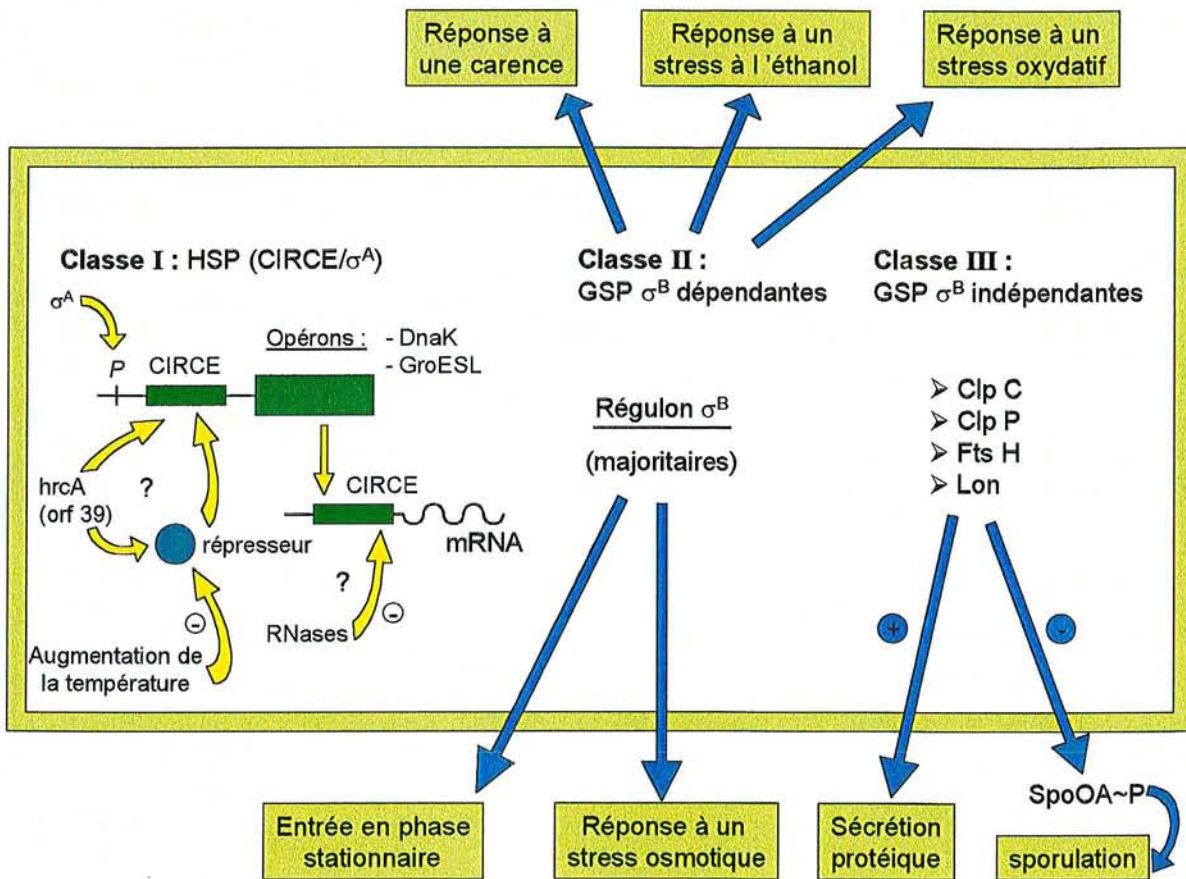
Les endospores sont des formes de résistance et de dissémination formées en phase stationnaire. Elles sont libérées par lyse de la cellule mère. Ces endospores gardent la capacité de germer et de redonner des cellules végétatives. Les endospores ont des propriétés particulières: thermorésistantes, résistantes aux radiations ionisantes ou non ionisantes, à des substances toxiques, métaux lourds, elles sont inertes sur le plan métabolique (état cryptobiotique) ce qui permet de conserver les bactéries jusqu'à ce que des conditions favorables entraînent la germination de la spore (Errington, 1993).

Lorsque les conditions nécessaires à la sporulation ne sont pas réunies, un phénotype de résistance à de multiples stress peut être acquis, notamment chez *Bacillus subtilis*, via le régulon  $\sigma^B$  (Völker *et al.*, 1999). Par ailleurs, la mise en place d'une réaction d'austérité, faisant intervenir la guanosine tétraphosphate comme chez *E. coli* a été décrite chez *B. subtilis* (Rhaese and Groscurth, 1974; Wendrich and Marahiel, 1997).

### **IV.2.1. Induction de protéines de stress chez *Bacillus subtilis*: Régulon $\sigma^B$ .**

Chez *B. subtilis*, comme chez d'autres bactéries, l'une des réponses précoces à un stress est l'induction de protéines de stress. Chez cette bactérie, les gènes codant ces protéines sont regroupés au sein de trois classes différentes (Hecker *et al.*, 1996) (Figure 16):





**Figure 16:** Représentation schématique des régulations mises en jeu lors d'un stress chez *B. subtilis*.

- ✓ **Classe I** : gènes codant des protéines spécifiques d'un choc thermique (HSP pour 'Heat Shock Protein')
- ✓ **Classe II** : gènes codant des protéines de stress générales induites par différents stress (carence en glucose, stress thermique, stress osmotique, exposition à l'éthanol...). Leur induction est dépendante d'un facteur sigma particulier :  $\sigma^B$
- ✓ **Classe III** : gènes codant des protéines générales dont l'induction est indépendante de  $\sigma^B$ .

#### IV.2.1.1. Protéines de stress de classe I.

Ce groupe inclut les produits des opérons dnaK et GroESL, qui confèrent comme chez *E. coli* une protection vis à vis de la chaleur.

La transcription de ces opérons est  $\sigma^A$ -dépendante. De plus, la région promotrice de ces opérons est caractérisée par la présence d'une séquence répétée inversée ('IR') parfaitement conservée, appelée CIRCE (pour 'controlling inverted repeat of chaperone



expression') qui serait un élément de régulation négative en *cis* (Segal and Ron, 1998; Yuan and Wong, 1995; Zuber and Schumann, 1994). Cette IR a été identifiée plus de cinquante fois dans vingt neuf espèces bactériennes différentes (Wetzstein *et al.*, 1992) et notamment chez *C. acetobutylicum* (Bahl *et al.*, 1995). Une protéine, HrcA ('heat regulation at CIRCE') codée par la première ORF de l'opéron *dnaK*, interagirait avec cet élément CIRCE pour réguler négativement les gènes de choc thermique de classe I (Figure 16).

#### IV.2.1.2. Protéines de stress de classe II: régulon $\sigma^B$ .

##### IV.2.1.2.1. Opéron $\sigma^B$ .

La majorité des gènes codant des protéines induites par différents stress (dont carence en carbone, stress thermique, stress osmotique...) constituent un large régulon de stress et de phase stationnaire contrôlé par le facteur  $\sigma^B$  (Hecker and Völker, 1998). Le facteur  $\sigma^B$ , qui contrôle l'expression de différents gènes lors de l'entrée en phase stationnaire, est lui-même également activé par différents stress (Benson and Haldenwang, 1993b; Boylan *et al.*, 1993; Kovacs *et al.*, 1998; Völker *et al.*, 1995b).

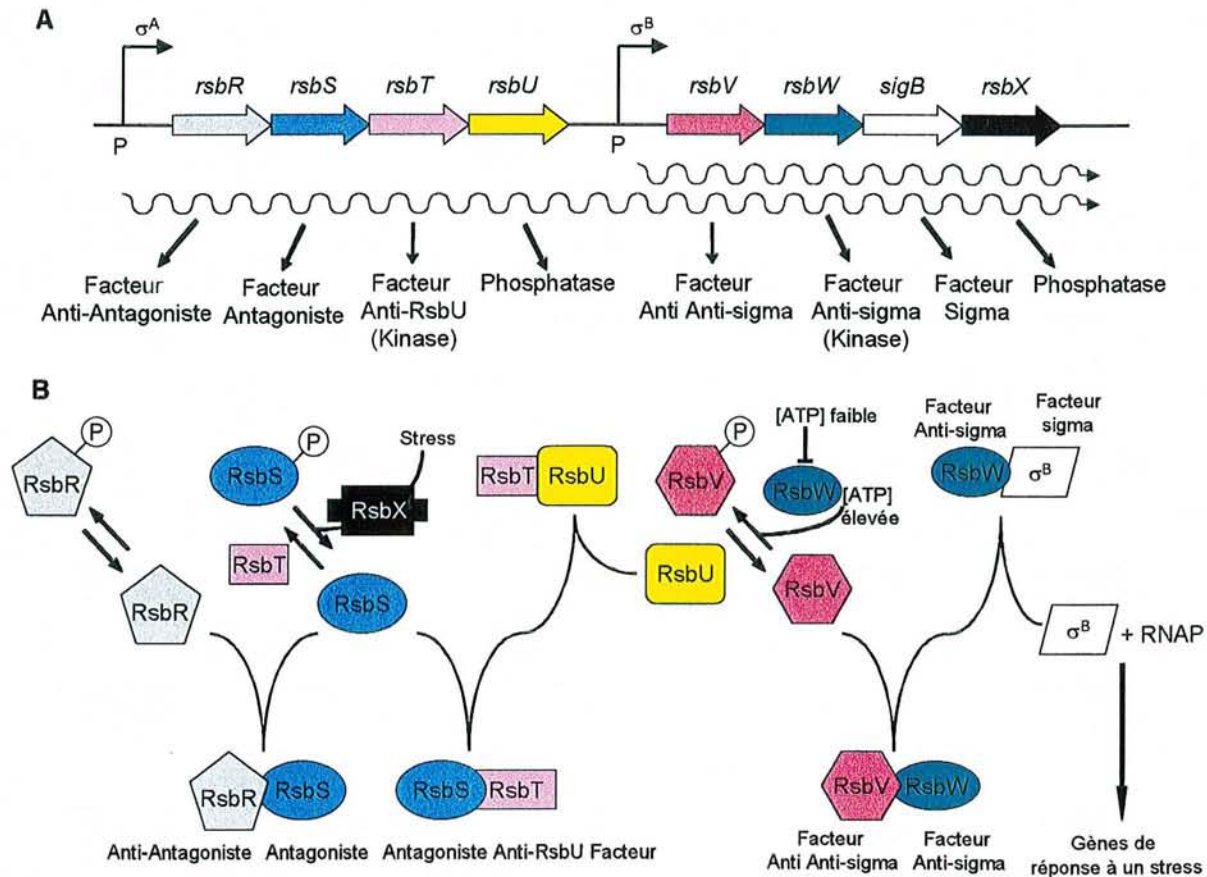
Le gène sigma B, codant le facteur spécifique  $\sigma^B$ , appartient à un opéron comprenant 8 gènes : *rsbR*, *rsbS*, *rsbT*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *rsbX* (*rsb* pour 'regulator of sigma B') et *sigB* (Benson and Haldenwang, 1992; Boylan *et al.*, 1992; Kalman *et al.*, 1990; Wise and Price, 1995) (Figure 17A). Cet opéron est précédé de deux promoteurs: le premier situé en amont de *rsbR* est  $\sigma^A$ -dépendant, il permet d'obtenir un taux de transcription de base de l'opéron et permet l'augmentation d'expression de l'opéron lors de l'entrée en phase stationnaire dans un milieu riche. Le deuxième promoteur est interne (localisé entre *rsbU* et *rsbV*) et reconnu par  $\sigma^B$ . La transcription initiée à ce promoteur permet d'obtenir un taux d'expression de base des quatre gènes situés en aval (*rsbU*, *rsbV*, *sigB* et *rsbX*). Elle est responsable de l'augmentation soudaine des protéines correspondant à ces gènes après un stress ou une carence.

##### IV.2.1.2.2. Modèle de régulation de $\sigma^B$ .

$\sigma^B$  est soumis à une autorégulation (Kalman *et al.*, 1990). Par ailleurs, les gènes de l'opéron *sigB* codent des régulateurs. Le mécanisme de régulation est du type 'partner-switching'. Deux modules de régulation sont couplés (Kang *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996), comportant chacun trois composants (Figure 17B):

- une phosphatase à sérine (RsbX et RsbU)
- une protéine antagoniste (RsbS et RsbV)

- une protéine ‘switch’ qui est une kinase à sérine (RsbT et RsbW) (Hughes and Mathee, 1998; Yang *et al.*, 1996).



**Figure 17: Modèle de régulation du facteur sigma de stress:  $\sigma^B$  chez *B. subtilis*.**

(A) opéron  $\sigma^B$  comportant 8 gènes différents et deux promoteurs  $\sigma^A$  et  $\sigma^B$  dépendants.

(B) mécanismes de régulation de  $\sigma^B$  (d'après Hughes and Mathee, 1998).

RsbU constitue le lien entre les deux modules. Le premier module est nécessaire lors des réponses à un stress environnemental (sel, température, éthanol...), le deuxième pour la réponse à un stress énergétique (phase stationnaire, carence en carbone, phosphate ou présence d'oxygène) (Alper *et al.*, 1994; Hughes and Mathee, 1998; Kang *et al.*, 1996; Völker *et al.*, 1995a).

Un régulateur supplémentaire viendrait s'ajouter à ce couplage de deux modules de type 'partner-switching': RsbR qui serait un régulateur positif modulant le niveau de RsbS non phosphorylée, forme qui est un antagoniste négatif du module amont (Akbar *et al.*, 1997).

✓ **RsbW** : RsbW est un facteur anti-sigma qui forme un complexe mutuellement exclusif avec  $\sigma^B$  et RsbV (Dufour and Haldenwang, 1994). La fixation de RsbW à  $\sigma^B$  séquestre ce facteur et empêche son activité (Benson and Haldenwang, 1993a). La formation



d'un complexe entre RsbV et RsbW libère  $\sigma^B$  et permet l'activation des gènes  $\sigma^B$ -dépendants. RsbW est une protéine kinase ATP-dépendante capable de phosphoryler RsbV. La forme phosphorylée de RsbV ne pouvant se lier à RsbW, cette phosphorylation constitue un élément de régulation supplémentaire. Elle nécessite de fortes concentrations en ATP (plusieurs centaines de micromolaires).

✓ RsbU et RsbX : RsbU et RsbX influencent la préférence de fixation de RsbW : RsbU (ou un processus RsbU-dépendant) permet de stimuler la fixation de RsbV à RsbW. Lors de la phase exponentielle, l'activation RsbU-dépendante de  $\sigma^B$  est normalement empêchée par l'action de RsbT (Völker *et al.*, 1995a).

$\sigma^B$  serait donc activé par différents stimuli via deux voies se recoupant partiellement (Hughes and Mathee, 1998)(Figure 17):

➡ une voie RsbU-indépendante : l'activation de  $\sigma^B$  est la conséquence d'une diminution de la concentration en ATP intracellulaire (entrée en phase stationnaire dans un milieu riche, carence en glucose, en phosphate...). RsbV, dont le pool est globalement moins phosphorylé, forme un complexe avec RsbW qui libère  $\sigma^B$  et permet son activité.

➡ une voie RsbU-dépendante : en réponse à des stress environnementaux (tels que stress thermique, osmotique ou éthanol) (Akbar *et al.*, 1997; Benson and Haldenwang, 1993b). Il a été montré récemment qu'une GTPase (ObgGTPase) pourrait être impliquée dans la régulation de cette voie (Scott and Haldenwang, 1999).

#### IV.2.1.2.3. Gènes contrôlés par $\sigma^B$ : régulon $\sigma^B$ .

Bien que des progrès aient été réalisés pour élucider les mécanismes de régulation de l'expression du régulon  $\sigma^B$ , la fonction des produits des gènes  $\sigma^B$ -dépendants demeure pour la plupart inconnue. Certains gènes  $\sigma^B$ -dépendants analysés (*ctc*, *gsiB*, *csbA*, *gspA*) ne semblent pas indispensables au moins pour la croissance végétative (Antelmann *et al.*, 1995; Boylan *et al.*, 1991; Truitt *et al.*, 1985). Il a été montré que, bien que  $\sigma^B$  ne soit pas essentiel pour la croissance de *Bacillus subtilis*, un contrôle de son activité est nécessaire à une croissance optimale (Benson and Haldenwang, 1992; Boylan *et al.*, 1992, Igo *et al.*, 1987).

Récemment, l'étude des conséquences d'une mutation *sigB* a révélé que l'expression du régulon  $\sigma^B$  confère à *B. subtilis* une résistance à de multiples stress (stress osmotique, acide, thermique, éthanol, ...) (Völker *et al.*, 1999)

Par ailleurs, de nouveaux membres du régulon  $\sigma^B$  ont été identifiés, portant à plus d'une centaine les gènes sous contrôle de  $\sigma^B$ . Certains sont impliqués dans la résistance à plusieurs drogues, à un stress oxydatif, dans la maintenance du potentiel rédox en condition



de stress, dans le transport des ions potassium (Antelmann *et al.*, 1997; Akbar *et al.*, 1999; Bernhardt *et al.*, 1997; Petersohn *et al.*, 1999) ce qui élargit encore la gamme des branches physiologiques régulées par  $\sigma^B$ , connue à ce jour.

#### IV.2.1.3. Protéines de stress de classe III.

Deux observations au moins suggèrent l'existence de cette troisième classe de gènes : une délétion du gène *sigB* n'affecte pas l'induction de quelques protéines par la chaleur ou d'autres stress. Par ailleurs, les gènes de certaines GSP sont précédés par un promoteur potentiel, caractéristique du facteur  $\sigma^A$  végétatif, et ne contiennent pas d'élément CIRCE.

Les gènes appartenant à cette classe codent des protéases ATP-dépendantes (ClpP, ClpC, Lon et FtsH) (Deuerling *et al.*, 1995; Krüger *et al.*, 1994; Riethdorf *et al.*, 1994; Völker *et al.*, 1992).

Certains gènes de cette classe (*clpC*, *clpP*) pourraient présenter une régulation plus complexe puisqu'un deuxième promoteur  $\sigma^B$ -dépendant a été mis en évidence (Hecker and Völker, 1998).

#### IV.2.2. Induction de protéines de stress chez les clostridia

Chez les clostridia, seules quelques études sur la bactérie *C. acetobutylicum* ont été réalisées (Bahl, 1993; Bahl *et al.*, 1995; Pich *et al.*, 1990; Rungeling *et al.*, 1999; Terraciano *et al.*, 1988). La réponse à un choc thermique de *C. acetobutylicum* serait similaire à celle d'*E. coli* mais la régulation de l'induction serait différente.

Trois opérons ont été mis en évidence (Pich *et al.*, 1990):

\* Opéron *dnaK* comportant quatre gènes *orfA*, *grpE*, *dnaK* et *dnaJ*. *orfA* coderait une nouvelle HSP dont la fonction pourrait être similaire à HrcA de *B. subtilis* (Narberhaus and Bahl, 1992; Rungeling *et al.*, 1999).

\* Opéron *groESL* (Narberhaus and Bahl, 1992), comprenant les gènes GroEL et GroES.

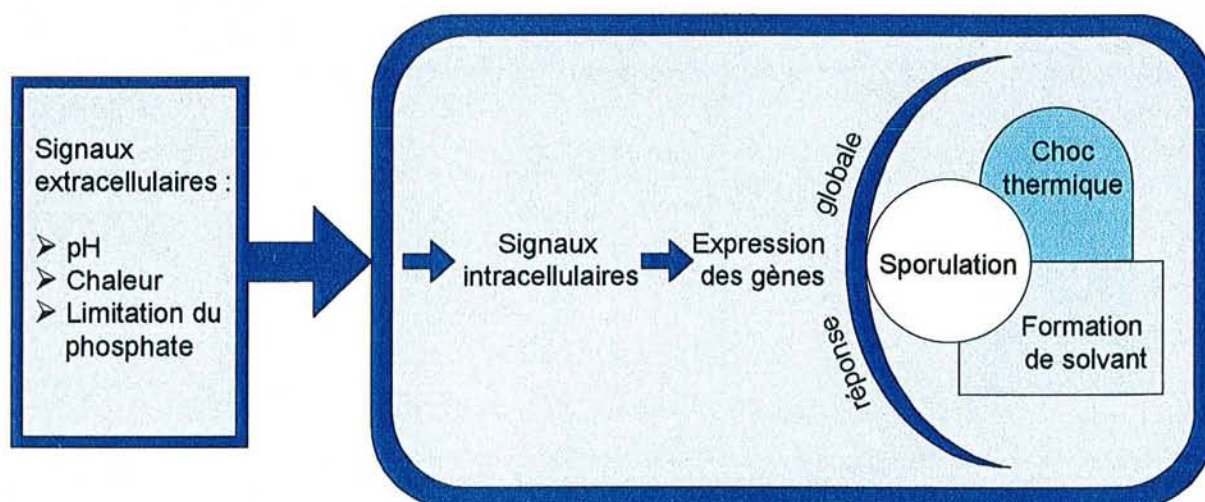
\* Opéron monocistronique *hsp18*.

Aucun facteur  $\sigma$  alternatif n'a pour l'heure été mis en évidence chez *C. acetobutylicum*.

Les opérons *dnaK* et *groESL* sont précédés par une séquence inversée similaire à l'élément CIRCE mis en évidence chez *B. subtilis*.

Par ailleurs, les conditions responsables du changement métabolique chez *C. acetobutylicum* (déclenchement de la solvantogénèse) conduisent également à une réponse de choc thermique (Pich *et al.*, 1990; Terraciano *et al.*, 1988). Le lien entre ces deux processus reste à être élucidé. Cependant, puisque les facteurs nécessaires à l'initiation de la formation de solvants chez *C. acetobutylicum* (c'est à dire pH faible, faible vitesse de croissance et excès de glucides) (Bahl and Gottschalk, 1984), pourraient placer cette bactérie dans une situation de stress, il n'apparaît pas aberrant qu'une réponse de stress puisse être impliquée dans ce 'shift' métabolique (Bahl, 1993) (Figure 18).

Une protéine présentant une forte homologie avec une protéine fer-soufre, la rubrédoxine mais de taille supérieure (21 kDa contre 6 kDa) pourrait avoir également un rôle régulateur. Elle est induite précocement avant les autres Hsp (Bahl *et al.*, 1995).



**Figure 18:** Représentation schématique du réseau de régulations pouvant s'exercer chez *C. acetobutylicum* (d'après Bahl, 1993).

#### IV.2.3. Sporulation.

Le processus de sporulation de *B. subtilis* a fait et continue de faire l'objet de nombreuses études. Sur la base d'études morphologiques, le mécanisme de sporulation proposé pour les clostridia semble être le même que celui de *Bacillus subtilis* (Roper *et al.*, 1977). Par ailleurs, plusieurs gènes homologues à ceux de *Bacillus subtilis* ont été mis en évidence chez certains clostridia: gènes homologues à *spoOA* et à ceux codant les facteurs sigma E, F et G (Sauer *et al.*, 1995; Sauer *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995) et profil d'expression de facteurs sigma similaires à *B. subtilis* (Santangelo *et al.*, 1998).

### IV.2.3.1. Déroulement de la sporulation.

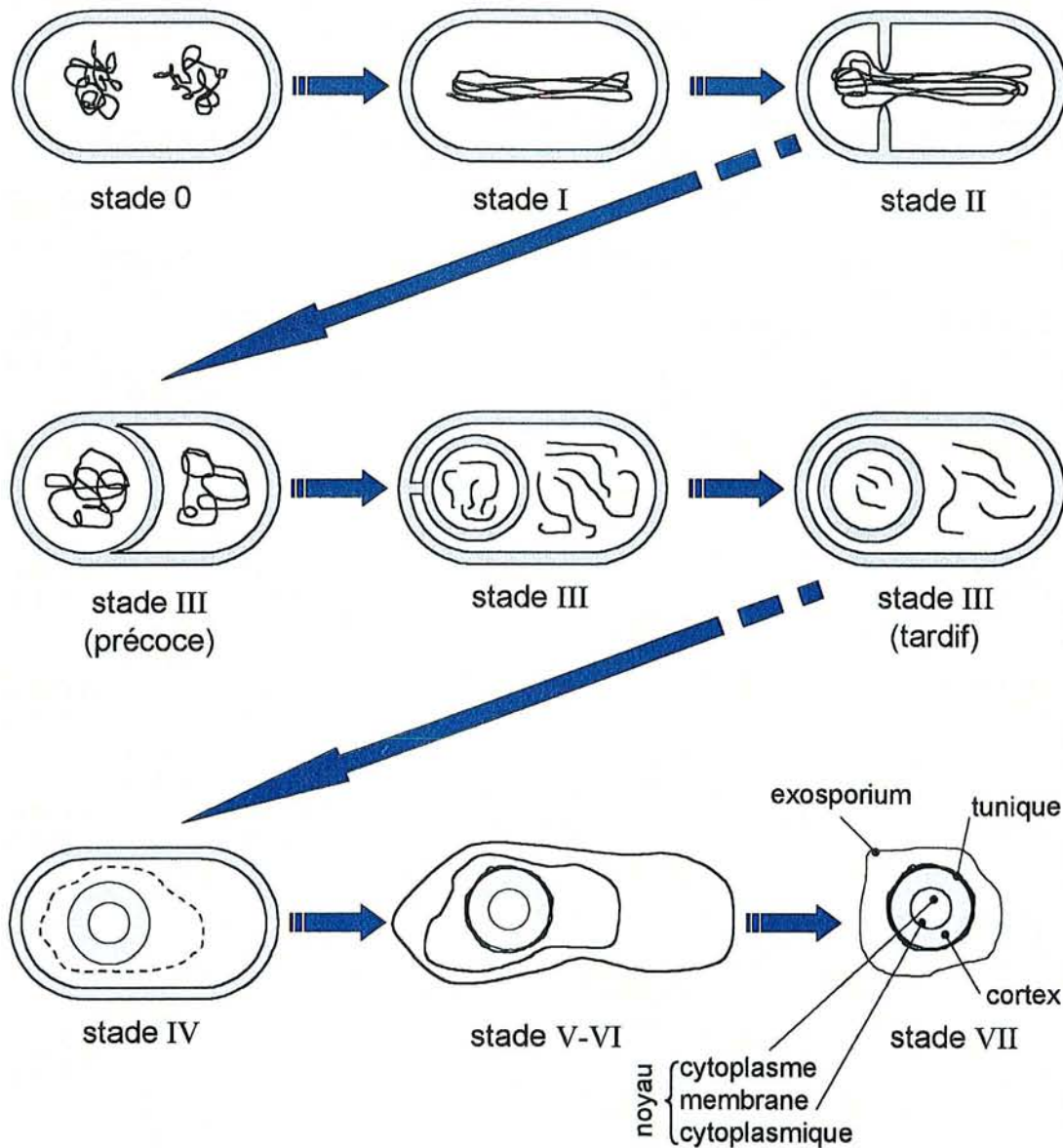
#### IV.2.3.1.1. Les différentes étapes du processus de sporulation.

Le processus de sporulation de *B. subtilis* dure de 5 à 8 heures et comprend plusieurs étapes (Errington, 1993; Losick, 1986) (Figure 19):

- ✓ Au stade 1, un filament axial, composé des deux chromosomes, se forme et des enzymes extracellulaires sont synthétisées.
- ✓ Au stade 2, on assiste à une septation par invagination de la membrane cytoplasmique entraînant, au stade 3, la formation de la présore.
- ✓ Au stade 4, une couche de peptidoglycane est déposée entre les deux membranes entourant la présore (formation du cortex).
- ✓ Au stade 5, des protéines structurales, appelées tuniques, sont déposées autour de la présore.
- ✓ Aux stades 6 et 7, on assiste à une maturation de la présore avec acquisition définitive des résistances. Celle-ci s'accompagne d'une absorption massive d'ions calcium et de la synthèse d'une grande quantité d'acide dipicolinique.

La cellule mère est alors lysée et la spore libérée.





**Figure 19:** Les différentes étapes du processus de sporulation chez *B. subtilis* (d'après Singleton, 1999).

IV.2.3.1.2. Facteurs sigma intervenant dans la sporulation.

La régulation de l'expression des gènes lors de la sporulation a lieu essentiellement au niveau transcriptionnel par la production de facteurs sigma secondaires. Ces facteurs sigma se combinent à l'ARN polymérase pour changer sa spécificité de fixation sur un promoteur (Tableau V).



**Tableau V:** Les différents facteurs sigma de *Bacillus subtilis* (d'après Haldenwang, 1995).

**A. Facteurs  $\sigma$  de phase végétative:**

Désignation du facteur sigma	Gène	Fonction
$\sigma^A$ ( $\sigma^{43}$ , $\sigma^{55}$ )	<i>sigA</i> ( <i>rpoD</i> )	Gènes d'entretien, sporulation précoce
$\sigma^B$ ( $\sigma^{27}$ )	<i>sigB</i>	Réponse générale aux stress
$\sigma^C$ ( $\sigma^{32}$ )	<i>sig C</i> ( <i>rpoH</i> )	Expression des gènes en phase stationnaire
$\sigma^D$ ( $\sigma^{28}$ )	<i>sigD</i> ( <i>flaB</i> )	Expression des gènes de chimiotaxie, flagellaires et d'autolysines
$\sigma^H$ ( $\sigma^{30}$ )	<i>sigH</i> ( <i>spoOH</i> )	Expression des gènes en phase stationnaire: gènes de compétence et gènes précoces de sporulation
$\sigma^L$	<i>sigL</i>	Expression des gènes codant des enzymes de dégradation

**B. Facteurs  $\sigma$  spécifiques de la sporulation:**

Désignation du facteur sigma	Gène	Fonction
$\sigma^E$ ( $\sigma^{29}$ )	<i>sigE</i> ( <i>spoIIGB</i> )	Expression des gènes précoces de la cellule mère
$\sigma^F$ ( $\sigma^{spoIIAC}$ )	<i>sigF</i> ( <i>spoIIAC</i> )	Expression des gènes précoces de la préspore
$\sigma^G$	<i>sigG</i> ( <i>spoIIIG</i> )	Expression des gènes tardifs de la préspore
$\sigma^K$ ( $\sigma^{27}$ )	<i>sigK</i> ( <i>spoIVCB-spoIIIC</i> )	Expression des gènes tardifs de la cellule mère

Le processus de différenciation est assuré par 5 facteurs sigma différents:  $\sigma^H$  (gène *spoOH*),  $\sigma^F$  (gène *spoIIAC* ou *sigF*),  $\sigma^E$  (gène *spoIIGB* ou *sigE*),  $\sigma^G$  (gène *spoIIIG* ou *sigG*) et  $\sigma^K$  (gène *sigK*).

Les trois premiers interviennent au niveau des stades précoces et les deux derniers aux stades tardifs de la sporulation (Haldenwang, 1995) (Figure 20).







l'expression des gènes ou le comportement en réponse à des signaux environnementaux ou physiologiques (Albright *et al.*, 1989; Bourret *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1989). Le 'sensor' du système à deux composants est une kinase à histidine qui s'autophosphoryle en réponse à un signal spécifique. Il existe différentes kinases servant de source de phosphate pour SpoOF, la plus connue étant KinA.

Une large variété de signaux avec des effets positifs ou négatifs sur la sporulation peuvent être pris en compte en jouant sur la compétition entre kinases et phosphatases pour ajuster le niveau de phosphorylation de SpoOA (Perego, 1998; Perego *et al.*, 1994). Chaque composant du phosphorelais peut servir à la fois comme cible d'une action régulatrice et porter une fonction enzymatique ce qui multiplie les potentialités de régulation (Figure 21):

✓ SpoOF est le substrat des kinases A et B notamment et transfère son groupement phosphate à SpoOB mais est aussi le substrat des Rap phosphatases (A et B). Ces phosphatases vont être elles-mêmes le sujet de régulations:

➡ La transcription du gène *rapA* (*gsiAA* ou *spoOL*) est dépendante du système à double composant ComA-ComP, intervenant dans le phénomène de compétence (Mueller and Sonenshein, 1992).

➡ Le gène *rapA* appartient à un opéron qui comporte un deuxième gène codant un régulateur de RapA: PhrA. Cette protéine, après clivage par une peptidase, est sécrétée sous forme d'un peptide de 19 acides aminés. Ce polypeptide pourrait emprunter le système SpoOK de transport d'oligopeptides pour agir à l'intérieur de la cellule en tant que régulateur négatif de l'activité phosphatase (Perego, 1997; Perego *et al.*, 1991; Perego and Hoch, 1996; Rudner *et al.*, 1991).

✓ SpoOB est une phosphotransférase (Tzeng *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1997) qui est la cible d'une régulation par une GTPase (ObgGTPase) (Trach and Hoch, 1989; Vidwans *et al.*, 1995).

✓ SpoOA est également la cible directe d'une phosphatase: SpoOE dont l'activité est probablement régulée par des signaux différents de ceux régulant les kinases (Ohlsen *et al.*, 1994).

#### IV.2.3.1.4. SpoOA~P et déclenchement de la sporulation.

Dans une culture sporulante de *B. subtilis*, seule une sous-population produit des spores matures. Les cellules qui ne produisent pas de spores se révèlent incapables d'exprimer certains gènes précoces de sporulation activés directement par SpoOA~P (Chung *et al.*, 1994).



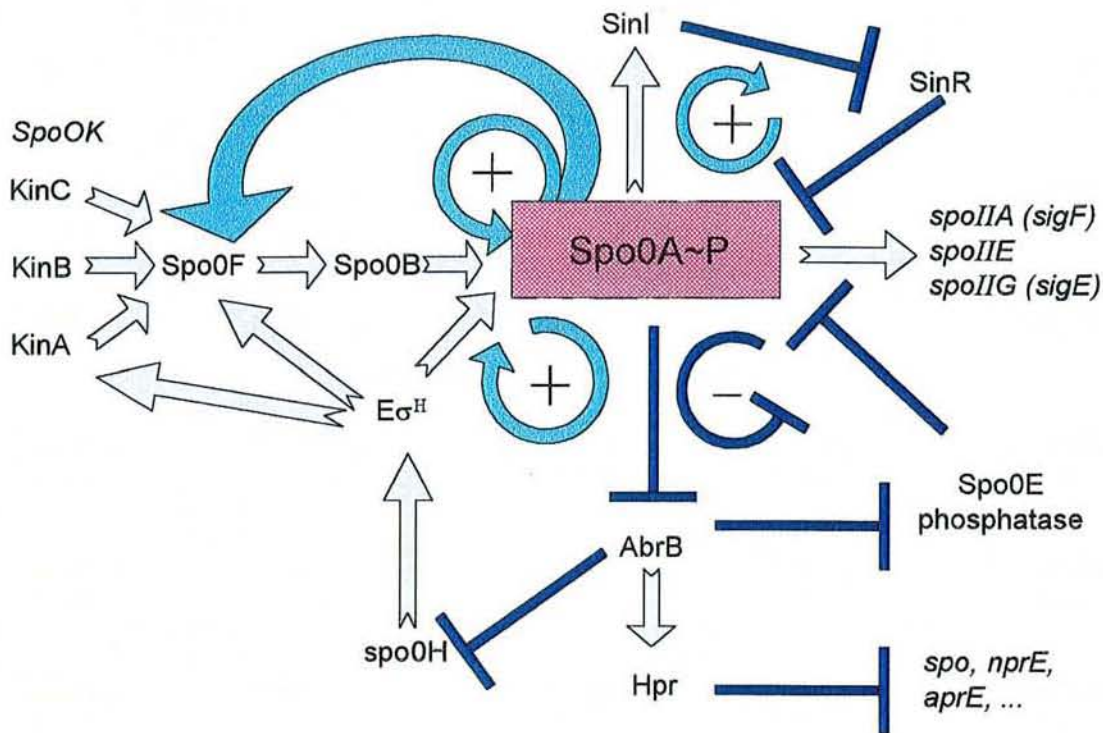
Le déclenchement de la sporulation, correspondant à l'expression des gènes précoces de sporulation, serait uniquement dépendant de la quantité de SpoOA~P qui doit être supérieure à un seuil. Le taux critique de SpoOA~P est contrôlé par le phosphorelais en réponse à toutes les conditions nécessaires au déclenchement de la sporulation (Burbulys *et al.*, 1991; Grossman, 1991; Ireton and Grossman, 1992; Ireton *et al.*, 1993). Le taux critique de SpoOA~P nécessaire au déclenchement de la sporulation n'est établi dans une fraction significative des cellules seulement lorsque de multiples signaux environnementaux sont réunis simultanément pour activer le phosphorelais.

Il existe des boucles de rétro-régulation positive qui servent à maintenir et à amplifier les composants requis pour le déclenchement de la sporulation (Strauch, 1993):

✓ SpoOA~P active directement la transcription de *spoOA* (Strauch *et al.*, 1992) et *spoOF* (Strauch, 1993; Yamashita *et al.*, 1986). Dans les deux cas, l'augmentation d'expression nécessite également le facteur sigma codé par *spoOH*:  $\sigma^H$  (Predich *et al.*, 1992). De plus, la transcription de *spoOH* et de *kinA* est indirectement activée par SpoOA~P. En effet, en diminuant l'expression de *abrB*, SpoOA~P lève la répression Abr-dépendante de l'expression de *spoOH* (Weir *et al.*, 1991). L'augmentation de l'expression de *spoOH* conduit probablement à l'augmentation de la transcription de *kinA*, gène sous contrôle de  $\sigma^H$  (Predich *et al.*, 1992) (Figure 22).

✓ SpoOA et SpoOH sont nécessaires pour inhiber SinR, répresseur de la transcription de *spoOA* et de quelques gènes *spoII* (Mandic-Mulec *et al.*, 1992). SinR est inhibée par la protéine SinI (Bai *et al.*, 1993) dont la transcription du gène est dépendante de SpoOA~P et de  $\sigma^H$  (Gaur *et al.*, 1988) (Figure 22).





**Figure 22:** Boucles de régulation positive et négative contrôlant la production et l'accumulation de SpoOA~P chez *B. subtilis* (d'après Grossman, 1995).

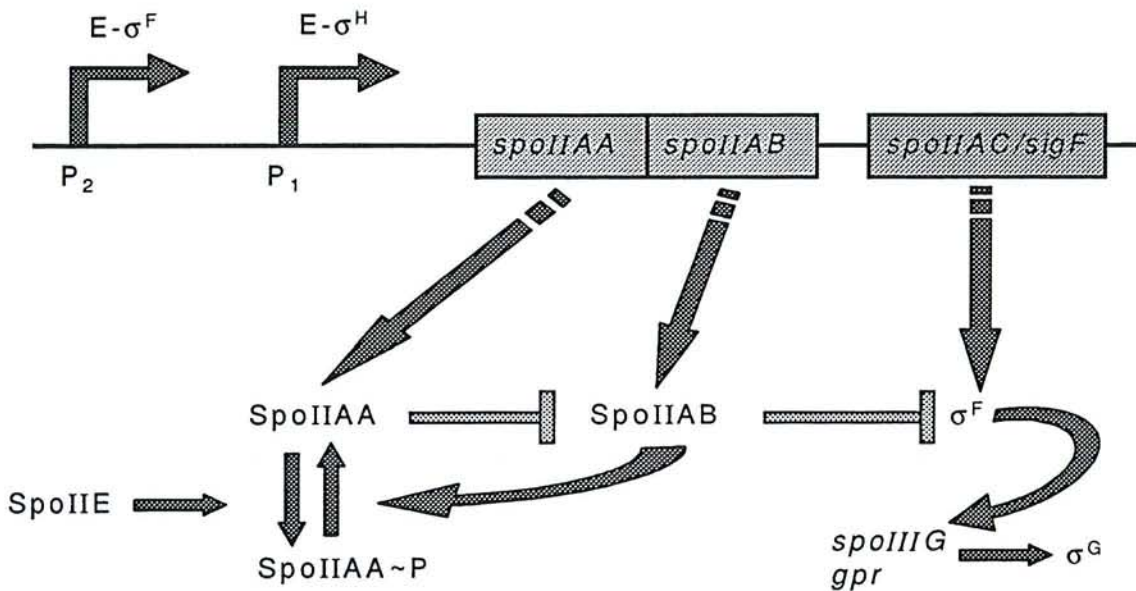
La conséquence de l'augmentation d'expression de *spoOF*, *spoOA*, *spoOH*, *kinA* et *sinI* serait d'accroître encore plus la quantité de SpoOA~P. Ainsi, une fois atteint le seuil critique pour SpoOA~P, la boucle de rétrorégulation positive est activée et conduit à une amplification en cascade de SpoOA~P. Cela fournit à la cellule une quantité suffisante de SpoOA~P pour activer l'expression des gènes tels que *spoIIA (sigF)* et *spoIIG (sigE)* et assurer une expression suffisante de ces gènes jusqu'à ce que le stade suivant soit atteint.

Il existe, par ailleurs, une boucle de régulation négative qui permet d'éviter une accumulation de SpoOA~P dans les cellules qui n'ont pas atteint le seuil nécessaire pour induire l'expression des gènes directement activés par SpoOA~P (Figure 22). Le régulateur clé est SpoOE, phosphatase de SpoOA~P (Ohlsen *et al.*, 1994; Perego and Hoch, 1991). La transcription de *spoOE* est stimulée indirectement par SpoOA~P via AbrB. L'augmentation de la transcription des gènes réprimés par AbrB tels que *spoOE* nécessite un pool moins important de SpoOA~P et intervient plus tôt dans le développement que l'induction des gènes directement activés par SpoOA~P.

#### IV.2.3.1.5. Contrôle de l'activité de $\sigma^F$ .

La réussite du processus de sporulation chez *B. subtilis* dépend de l'activation du premier facteur sigma spécifique de la sporulation:  $\sigma^F$  (Errington, 1993).

$\sigma^F$ , ainsi que deux protéines régulatrices SpoIIAA et SpoIIAB, est synthétisé avant la septation asymétrique. Le facteur anti-sigma SpoIIAB maintient  $\sigma^F$  dans un complexe inactif (Duncan and Losick, 1993; Min *et al.*, 1993) et le facteur anti-anti-sigma SpoIIAA sous forme inactive par phosphorylation de la protéine sur un résidu sérine spécifique (Diederich *et al.*, 1994; Magnin *et al.*, 1996; Min *et al.*, 1993; Najafi *et al.*, 1995). Après la septation asymétrique, l'activation de  $\sigma^F$  dans la préspore est déclenchée par une phosphatase spécifique SpoIIE qui catalyse la déphosphorylation de SpoIIAA~P (Duncan *et al.*, 1995). Lorsqu'elle est déphosphorylée, SpoIIAA permet le relargage de  $\sigma^F$  en séquestrant le facteur anti- $\sigma$  SpoIIAB (Arigoni *et al.*, 1996; Duncan *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Feucht *et al.*, 1996; Magnin *et al.*, 1997; Najafi *et al.*, 1997) (Figure 23).



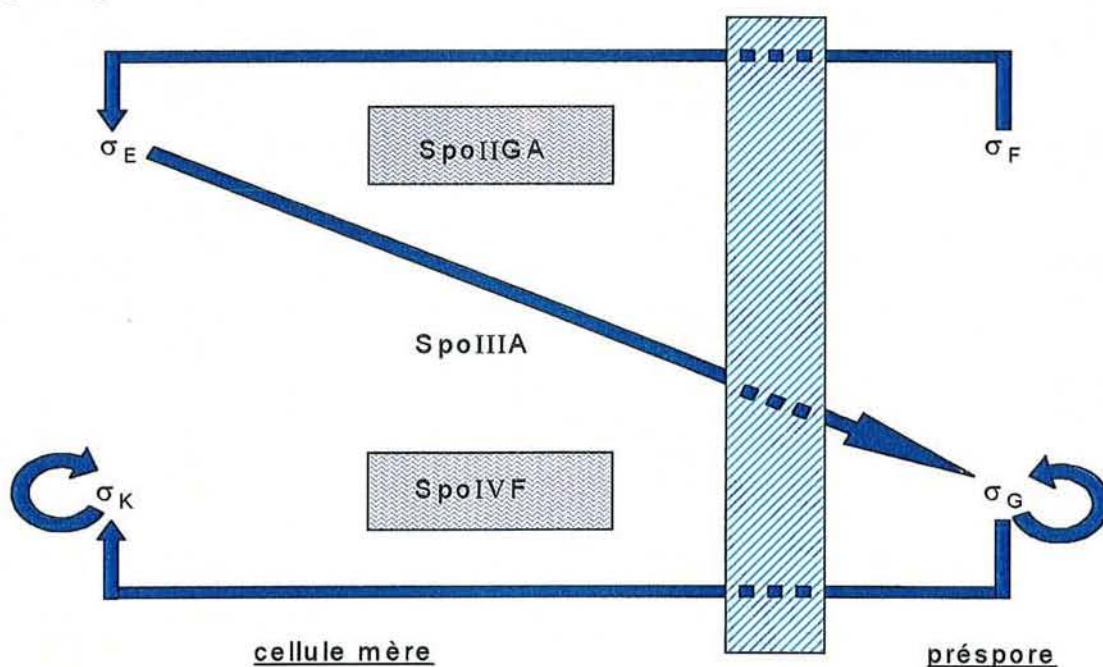
**Figure 23:** Représentation schématique des mécanismes de contrôle s'exerçant sur  $\sigma^F$  chez *B. subtilis*.

SpoIIE est une protéine qui se fixe à la membrane, contenant dans sa partie N terminale des segments s'insérant dans le septum asymétrique séparant la préspore de la cellule-mère (Arigoni *et al.*, 1995; Barak *et al.*, 1996). L'activité phosphatase est portée par la région C terminale (Duncan *et al.*, 1995). La fusion de SpoIIE à la membrane permettrait d'assurer une orientation spécifique de la protéine et donc une activation de  $\sigma^F$  uniquement dans la préspore (Arigoni *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998).



L'activation de  $\sigma^F$  dans la préspore, juste après la septation asymétrique, n'induit pas seulement un programme spécifique d'expression de gènes dans la préspore mais conduit un signal intracellulaire à travers le septum permettant l'activation du premier facteur de transcription spécifique de la cellule-mère:  $\sigma^E$  (Stragier and Losick, 1996) (Figure 24).

$\sigma^F$  permet, par ailleurs, la transcription du gène codant  $\sigma^G$  (Sun *et al.*, 1991) qui fait aussi l'objet d'une régulation négative.  $\sigma^G$  ne devient actif que plus tard au cours de la sporulation après invagination de la membrane pour former la préspore. La répression de  $\sigma^G$  serait également contrôlée par SpoIIAB (Kellner *et al.*, 1996). Son activation est dépendante de SpoIIIA mais le mécanisme d'action n'est pas élucidé (Karmazyn-Campelli *et al.*, 1989) (Figure 24).



**Figure 24:** Rôle de  $\sigma^F$  dans l'activation du facteur  $\sigma^E$  et des facteurs de sporulation tardifs  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$  (Stragier and Losick, 1996).

*SpoIIGA: aspartyl protéase permettant l'activation par protéolyse de  $\sigma^E$  (activée indirectement par  $\sigma^F$  via le produit du gène spoIIR).*

*L'activation de  $\sigma^G$  requiert le produit du gène spoIIIA, de même l'activation de  $\sigma^K$  fait intervenir le produit des gènes spoIV F (A et B) via un signal provenant de la préspore.*

*$\sigma^G$  et  $\sigma^K$  autorégulent leur production en transcrivant leur propre gène.*

#### IV.2.3.1.6. Contrôle de l'activité de $\sigma^K$ .

Trois niveaux de régulation de  $\sigma^K$  existent (Errington, 1993; Haldenwang, 1995):



☛ au niveau du gène: le gène sigK est créée par recombinaison site spécifique entre spoIVCB et spoIIIC faisant intervenir une recombinase codée par l'élément d'ADN (SKIN) délété lors du réarrangement)

☛ au niveau transcriptionnel par  $\sigma E$

☛ au niveau de l'activité de  $\sigma K$ :  $\sigma K$  est synthétisé sous forme immature pro $\sigma K$ .

Comme pour  $\sigma E$ , la proséquence permet de séquestrer le facteur sigma au niveau de la membrane et d'empêcher le facteur sigma de jouer son rôle.

#### IV.2.3.2. Conditions physiologiques déclenchant la sporulation.

Chez *Bacillus subtilis*, plusieurs conditions physiologiques affectant la sporulation ont été mises en évidence. Des conditions externes, telles que carence nutritionnelle (dont le signal serait une chute de la concentration intracellulaire en GTP), densité cellulaire et présence de glucose, ou internes, telles que synthèse d'ADN, dégâts sur l'ADN ou activité du cycle de Krebs, affecteraient la sporulation de *B. subtilis* (Grossman, 1995).

Contrairement à *Bacillus subtilis*, la sporulation chez les clostridia ne serait pas provoquée par une carence mais par un arrêt de croissance en présence d'un excès de carbone ou d'azote ou suite à une exposition à l'oxygène. Parmi les facteurs entraînant une diminution de la croissance chez la plupart des clostridia, figurent la composition nutritionnelle du milieu (c'est-à-dire une source de carbone moins facilement métabolisable), une accumulation de produits du métabolisme et une diminution du pH (Sauer *et al.*, 1995).

Chez plusieurs espèces de clostridia, le déclenchement de la sporulation est associé à une autolyse d'une proportion importante des cellules. Les composants cellulaires relargués pourraient apporter le carbone et l'énergie qui semblent nécessaires tout au long du processus de sporulation (Hickey and Johnson, 1981).

Il semble exister deux catégories de clostridia 'saccharolytiques' suivant que la répression catabolique s'exerce ou non sur la sporulation (Woods and Jones, 1986). Chez *Clostridium thermosaccharolyticum*, la sporulation est inhibée en présence d'un excès de glucose (Hsu and Ordal, 1969). Cependant, le glucose pourrait servir de source de carbone et d'énergie à condition d'être fourni en quantité limitée par la technique de culture en continu. Chez *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* et *C. acetobutylicum*, la sporulation ne semble pas soumise à la répression catabolique (Woods and Jones, 1986).

Par ailleurs, plusieurs méthylxanthines augmentent la sporulation chez *C. perfringens* (Labbé and Noln, 1981; Sacks and Thompson, 1977). Ces substances provoqueraient une diminution du pool de GTP intracellulaire entraînant une sporulation comme chez *B. subtilis*.

Enfin, un facteur de sporulation, résistant à la chaleur et à un pH acide a également été décrit chez *C. perfringens* (Shih and Labbé, 1996) comme pour *B. subtilis* (Grossman and Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993).

## **V. Implication d'une protéine fer-soufre particulière, la rubrédoxine, dans le transport des électrons et la réponse au stress chez les bactéries.**

### **V.1. Protéines fer-soufre et rubrédoxine.**

Les protéines fer-soufre constituent une des classes de protéines impliquées dans les réactions de transfert d'électrons nécessaires au bon fonctionnement d'une cellule. Elles regroupent des transporteurs d'électrons (ferrédoxines et rubrédoxines) et des enzymes possédant ou non d'autres groupements prosthétiques (Palmer and Reedijk, 1991).

D'après le comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie (Palmer and Reedijk, 1991), les rubrédoxines sont définies comme des protéines fer-soufre ne contenant pas de soufre inorganique et caractérisées par la présence d'un atome de fer lié, dans un arrangement tétraédrique, à 4 résidus cystéine de la chaîne polypeptidique. Une transition  $Fe^{3+} / Fe^{2+}$  accompagne le transfert d'électron, réalisé à un potentiel d'oxydoréduction allant de - 60 à + 20 mV pour la rubrédoxine.

### **V.2. La rubrédoxine: une protéine 'ubiquitaire'.**

La rubrédoxine a été découverte pour la première fois chez *Clostridium pasteurianum*, comme contaminant rouge lors de la purification de la ferrédoxine (Mortenson, 1964). Elle a ensuite été isolée sous sa forme cristalline par Lovenberg et Sobel (Lovenberg and Sobel, 1965), qui ont montré qu'il s'agissait d'une protéine à fer non hémique qui pouvait, *in vitro*, se substituer à la ferrédoxine dans certaines réactions d'oxydoréduction.

Des rubrédoxines ont ensuite été isolées d'un certain nombre de bactéries, incluant d'autres clostridia (Gérard *et al.*, 1999; Ragsdale and Ljungdahl, 1984; Seki *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1980), des bactéries sulfato-réductrices (Bruschi, 1976a, b; Hatchikian, 1979; LeGall *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1989), des bactéries vertes photosynthétiques (Meyer *et al.*, 1971; Steinmetz and Fischer, 1981; Woodley and Meyer, 1987), d'autres bactéries anaérobies telles que *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Bachmayer *et al.*, 1967), *Megasphaera elsdenii* (Bachmayer *et al.*, 1968), *Butyribacterium methylotrophicum* (Saeki *et al.*, 1989a, b) et l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* (Blake *et al.*, 1991). Toutes ces rubrédoxines ont une masse moléculaire voisine de 6 kDa. Deux rubrédoxines ont également été isolées de la



bactérie aérobie *Pseudomonas oleovorans* (Benson *et al.*, 1971; Peterson *et al.*, 1968). Elles se distinguent par leur taille (15 et 19 kDa) et par la présence de deux atomes de fer.

### V.3. Structure de la rubrédoxine.

#### V.3.1. Structure primaire de la rubrédoxine.

Des résidus sont conservés dans toutes ces rubrédoxines. Il s'agit des 4 cystéines impliquées dans la liaison du fer (C6, C9, C39, C42, la numérotation étant celle de la rubrédoxine de *C. pasteurianum*), de 5 acides aminés aromatiques (Y11, Y13, F30, W37, F49), d'une proline (P40), de 2 glycines (G10, G43), et d'une lysine (K46). De plus, de nombreuses positions sont occupées par un même résidu dans la plupart de ces rubrédoxines et certaines positions sont occupées par des acides aminés de propriétés similaires : un acide aminé aromatique en position 4 (Y, F, ou W pour les rubrédoxines de bactéries thermophiles), un acide aminé hydrophobe pour les positions 8 et 33 (V, I, L), et 44 (V ou A). Toutes les rubrédoxines, excepté celle de *Pyrococcus furiosus*, commencent par une méthionine, parfois formylée (Figure 25).



	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50																																			
<i>Cpa</i>	MKKY	TCTV	CGYI	YNPED	GD	PD	NGV	NP	GTDF	KDI	PDDW	VCP	LCG	VG	KDQ	FEE	VEE																													
<i>Cpe</i>	MKKF	ICDV	CGYI	YDPA	VGD	PD	NGVE	PGTE	FKDI	PDDW	VCP	LCG	V	DKS	QF	SE	TE																													
<i>Cth</i>	MEKW	QCTV	CGYI	YDPE	VGD	PT	QNI	PP	GTK	FEDL	PDDW	VCP	DCG	V	GK	DQ	FEKI																													
<i>Cst</i>	MTKY	VCTV	CGYV	YDPE	VGD	PD	NNIN	PGT	SFQDI	PEDW	VCP	LCG	V	GK	DQ	FEE	EEA																													
<i>Dgi</i>	MDIY	VCTV	CGYE	YDPA	KGD	PD	SGIK	PGT	KFEDL	PDDW	ACP	VCG	A	SK	DA	FE	EK																													
<i>DvM</i>	MKKY	VCTV	CGYE	YDPA	E	GD	PD	NGV	KPGT	A	FEDV	PADW	VCP	ICG	A	PK	SE	FEP																												
<i>DvH</i>	MKKY	VCTV	CGYE	YDPA	E	GD	PD	NGV	KPGT	S	FDDL	PADW	VCP	VCG	A	PK	SE	FEEA																												
<i>Dde</i>	MQKY	V	CVN	V	CGYE	YDPA	EHD	NVP		FDQL	PDDW	CCP	VCG	V	SK	DQ	F																													
<i>Pfu</i>	AKWV	CKI	CGYI	YDE	DAG	PD	NGI	SP	GTK	FEE	L	PDDW	VCP	ICG	A	PK	SE	F	E	K	L	E																								
<i>Bme</i>	MQKY	VCDI	CGYV	YDPA	VGD	PD	NGV	APGT	A	FADL	PEDW	VCP	ECG	V	SK	DE	F	S	P	E	A																									
<i>Mel</i>	MDKY	ECSI	CGYI	YDE	A	E	GD	D	GNVA	A	G	T	K	FADL	PADW	VCP	T	C	G	A	D	K	D	A	F	V	K	M																		
<i>Pae</i>	MQK	F	E	C	T	L	CGYI	YD	P	A	L	V	G	P	D	T	P	D	Q	D	G	A	F	E	D	V	S	E	N	W	V	C	P	L	C	G	A	G	K	E	D	F	E	V	Y	E
<i>Hmo</i>	MKKY	G	C	L	V	CGYV	YD	P	A	K	G	D	P	D	H	G	I	A	P	G	T	A	F	E	D	L	PADW	VCP	LCG	V	SK	DE	F	E	P	L										
<i>Chl</i>	MQKY	V	C	S	V	CGYV	YD	P	A	D	G	E	P	D	D	I	D	P	G	T	G	F	E	D	L	PEDW	VCP	VCG	V	D	K	D	L	F	E	P	E	S								
<i>Cbu</i>	MEKY	I	C	T	V	CGYI	YDE	A	A	G	D	PD	NGV	APGT	K	F	E	D	I	PDDW	VCP	LCG	V	PK	S	D	F	E	K	E	Q															

**Figure 25: Alignement des séquences de rubrédoxine de différents micro-organismes.**

Les séquences de *C. pasteurianum* (*Cpa*), *C. perfringens* (*Cpe*), *C. thermosaccharolyticum* (*Cth*), *C. sticklandii* (*Cst*), *Desulfovibrio gigas* (*Dgi*), *D. vulgaris* souche Miyazaki (*DvM*), *D. vulgaris* souche Hildenborough (*DvH*), *D. desulfuricans* (*Dde*), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), *Butyribacterium methylotrophicum* (*Bme*), *Megasphaera elsdenii* (*Mel*), ont été répertoriées par Mathieu *et al.* (Mathieu *et al.*, 1992). Les séquences restantes: *Peptococcus aerogenes* (*Pae*), *Heliobacillus mobilis* (*Hmo*), *Chlorobium thiosulfatophilum* (*Chl*) et *C. butyricum* DSM 5431 (*Cbu*), ont été décrites respectivement par Bachmeyer *et al.* (Bachmeyer *et al.*, 1968), Lee *et al.* (Lee *et al.*, 1995), Woodley et Meyer (Woodley and Meyer, 1987) et Gérard *et al.* (EMBL numéro d'accès no. Y11875).

Les résidus conservés se situent au voisinage des cystéines liant le fer et dans le cœur hydrophobe de la protéine :

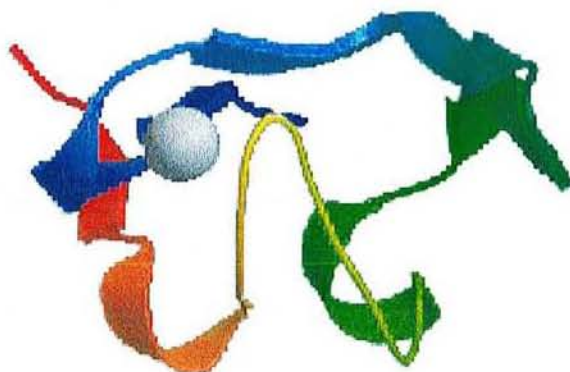
✓ Du côté N-terminal, on retrouve la séquence aro4-X-C6-X-ho-C9-G10-Y11-Xa-Y13 où aro est un acide aminé aromatique et ho un acide aminé hydrophobe. Xa est une valine ou une isoleucine pour toutes les rubrédoxines sauf pour celles des désulfovibrios où cette position est occupée par un glutamate.

✓ Du côté C-terminal, on retrouve la séquence W37-X-C39-P40-X-C42-G43-ho-X-K46.

### V.3.2. Structure tridimensionnelle de la rubrédoxine.

Il ressort des structures obtenues par cristallisation de la rubrédoxine (Adman *et al.*, 1991; Day *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1987; Watenpaugh *et al.*, 1980) que cette protéine est une

protéine de forme globulaire, formée de 6 brins antiparallèles ne présentant pas de régions étendues en feuillet  $\beta$  ou en hélice  $\alpha$  (Figure 26). Le fer est situé vers la surface de la molécule, enfermé entre deux boucles hydrophobes de la chaîne peptidique. Ces boucles correspondent aux segments 3-13 et 36-46 comportant chacun deux cystéines impliquées dans la liaison du fer. Une autre grande boucle, composée des résidus 15 à 27, forme une sorte de bras situé à l'opposé du centre fer-soufre. Le repliement de la chaîne peptidique amène à proximité 6 acides aminés aromatiques (dont 5 sont conservés chez toutes les rubrédoxines) et les chaînes aliphatiques des résidus V24, I33 et V44 (Figure 26).



**Figure 26:** Structure tridimensionnelle de la rubrédoxine de *Clostridium pasteurianum* (tirée de la banque de données Protein Data Base, numéro d'accès 5RXN).

Les flèches indiquent les brins antiparallèles de la rubrédoxine et l'atome de fer est représenté entre les deux boucles contenant les cystéine-ligands (sphère grise).

Ce cœur hydrophobe contribue largement à la stabilisation de la molécule, en plus des liaisons hydrogènes impliquant les atomes de la chaîne principale, des chaînes latérales des acides aminés conservés et des molécules d'eau (Frey *et al.*, 1987).

#### V.4. Rôle de la rubrédoxine.

La (les) fonction(s) physiologique(s) de la rubrédoxine demeure(nt) incertaine(s), particulièrement chez les clostridia. Un rôle a été proposé pour la rubrédoxine chez certaines bactéries. Chez *Pseudomonas oleovorans* et *Acinetobacter calcoaceticus*, les rubrédoxines seraient impliquées dans l'hydroxylation des alcanes (Geissdörfer *et al.*, 1995; Kok *et al.*, 1989; Ueda *et al.*, 1972). La rubrédoxine de *Desulfovibrio gigas* interviendrait quant à elle dans l'utilisation de l'oxygène (Chen *et al.*, 1993a, b; Gomes *et al.*, 1997).



De plus, quelques fonctions ont été suggérées sans être confirmées par la suite. Ainsi, la rubrédoxine de *Clostridium perfringens* pourrait participer à la réduction des nitrates (Seki *et al.*, 1988). Celle de *Clostridium thermoaceticum* pourrait servir d'accepteur d'électrons de la monoxyde de carbone (CO) déshydrogénase (Ragsdale *et al.*, 1983).

Le potentiel d'oxydoréduction relativement élevé des rubrédoxines (-60 à +20 mV) rend peu probable le fait que cette protéine prenne part au métabolisme central des bactéries anaérobies qui requièrent des électrons à un potentiel beaucoup plus bas (-400 à -200 mV). Des expériences *in vitro* ont toutefois montré que la rubrédoxine pouvait se substituer à la ferrédoxine dans certaines réactions chez *C. pasteurianum* (Lovenberg and Sobel, 1965). Cependant, ce remplacement n'a sans doute pas lieu *in vivo*, même en cas de déficience en ferrédoxine (carence en fer par exemple) car la flavodoxine remplit alors ce rôle (Knight and Hardy, 1966).

De nombreuses protéines fer-soufre sont déstabilisées par exposition à des oxydants, cette sensibilité peut permettre à certaines de ces protéines, telles que la protéine FNR chez *E. coli*, de servir de détecteur de la présence d'oxygène ('oxygen sensor') (Rouault and Klausner, 1996). Par ailleurs, certaines protéines fer-soufre pourraient protéger les cellules face à un stress oxydatif, comme par exemple la désulfoferrodoxine (Pianzola *et al.*, 1996) ou la rubrérythrine (Lumppio *et al.*, 1997). Le gène de la rubrérythrine est co-transcrit avec le gène de la rubrédoxine chez *D. vulgaris* ce qui suggère que la rubrédoxine pourrait être un partenaire redox de la rubrérythrine (Lumppio *et al.*, 1997).

Par ailleurs, chez *C. acetobutylicum*, la teneur en rubrédoxine est plus élevée lorsque le pH diminue (Marczak *et al.*, 1985) et une protéine de 21 kDa (HSP 21), possédant une similarité avec la rubrédoxine, est induite précocement lors d'un choc thermique. Cette dernière pourrait être un régulateur de la réponse à un choc thermique chez cette bactérie (Bahl *et al.*, 1995).

Ainsi, différents rôles, notamment dans la protection face à un stress thermique ou oxydatif, sont proposés pour la rubrédoxine chez les bactéries anaérobies mais aucun n'a pour l'instant été démontré.

## VI. Approche du travail.

L'hydrolyse de la cellulose par les bactéries anaérobies constitue l'étape limitante du processus de biométhanisation des déchets solides municipaux.



L'optimisation de ce procédé ne peut donc se concevoir sans une connaissance approfondie de la cellulolyse et des micro-organismes impliqués dans ce processus, parmi lesquels les bactéries cellulolytiques.

Nous avons donc entrepris d'analyser le métabolisme d'un de ces micro-organismes cellulolytiques, *Clostridium cellulolyticum*. Pour cela, nous avons mis en œuvre des cultures en chemostat puisque cette technique est un outil de choix pour l'analyse des régulations métaboliques bactériennes.

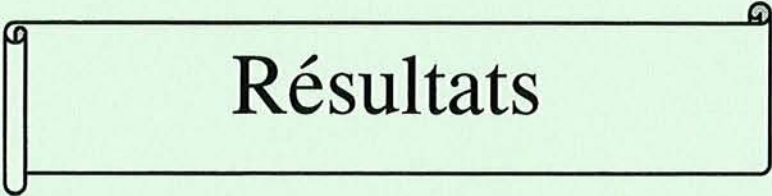
Ces cultures ont dévoilé un facteur important de limitation de la croissance de cette bactérie, ce qui nous a conduit par la suite à (i) essayer de lever ce blocage métabolique en utilisant un autre milieu de culture, (ii) décortiquer le processus d'inhibition en étudiant sa cinétique d'apparition et en le recréant artificiellement.

Dans le modèle de colonisation proposé pour *C. cellulolyticum*, l'hydrolyse totale ou la saturation des sites du substrat insoluble de cette bactérie conduit au relargage de celle-ci dans le milieu environnant. Les bactéries se retrouvent alors en compétition avec d'autres bactéries pour l'utilisation des substrats notamment carbonés.

L'une des voies permettant à la bactérie de se soustraire à cette situation de stress carboné est la sporulation. Nous avons donc entrepris d'analyser les conditions requises pour ce processus de différenciation, d'importance stratégique pour la survie de la bactérie mais qui est très mal connu.

*B. subtilis*, modèle pour les bactéries Gram + sporulées, peut survivre même lorsque les conditions requises pour une sporulation efficace ne sont pas réunies grâce à l'acquisition d'un phénotype de résistance qui fait intervenir des protéines de stress. Nous avons recherché l'existence de tels systèmes chez *C. cellulolyticum* en étudiant la réponse à différents stress de cette bactérie.

Enfin, nous avons testé l'hypothèse de l'implication d'une protéine fer-soufre particulière, la rubrédoxine, dans la réponse au stress de cette bactérie en analysant le gène correspondant, son transcrit et les variations de la teneur cellulaire en rubrédoxine.



## Résultats

## **CHAPITRE 2. ETUDE DU CATABOLISME DU CELLOBIOSE PAR CLOSTRIDIUM CELLULOLYTICUM CULTIVE SUR MILIEU COMPLEXE EN CULTURE CONTINUE.**

### **I. Introduction.**

*Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 est une bactérie cellulolytique mésophile, isolée d'herbe en décomposition (Petitdemange *et al.*, 1984). Comme d'autres bactéries cellulolytiques (Leschine and Canale-Parola, 1983; Strobel, 1995; Thurston *et al.*, 1993), cette bactérie ne catabolise que de faibles quantités de substrat à cause d'une inhibition précoce de son métabolisme et de sa croissance (Cailliez *et al.*, 1992; Giallo *et al.*, 1983). Une valeur moyenne de 250 mg de cellules par litre est obtenue pour des cultures réalisées avec une concentration de cellobiose de 2 g/l par opposition à une production de 3 à 6 g/l pour d'autres clostridia qui peuvent consommer jusqu'à 30 à 100 g/l de substrat carboné (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Cette inhibition de croissance n'est pas due à une quelconque carence en un élément nutritif ou à une inhibition par les produits terminaux (Giallo *et al.*, 1983). Il s'est avéré nécessaire d'identifier les facteurs responsables de cette inhibition précoce afin de pouvoir, par la suite, lever cette inhibition pour optimiser la croissance de cette bactérie.

L'outil de choix pour étudier les régulations métaboliques d'une bactérie est la culture continue. Cette technique permet de cultiver les cellules à une vitesse de croissance donnée, dans des conditions de culture constantes. L'apport des nutriments et l'élimination des déchets sont réalisés de façon continue et certains paramètres physiques peuvent être contrôlés (pH, température, oxygénation, ...). Par ailleurs, cette technique permet l'étude de la croissance bactérienne à des concentrations en nutriments très faibles, proches de celles présentes dans un environnement naturel. Cette méthode de culture a été utilisée pour déterminer les caractéristiques du catabolisme du cellobiose par *C. cellulolyticum* cultivé sur milieu complexe, puisque ce substrat est le produit majeur de la dégradation de la cellulose notamment chez *C. thermocellum* (Ng and Zeikus, 1982; Strobel, 1995).

### **II. Résultats.**

Les résultats de cette étude du catabolisme du cellobiose par *C. cellulolyticum* sur milieu complexe sont présentés dans l'article intitulé: 'Metabolism of cellobiose by



*Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth' (Microbiology).

# Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth

S. Payot, E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye and H. Petitdemange

Author for correspondence: H. Petitdemange. Tel: +33 3 83 91 20 53. Fax: +33 3 83 91 25 50.  
e-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr

Laboratoire de Chimie  
Biologique I, Université  
Henri Poincaré, Faculté des  
Sciences, BP 239, 54506  
Vandoeuvre-lès-Nancy  
cedex, France

**Previous results indicated that molar growth yields are reduced when *Clostridium cellulolyticum* is cultured in media containing cellobiose concentrations greater than 1 g l<sup>-1</sup>. Continuous cultures were examined to determine the physiological basis of these poor growth yields. Acetate was the main product of *C. cellulolyticum* metabolism, whereas the production of reduced compounds such as ethanol or lactate was low. Such patterns of product formation were accompanied by a 12-fold increase in intracellular NADH concentration when the cellobiose flow was increased. Catabolic enzymic activities were measured *in vitro*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), acetate kinase and phosphoroclastic activities were found at similar levels as in cells metabolizing higher substrate concentrations. In contrast, lactate dehydrogenase activity was low and correlated with the rate of lactate production. Furthermore, an inhibition of GAPDH activity by high NADH/NAD<sup>+</sup> ratios was established. These results suggested that a decreased NADH reoxidation could be responsible for limiting *C. cellulolyticum* growth. Lactate and ethanol production were not sufficient to balance out the NADH produced in the GAPDH step of glycolysis. One consequence of poor NADH reoxidation would be an increase in intracellular concentration of NADH, which in turn could inhibit GAPDH activity.**

**Keywords:** *Clostridium cellulolyticum*, continuous culture, cellobiose, NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, growth inhibition

## INTRODUCTION

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth and is the chief component of plant biomass. A community of physiologically diverse micro-organisms is responsible for the anaerobic degradation of cellulose (Beguin & Aubert, 1994). In most natural environments, mesophilic cellulolytic clostridia play a major role in cellulose decomposition (Leschine, 1995). Fundamental studies of cellulolytic clostridia were developed about 20 years ago and were devoted essentially to cellulase systems including the well-characterized cellulosome of *Clostridium thermocellum* (Beguin & Aubert, 1994). The cellulosome, which is cell-associated, exhibits multiple functions, including both cell adhesion and hydrolysis of

lignocellulosic compounds (see Felix & Ljungdahl, 1993; Bayer *et al.*, 1996 for reviews). The cellulosome is considered to mediate the cohesive association of cellulases and xylanases and to promote their synergistic action, avoiding the production of free extracellular enzymes. It is clear that the efficiency of cellulose hydrolysis correlates with the population of cellulolytic bacteria and the tight adhesion of these bacteria to their substrate (Weimer, 1996). Bacterial growth on cellulose is rather difficult to follow (Gelhaye *et al.*, 1993b) and most studies that focused on carbon metabolism in these bacteria were performed with cellobiose, the major end-product of the degradation process, which is taken up and assimilated by the cells (Ng & Zeikus, 1982; Giallo *et al.*, 1983; Strobel, 1995; Strobel *et al.*, 1995).

*Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 was isolated from decayed grass (Petitdemange *et al.*, 1984) and its growth cycle in contact with cellulose was described by

**Abbreviations:** fd, ferredoxin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Gelhaye *et al.* (1993a, b). As found with other cellulolytic clostridia, due to early inhibition of metabolism and growth, *C. cellulolyticum* classically uses low quantities of sugar (Giallo *et al.*, 1983; Cailliez *et al.*, 1992). A mean value of 250 mg dry weight cells l<sup>-1</sup> was found for cultures grown with a cellobiose concentration of 2 g l<sup>-1</sup>; above this value, no further increase in biomass occurred. In comparison with other clostridia such as *C. butyricum* or *C. acetobutylicum*, these values are low; biomasses of 3–6 g l<sup>-1</sup> are usually obtained and 30–100 g l<sup>-1</sup> carbohydrate catabolized (Vasconcelos *et al.*, 1994; Abbad-Andaloussi *et al.*, 1995). No increase in growth yield was observed by increasing the concentration of either yeast extract or Casamino acids, and growth limitation was not the result of low pH due to acid formation (Giallo *et al.*, 1983). Furthermore, end products have no inhibitory effect when added at concentrations equal to the final titres (Giallo *et al.*, 1983).

The purpose of this research was to identify the factors responsible for this growth limitation and to examine the metabolism of *C. cellulolyticum* ATCC 35319 with cellobiose as growth substrate in continuous culture.

## METHODS

**Chemicals.** All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma. All gases used were purchased from Air Liquide.

**Organism.** *C. cellulolyticum* ATCC 35319, a mesophilic cellulolytic bacterium isolated from decayed grass (Petitdemanche *et al.*, 1984), was used.

**Medium and culture conditions.** The bacterium was grown anaerobically on a complex medium (CM3) (pH 7.8) containing (l<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2.9 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.3 g; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 g; yeast extract, 5 g; 5% (w/v) FeSO<sub>4</sub> in 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 µl; cysteine hydrochloride, 1 g; and 0.2% (w/v) resazurin, 0.5 ml.

The bacterium was routinely transferred into a medium containing 7.5 g l<sup>-1</sup> cellulose MN 300 (Serva Feinbiochemica). Routine transfers were also carried out in 9 ml of medium supplemented with cellobiose (ICN Biochemicals) to a final concentration of 3 g l<sup>-1</sup>.

The medium was reduced by the technique of Hungate (1969) and was dispensed under a constant flow of N<sub>2</sub> in Hungate tubes (Bellco Glass) or 'penicillin flasks' before autoclaving for 20 min at 120 °C.

The anaerobic culture technique used was that proposed by Hungate (1969) as modified by Bryant (1972). Bacteria were grown at 34 °C without shaking except in fermenter cultures.

**Growth measurement.** Growth was measured by reading optical density at 600 nm with a Beckman model 34 spectrophotometer. It was established that an optical density of 1 at 600 nm corresponded to a bacterial dry weight of 0.5 g l<sup>-1</sup> (Gehin *et al.*, 1995).

**Fermentation modes.** For continuous culture experiments, CM3 medium was again used. It was prepared as follows: a solution containing 8.5 l distilled water, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, cysteine hydrochloride and resazurin was

autoclaved in a 10 l glass flask. Yeast extract, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> and cellobiose were autoclaved separately and aseptically transferred with a peristaltic pump to the solution prepared as described earlier.

Continuous culture was carried out in a 2 l fermenter (LSL BioLafitte) with a 1.5 l working volume maintained by overflow through a sidearm in the fermenter jar. The temperature was controlled at 34 °C and medium pH was adjusted to 7.2 with 1 M NaOH. The feed flask and fermenter were maintained under filter-sterilized nitrogen gas and the fermenter was gently stirred (50 r.p.m.). The bioreactor was inoculated (10%, v/v) with an exponential-phase preculture. The culture was grown in batch for 15 h before the medium flow was started. A period of three residence times was generally found to be sufficient to achieve steady-state values of the parameters measured. At least three samples were taken for each set of steady-state data points reported.

**Analytical methods.** Reducing sugars were determined by the method of Miller (1959) using cellobiose as the standard.

Ethanol, L-lactate and acetate were determined spectrophotometrically with enzyme kits (Boehringer Mannheim).

**Preparation of cell-free extracts.** Cells were centrifuged at 12000 g for 20 min. After washing with Tris buffer (50 mM Tris/HCl, 2 mM DTT, pH 7.4), cells were resuspended in this buffer. The cells were then sonicated four times for 20 s at a frequency of 20 kcycles s<sup>-1</sup>, separated by 60 s (MSE 150 W ultrasonic disintegrator). The supernatant was collected from the cell lysate following centrifugation at 12000 g for 20 min at 4 °C. At each step, extracts were maintained under anaerobic conditions. Protein concentrations of cell extracts were determined according to the method of Bradford (1976) using crystalline BSA as the standard.

## Enzyme assays

Ferredoxin (fd)-NAD(P)<sup>+</sup> reductase [EC 1.18.1.3 (EC 1.18.1.2)] was assayed with pyruvate as the reductant of fd and under a carbon monoxide atmosphere according to Petitdemanche *et al.* (1976), modified by the addition of 1 mM purified fd.

NADH-fd reductase was measured by metronidazole reduction according to the method of Blusson *et al.* (1981).

Hydrogenase (EC 1.18.99.1) in the direction of methyl viologen reduction was assayed as described by Junelles *et al.* (1988) with the following modifications: 60 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM methyl viologen, 140 mM β-mercaptoethanol and incubation under a hydrogen atmosphere were used.

Phosphoroclastic activities. Assays were based on formation of acetyl phosphate during the oxidation of pyruvate, as described by Mortenson *et al.* (1963), with the following modifications: 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM coenzyme A and 1 mM methyl viologen were used.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) activity was followed by the increase in A<sub>340</sub> according to the method of Ferdinand (1964).

Acetate kinase (EC 2.7.2.1) activity was determined by the analysis of acetylphosphate (Lipmann & Tuttle, 1945). The reaction volume was 0.4 ml and the reaction mixture contained: Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM; potassium acetate, 40 mM; manganese sulfate, 6 mM; ATP, 10 mM. The reac-



tion was initiated by addition of cell-free extract. After 5 min at 37 °C, 0.2 ml of hydroxylamine (700 mM), pH 6.4 (freshly neutralized), was added. After 5 min at room temperature, the reaction was stopped by addition of 0.2 ml trichloroacetic acid (15%, v/v), 0.2 ml HCl (4 M) and 0.2 ml FeCl<sub>3</sub> (5% w/v in 0.1 M HCl). The amount of acetyl hydroxamate formed was determined by absorbance at 540 nm after centrifugation of the samples for 5 min at 12000 g.

Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) activity was determined by following NAD(P)H-dependent acetaldehyde reduction at 340 nm. The assay mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.2 mM NAD(P)H, 2 mM DTT and 40 mM acetaldehyde (Lamed & Zeikus, 1980).

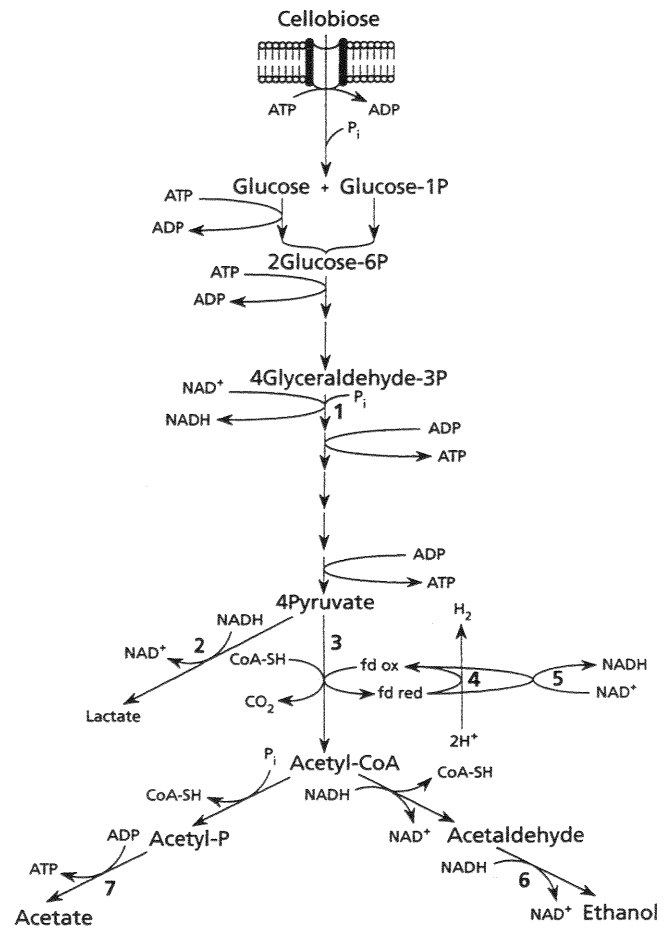
Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) activity was measured by following at 340 nm the NAD(P)H-dependent reduction of pyruvate to lactate (Abbe *et al.*, 1982). The assay mixture contained 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.4 mM NAD(P)H, 1 mM fructose 1,6-bisphosphate and 20 mM pyruvate.

**Extraction of nucleotides.** NADH, NADPH, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, ATP and ADP levels were measured after extraction of culture broth samples. Samples of 10 ml were rapidly removed from the bioreactor with sterile syringes and immediately put into tubes containing extractant. Cells were not separated from the medium except for the NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup> assays. NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, ATP and ADP were extracted with HCl (NADH and NADPH were degraded), NADH and NADPH were extracted with KOH (NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> were degraded), as described by Wimpenny & Firth (1972). For NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> determinations, cells were centrifuged and resuspended in deionized water to avoid medium interference during the fluorimetric assays. NADH was measured using a lactate dehydrogenase assay (Klingenberg, 1965), in which the decrease in fluorescence (Hitachi model F-2000 fluorometer) was proportional to the quantity of NADH. NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> were assayed with a NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase and a glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49), respectively (Klingenberg, 1965; Vasconcelos *et al.*, 1994) and the resulting NADH or NADPH was determined by fluorimetry. NADPH was converted to NADP<sup>+</sup> using glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4) (Klingenberg, 1965; Wimpenny & Firth, 1972) and NADP<sup>+</sup> was then determined as described before.

For ADP determinations, the ADP was converted to ATP by creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2) in a reaction mixture containing 2 ml supernatant, 7 mM phosphocreatine in Tris/HCl buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.4 mM MgSO<sub>4</sub> and 4 U creatine phosphokinase from rabbit muscle maintained for 20 min at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 6 M HCl (pH 2.0) and the mixture centrifuged for 10 min at 12000 g before neutralization with 10 M NaOH and storage of the supernatant at -80 °C. ATP was determined by bioluminescence using the luciferin-luciferase system (Microbial Biomass Reagent kit; Lumac). Experiments were made to verify complete ADP to ATP conversion under the conditions tested. ADP was calculated by subtracting the ATP values from the ADP plus ATP assay values and taking into account volume variations.

**Measurement of glycogen and exopolysaccharides.** Glycogen was assayed by the method of Robson *et al.* (1974).

Exopolysaccharides were separated from cells by centrifugation at 36000 g for 40 min in the presence of a chelating agent (10 mM tetrasodium EDTA) and 100 mM NaCl. Super-

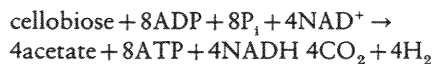


**Fig. 1.** Schematic diagram depicting the catabolism of cellobiose by *C. cellulolyticum*. 1, GAPDH; 2, lactate dehydrogenase; 3, phosphoroclastic reaction; 4, hydrogenase; 5, NADH-fd oxidoreductase; 6, alcohol dehydrogenase; 7, acetate kinase.

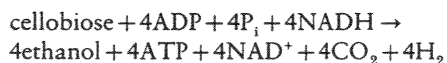
natant (25 ml) was added to propan-2-ol (75 ml). The precipitate was collected by centrifugation, dried for 24 h at 45 °C and resuspended in distilled water. Polysaccharides were assayed by the method of Dubois *et al.* (1956).

**Calculations.** The main products of cellobiose fermentation by *C. cellulolyticum* were acetate, ethanol, lactate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (Giallo *et al.*, 1983) (see Fig. 1).

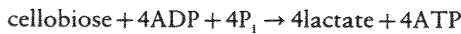
If one assumes, as did Strobel (1995) and Strobel *et al.* (1995), who demonstrated in a cellulolytic bacterium, *C. thermocellum*, that the transport of cellobiose and glucose requires an ATP molecule and that intracellular cellobiose is converted to glucose 1-phosphate and glucose by cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) (Schimz *et al.*, 1983; Thurston *et al.*, 1993; Wells *et al.*, 1995), then the conversion of cellobiose to acetate can be written as:



The conversion of cellobiose to ethanol can be written as:



and the conversion of cellobiose to lactate as:



NADH is formed by GAPDH, and ATP is formed by phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and acetate kinase.

The specific rate of NADH production and NADH consumption were calculated as follows:

$$q_{\text{NADH produced}} = q_{\text{ethanol}} + q_{\text{acetate}} + q_{\text{lactate}}$$

$$q_{\text{NADH consumed}} = 2q_{\text{ethanol}} + q_{\text{lactate}}$$

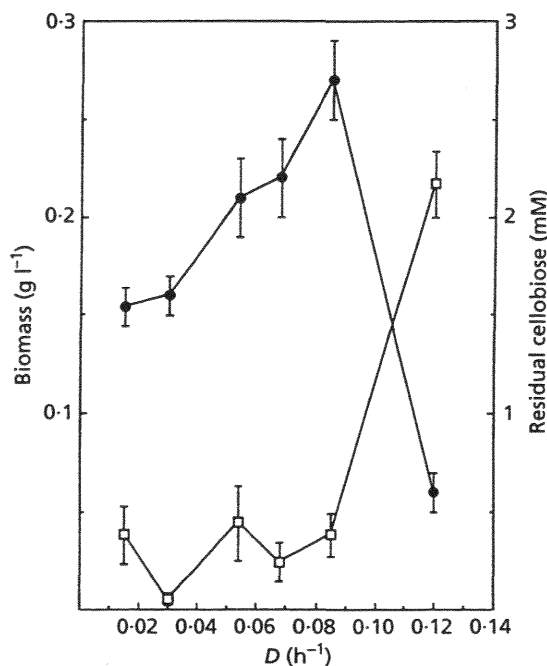
where  $q_{\text{acetate}}$ ,  $q_{\text{ethanol}}$  and  $q_{\text{lactate}}$  are the specific rates of product formation.

In the following sections,  $q_{\text{cellobiose}}$  is the specific rate of cellobiose used in  $\text{mmol (g dry wt cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$  and  $q_{\text{pyruvate}} = q_{\text{lactate}} + q_{\text{acetate}} + q_{\text{ethanol}}$ .

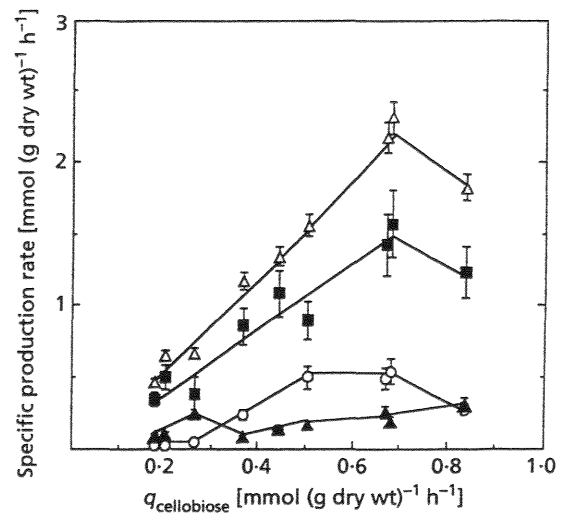
## RESULTS

### Continuous culture on cellobiose as a function of dilution rate

Fig. 2 illustrates the utilization of cellobiose and the steady-state biomass at various dilution rates ( $D$ ). At a cellobiose concentration in the feed medium of 2.34 mM and over a wide range of low dilution rates (from 0.015 to 0.080  $\text{h}^{-1}$ ), the residual cellobiose concentrations were low; above 0.080  $\text{h}^{-1}$ , the concentration increased and reached that in the inflow of the nutrition solution. These data are typical of a continuous culture carried out under carbon limitation. Continuous cultures were



**Fig. 2.** Residual cellobiose concentration ( $\square$ ) and steady-state biomass concentration ( $\bullet$ ) as functions of the dilution rate. The cellobiose input concentration was 2.34 mM. Results presented are means  $\pm$  SD calculated from three different experiments.



**Fig. 3.** Specific production rates of pyruvate ( $\Delta$ ), acetate ( $\blacksquare$ ), lactate ( $\circ$ ) and ethanol ( $\blacktriangle$ ) as functions of the specific cellobiose uptake rate in cellobiose-limited continuous culture. Results presented are means  $\pm$  SD of three independent determinations from different cultures.

shown to be carbon-limited when the cellobiose concentration in the feed medium was less than 2.9 mM. Based on a plot of  $1/D$  versus  $1/Y_{\text{ATP}}$ , the maintenance cost was estimated to be 0.93  $\text{mmol ATP g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (data not shown); this cost may be responsible for the decrease in biomass observed at low dilution rates.

### End-product formation

The main product of *C. cellulolyticum* cellobiose metabolism was acetate at all the dilution rates tested. Acetate production reached a mean of 60% of the carbon flowing to products; the other 40% was distributed between lactate (30%) and ethanol (10%). The relationship of these distributions is shown in Fig. 3. Acetate formation was proportional to carbon flow in the first part of the curve, and decreased as carbon flow increased. Pyruvate formation showed the same pattern in relation to carbon flow. It can be concluded that above a critical carbon flow of 0.66  $\text{mmol cellobiose (g dry wt cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ , part of the flow did not proceed to the end of the glycolytic pathway, since the  $q_{\text{pyruvate}}$  decreased while the  $q_{\text{cellobiose}}$  increased. These data are consistent with cellobiose conversion to polymers (see below). Lactate formation was seen only when the carbon flow was greater than a  $q_{\text{cellobiose}}$  value of 0.27  $\text{mmol cellobiose (g dry wt cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ . However, less lactate was produced than acetate. Its production paralleled acetate formation until it reached a maximal value at a  $q_{\text{cellobiose}}$  of 0.5  $\text{mmol cellobiose (g dry wt cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ , and decreased at a  $q_{\text{cellobiose}}$  greater than 0.68  $\text{mmol cellobiose (g dry wt cells)}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Ethanol production was always low and was not affected by high carbon flow.

**Table 1.** Fermentation parameters for continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

Values for biomass and residual cellobiose concentrations are means ( $\pm$ SD) of three different experiments. All other values are also means and had an SE of  $\pm 10\%$ .

<i>D</i> (h <sup>-1</sup> ) ...	0.015	0.030	0.030	0.054	0.068	0.075	0.080	0.085
Biomass concn (g l <sup>-1</sup> )	0.15 (0.01)	0.16 (0.01)	0.61 (0.07)	0.21 (0.02)	0.22 (0.02)	0.32 (0.04)	0.23 (0.02)	0.27 (0.02)
Fed substrate concn (mM)	2.34	2.34	16.67	2.34	2.34	5.85	2.92	2.34
Residual cellobiose concn (mM)	0.38 (0.15)	0.05 (0.03)	4.97 (0.60)	0.44 (0.19)	0.24 (0.10)	2.95 (0.30)	1.02 (0.10)	0.38 (0.11)
Molar growth yield [g cells (mol hexose) <sup>-1</sup> ]	38	35	26	55	51	55	60	55
<i>q</i> <sub>cellobiose</sub> [mmol (g cells) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0.196	0.429	0.575	0.488	0.649	0.680	0.661	0.617
Product yield [mol (mol substrate) <sup>-1</sup> ]								
Acetate	2.70	2.56	1.26	1.80	2.20	1.62	2.37	1.90
Lactate	0.13	0.32	0.61	1.03	0.75	0.96	0.83	0.50
Ethanol	0.58	0.65	0.22	0.34	0.39	0.36	0.31	0.45
<i>Y</i> <sub>ATP</sub> [g cells (mol ATP) <sup>-1</sup> ]	12.5	11.5	15.5	22.2	18.9	24.2	20.6	29.0
<i>q</i> <sub>NADH produced</sub> [mmol (g cells) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0.65	1.34	1.21	1.56	2.17	2.00	2.31	1.77
<i>q</i> <sub>NADH used</sub> [mmol (g cells) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0.24	0.39	0.61	0.84	1.01	1.15	0.93	0.87
<i>q</i> <sub>NADH produced</sub> / <i>q</i> <sub>NADH used</sub>	2.70	3.40	1.98	1.85	2.14	1.73	2.48	2.03
Carbon recovery (%)*	85.2	87.7	52.0	79.2	83.5	73.5	87.7	71.2

\* Carbon recovery was calculated as a function of the concentrations (mol l<sup>-1</sup>) of ethanol (E), acetic acid (A), lactic acid (L), feed or initial substrate (*S*<sub>0</sub>) and effluent or final substrate (*S*<sub>e</sub>) concentrations by using the following equation:

$$\text{carbon recovery} = [3 \times (E + L + A)] / [12 \times (S_0 - S_e)]$$

assuming stoichiometric production of CO<sub>2</sub> with acetic acid and ethanol. These values did not include cell carbon.

### Fermentation parameters

Table 1 presents different parameters determined during continuous culture of *C. cellulolyticum*.

Maximal carbon flow supported by *C. cellulolyticum* was 0.68 mmol cellobiose (g dry wt cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [equivalent to 11.3 nmol cellobiose min<sup>-1</sup> (mg cells)<sup>-1</sup> or 22 nmol cellobiose min<sup>-1</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>]. This value is in the same range reported for *C. thermocellum* [18 nmol cellobiose min<sup>-1</sup> (mg cells)<sup>-1</sup>; Ng & Zeikus, 1982] or *Clostridium thermohydrosulfuricum* [24 nmol cellobiose min<sup>-1</sup> (mg cells)<sup>-1</sup>; Ng & Zeikus, 1982]. Higher values have been reported for another cellulolytic bacterium, *Fibrobacter succinogenes* [76 nmol min<sup>-1</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>; Wells *et al.*, 1995] and for a rumen bacterium, *Prevotella ruminicola* [175 nmol min<sup>-1</sup> (mg cells)<sup>-1</sup>; Lou *et al.*, 1996].

The highest molar growth yield obtained in this work was 60 g cells (mol hexose)<sup>-1</sup> [0.2 g protein (g carbohydrate)<sup>-1</sup>]. This value is higher than those reported for *C. thermocellum* [38 g (mol hexose)<sup>-1</sup>] and *C. thermohydrosulfuricum* [19 g (mol hexose)<sup>-1</sup>; Ng & Zeikus, 1982] but in the same range as that of *P. ruminicola* [0.19 g protein (g carbohydrate)<sup>-1</sup>]. In batch cultures a

molar growth yield of 40 g cells (mol hexose)<sup>-1</sup> was reported (Giallo *et al.*, 1983).

A mean value of 19 g cells (mol ATP)<sup>-1</sup> was obtained except at low dilution rates where a lower value was found. This decrease reflected an expenditure of energy due to the maintenance energy being more pronounced when the growth rate is low. In batch cultures of *C. cellulolyticum* a lower value was reported for *Y*<sub>ATP</sub> [15 g cells (mol ATP)<sup>-1</sup>] (Giallo *et al.*, 1983).

These high values of *Y*<sub>ATP</sub> are consistent with the fact that the high level of acetate production was accompanied by the highest level of ATP formation. However, this pattern of product formation (i.e. the high level of acetate production and the low level of lactate and ethanol production) coincided with an excess of NADH since the ratio *q*<sub>NADH produced</sub>/*q*<sub>NADH used</sub> was always greater than one, ranging from 1.73 to 3.40 (Table 1).

Carbon recoveries obtained for continuous culture of *C. cellulolyticum* were between 71 and 87% (with one exception, 52%), consistent with values found generally for cellulolytic bacteria (Lamed & Zeikus, 1980; Giallo *et al.*, 1983). They did not include cells since it is difficult to estimate the part of cellobiose devoted to biomass



**Table 2.** Nucleotide levels in continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

Dilution rates and cellobiose input concentrations for experiments I–IV were 0.030 h<sup>-1</sup> and 2.34 mM, 0.030 h<sup>-1</sup> and 16.67 mM, 0.080 h<sup>-1</sup> and 2.92 mM, and 0.075 h<sup>-1</sup> and 5.85 mM, respectively. Values are means ( $\pm$  SD) calculated from triplicate experiments.

Nucleotide	Concentration [ $\mu\text{mol (g dry cell mass)}^{-1}$ ]			
	Expt I	Expt II	Expt III	Expt IV
NAD <sup>+</sup>	0.5 (0.1)	1.0 (0.1)	0.7 (0.1)	0.9 (0.2)
NADP <sup>+</sup>	0.3 (0.1)	0.8 (0.1)	0.6 (0.1)	0.3 (0.1)
NADH	3.0 (0.5)	15.9 (3.0)	40.0 (6.0)	37.5 (3.5)
NADPH	< 0.2*	< 0.2*	< 0.2*	< 0.2*
ATP	1.0 (0.1)	1.8 (0.2)	1.9 (0.2)	1.8 (0.2)
ADP	5.7 (0.3)	4.2 (0.4)	3.0 (0.2)	4.1 (0.2)

\* Values less than detection level.

production on complex medium. Lowest values were found for chemostats conducted on 5.85 mM cellobiose at 0.075 h<sup>-1</sup> or on 2.34 mM cellobiose at 0.085 h<sup>-1</sup>. Assays for glycogen synthesis revealed a significantly higher glycogen storage in cells from these chemostats [75 and 80 mg glucose eq. (g cells)<sup>-1</sup>, respectively versus 5 mg glucose eq. (g cells)<sup>-1</sup> on 2.34 mM cellobiose at 0.030 h<sup>-1</sup>] (data not shown). However, a glycogen storage of 60 mg glucose eq. (g cells)<sup>-1</sup> did not account completely for the loss in carbon recovery (only 52%) observed for cells from chemostats conducted on 16.67 mM cellobiose at 0.030 h<sup>-1</sup>. Microscopic observation revealed a polysaccharidic network where cells were embedded which should account for the low values observed in carbon recovery. Several procedures have been tested to measure these exopolysaccharides. No one gave satisfactory results. An interference, probably due to a component of the complex CM3 medium used, must be responsible for the results obtained (high background and non-reproducibility). Furthermore, filtration or dialysis of the samples did not remove this interference.

### Nucleotide levels

These were determined in four cases: at low or high dilution rate under carbon-limitation (experiments I and III, respectively, Table 2) or carbon-excess (experiments II and IV, respectively, Table 2). Whereas the total pool size of NADPH and NADP<sup>+</sup> of cells grown with different carbon flows was quite constant, the NADH concentration dramatically increased with the carbon flow. Increasing cellobiose concentration at  $\mu = 0.030$  h<sup>-1</sup> led to an increase in NADH concentration; starting from usual values such as 3.0  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$  [experiment I, Table 2,  $q_{\text{cellobiose}} = 0.429$  mmol cellobiose (g dry wt cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>], it reached values of 15.9  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$  [experiment II, Table 2,  $q_{\text{cellobiose}} = 0.575$  mmol cellobiose (g dry wt cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]. Similar values [40 and 37.5  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$ ] were obtained at 0.080 h<sup>-1</sup> [experiment III,  $q_{\text{cellobiose}} = 0.661$  mmol cellobiose (g dry

wt cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] and 0.075 h<sup>-1</sup> [experiment IV,  $q_{\text{cellobiose}} = 0.680$  mmol cellobiose (g dry wt cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] when cellobiose concentration was increased from 2.92 mM to 5.85 mM, indicating the saturation of the phenomenon observed (i.e. an increase of the NADH concentration with the specific rate of cellobiose consumption).

In spite of the fact that acetate formation was associated with ATP production, no significant variation was noted in the total pool size of ATP and ADP.

### Enzymic activities

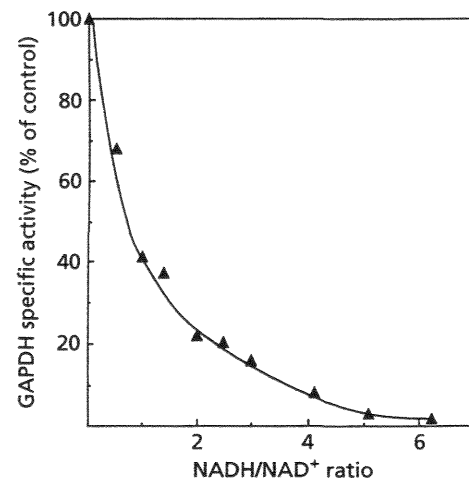
In the four cases described previously, enzymic activities were determined from cell extracts (Table 3). GAPDH and acetate kinase were found to be in the same range as activities previously described for bacteria metabolizing high concentrations of carbohydrate (Andersch *et al.*, 1983; Hüsemann & Papoutsakis, 1989; Girbal *et al.*, 1995a; Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996). Lactate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase exhibited almost no activity with NADP<sup>+</sup>. Lactate dehydrogenase activity was shown to be low but correlated with the rate of lactate formation. By comparison, activities reported for other bacteria were 3- to 10-fold higher (Lamed & Zeikus, 1980; Lovitt *et al.*, 1988). By contrast, alcohol dehydrogenase activity determined *in vitro* was not affected by carbon flow; values reported were lower than those described for *C. thermocellum* or *C. thermohydrosulfuricum* [2 and 0.4  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein)<sup>-1</sup>, respectively] (Lamed & Zeikus, 1980; Lovitt *et al.*, 1988). In these conditions, the low lactate and ethanol production must be balanced by H<sub>2</sub> gas formation via the NAD(P)H-fd oxidoreductases, the physiological role of which could be to regenerate the reducing equivalents (Thauer *et al.*, 1971). fd-NADP<sup>+</sup> reductase activities were much higher than the fd-NAD<sup>+</sup> reductase activities, which were hardly detectable. In contrast, high NADH-fd reductase activities [0.074  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein)<sup>-1</sup>] were found for cells that exhibit a high

**Table 3.** Enzymic activities from cell extracts of continuous cultures of *C. cellulolyticum*

Dilution rates and cellobiose input concentrations for experiments I–IV were 0.030 h<sup>-1</sup> and 2.34 mM, 0.030 h<sup>-1</sup> and 16.67 mM, 0.080 h<sup>-1</sup> and 2.92 mM, and 0.075 h<sup>-1</sup> and 5.85 mM, respectively. Values are means ( $\pm$ SD) calculated from triplicate experiments.

Enzyme	Specific activity [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg protein <sup>-1</sup> )]			
	Expt I	Expt II	Expt III	Expt IV
GAPDH	3.9 (0.5)	5.9 (0.2)	3.4 (0.5)	3.7 (0.2)
Phosphoroclastic activity	0.092 (0.008)	0.024 (0.001)	0.031 (0.003)	0.024 (0.001)
Hydrogenase	0.85 (0.19)	2.00 (0.30)	0.25 (0.05)	0.29 (0.05)
Lactate dehydrogenase	0.038 (0.008)	0.014 (0.002)	0.110 (0.020)	0.180 (0.020)
Acetate kinase	2.6 (0.2)	5.7 (0.4)	2.4 (0.3)	1.6 (0.1)
Alcohol dehydrogenase	0.22 (0.01)	0.20 (0.03)	0.28 (0.02)	0.34 (0.08)
fd-NADP reductase	0.003 (0.001)	0.004 (0.001)	0.027 (0.001)	0.025 (0.005)
NADH-fd reductase	0.015 (0.002)	0.050 (0.010)	0.074 (0.015)	0.074 (0.018)

NADH content and data on NADH-fd reductase activities showed a direct correlation between the specific activities, which increased from 0.015 to 0.074  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein<sup>-1</sup>), and the NADH content of the cell. NADH-fd reductase activity was higher than that described for *C. acetobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum* or *C. thermohydrosulfuricum* [25, 30 and 12 nmol min<sup>-1</sup> (mg protein<sup>-1</sup>), respectively] but lower than the value reported for *Clostridium pasteurianum* [171 nmol min<sup>-1</sup> (mg protein<sup>-1</sup>)] (Petitdemange *et al.*, 1976; Lovitt *et al.*, 1988). The function of pyridine nucleotide oxidoreductases depends on both the bacterial species and strain and the specific growth conditions of a given strain (Petitdemange *et al.*, 1976; Girbal *et al.*, 1995a). With a hardly detectable fd-NAD<sup>+</sup> reductase activity and a high NADH-fd reductase activity, the enzyme can function in NADH oxidation and H<sub>2</sub> production via the hydrogenase. Hydrogenase activities were found to be higher at low dilution rates (experiments I and II, Table 3) and significantly higher in carbon excess at low dilution rate (experiment II) than under carbon limitation or excess at high dilution rates (experiments III and IV). However, it remained weak when compared with activities described for other bacteria [for example, 37  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein<sup>-1</sup>) for *C. thermohydrosulfuricum* (Lovitt *et al.*, 1988) or 74  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein<sup>-1</sup>) for *C. thermocellum* AS 39 (Lamed & Zeikus, 1980)] even at high dilution rates where a high activity would be required to regenerate NADH via the NADH-fd reductase activity. Because the NADH-fd reductase activity is interconnected with hydrogenase, the decrease in hydrogenase activity could affect the efficiency of this NAD<sup>+</sup> regenerating system and lead to an increase in the NADH pool. Phosphoroclastic activity was significantly lower under carbon saturation conditions and at high dilution rates corresponding to the higher detected intracellular NADH concentrations. This could be a way for the cells to limit acetate production and to make easier the reoxidation of NADH via lactate production.



**Fig. 4.** Influence of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio on GAPDH activity determined *in vitro*. Data points indicate residual activity in the presence of the given NADH/NAD<sup>+</sup> ratio. Control (100%) activity was 1.2  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg protein<sup>-1</sup>). The concentration of NAD<sup>+</sup> was 0.1 mM.

The effect of NADH on GAPDH activity was determined to explain how high cellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratios inhibited catabolism. In these experiments, arsenate was added to the GAPDH assay system since this competes with phosphate and forms an unstable intermediate which rapidly decomposes. 1,3-Biphosphoglycerate never accumulates and a significant reverse reaction is not possible (Krebs, 1955; Krebs *et al.*, 1969; Blusson *et al.*, 1981; Hyun *et al.*, 1983). Under these assay conditions, it is possible to observe the effect of NADH as an effector rather than a substrate for the reverse reaction. The results (Fig. 4) show that, as the level of NADH was increased, the rate of NAD<sup>+</sup> reduction by GAPDH activity was significantly inhibited. These data indicate that GAPDH activity is significantly inhibited when the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio is greater than 1.

## DISCUSSION

Cellobiose metabolism by *C. cellulolyticum* has thus far been studied only in batch cultures (Giallo *et al.*, 1983; Gehin *et al.*, 1995). This cellulolytic bacterium is able to metabolize completely only a small quantity of soluble carbohydrate ( $3 \text{ g l}^{-1}$ ). The molar growth yields were reduced when the initial cellobiose concentration exceeded  $2 \text{ g l}^{-1}$ ; sugars were consumed without an increase in cell density (Giallo *et al.*, 1983). To determine the physiological basis for growth limitation in *C. cellulolyticum*, we have now grown the cells in continuous culture with cellobiose as substrate.

The results presented in this paper suggest that growth of *C. cellulolyticum* is limited due to a low rate of NADH reoxidation leading to an intracellular accumulation of the reduced nucleotide. As described previously for batch cultures (Giallo *et al.*, 1983), acetate is the main product of *C. cellulolyticum* cellobiose metabolism in continuous culture. Acetate formation was found to increase with increasing carbon flow, leading to high ATP production and to an insufficient rate of NADH regeneration. Production of reduced compounds such as ethanol and lactate was not sufficient to compensate for the slow rate of NADH reoxidation. An alternative method for  $\text{NAD}^+$  regeneration from NADH in clostridia is by means of the NADH-fd oxidoreductase, which catalyses the electron flow from NADH ( $E'_0 = -320 \text{ mV}$ ) via fd to protons ( $E'_0 = -420 \text{ mV}$ ). This reaction is thermodynamically unfavourable under standard conditions (Jungermann *et al.*, 1973) and needs interspecies  $\text{H}_2$  transfer to be efficient (Wolin & Miller, 1988; Morvan *et al.*, 1996). The low rate of reoxidation of the excess reducing equivalents produced during glycolysis resulted in an approximatively 12-fold increase in the intracellular NADH concentration. Similar NADH accumulation has been reported previously in *C. acetobutylicum* (sevenfold) (Girbal *et al.*, 1995b) and in *C. butyricum* (eightfold) (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996). Our results demonstrate that the high NADH/ $\text{NAD}^+$  ratio inhibits the *in vitro* activity of GAPDH, suggesting a possible limitation of the carbon flow as described previously in several other clostridia (Lovitt *et al.*, 1988; Girbal & Soucaille, 1994; Girbal *et al.*, 1995b). However, the high *in vitro* GAPDH activity could be sufficient to ensure the carbon flow measured in cellobiose-saturated conditions [ $q_{\text{cellobiose}} = 0.680 \text{ mmol cellobiose (g dry wt cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Table 1), corresponding to a GAPDH specific activity of  $3.7 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$  (Table 3). The value of  $q_{\text{pyruvate}}$  expressed in  $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$  was 0.073 i.e. 2% of the *in vitro* detected GAPDH activity, a value obtained at high NADH/ $\text{NAD}^+$  ratio (Fig. 4)]. These data suggest that *C. cellulolyticum* is not able to metabolize high quantities of soluble sugars under these growth conditions.

Our data demonstrated that, at least on complex medium in continuous culture, *C. cellulolyticum* is not able to cope with carbon overflow by, for example, inducing lactate production. *C. cellulolyticum* and many other clostridia show lactate dehydrogenase activity,

but lactic acid is not normally a major end product (Russell *et al.*, 1996). Furthermore, many clostridia, such as *C. acetobutylicum*, are able to induce metabolic shift to produce solvents (ethanol, butanol or acetone). This metabolic shift is associated with high intracellular ATP and NAD(P)H contents. In particular, solvent production in *C. acetobutylicum* is induced under conditions of low ATP requirement, high ATP availability and high intracellular NADH content (see Girbal *et al.*, 1995b for a review). Our results show that under similar conditions, *C. cellulolyticum* is not able to induce metabolic shift to produce reduced compounds such as ethanol.

These results described in this paper concerning carbon metabolism by a mesophilic cellulolytic clostridium have to be considered in relation to the natural environment of the bacterium. In previous studies, we have shown that growth of *C. cellulolyticum* occurs as the cells adhere to cellulose fibres (Gelhay *et al.*, 1993a, b). In this context, the cellulose is usually coated by other polymers, predominantly xylan and lignin, which hinder cellulolysis. Our results suggest that catabolism in *C. cellulolyticum* is adapted to low carbon flows, consistent with the notion that high concentrations of soluble sugars, such as 2 or  $3 \text{ g l}^{-1}$ , are probably not found in natural ecosystems. Furthermore, in many ecosystems where lignocellulose compounds are degraded, interspecies hydrogen transfer occurs and the  $\text{H}_2$  produced by cellulolytic bacteria, such as *C. cellulolyticum*, is used immediately by methanogens or other  $\text{H}_2$ -using species (Wolin & Miller, 1988; Morvan *et al.*, 1996). Given that  $\text{H}_2$  does not accumulate, the formation of  $\text{H}_2$  from NADH would not be inhibited and the bacteria would not need to produce reduced compounds (e.g. ethanol) to reoxidize the NADH produced during glycolysis. Thus, we demonstrate that in pure culture *C. cellulolyticum*, producing mainly acetate,  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$ , is not adapted to high carbon flow catabolism.

To the best of our knowledge, this study is the first on cellobiose catabolism in free-living mesophilic cellulolytic clostridia. We showed that the catabolic enzymic activities detected *in vitro* were high compared to the low carbon flow measured *in vivo* in *C. cellulolyticum*. Indeed, the GAPDH, phosphoroclastic and acetate kinase activities detected *in vitro* are in the same range as values reported for clostridia such as *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1995a) or *C. butyricum* (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996) metabolizing high concentrations of carbohydrate. Since, in any ecosystem, a cellulolytic microbe exists in proximity to other microorganisms, these high enzymic activities could be a way for the cellulolytic clostridium to seize the small amounts of carbohydrates provided by cellulose degradation and so to compete efficiently with non-cellulolytic bacteria.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the commission of European Communities FAIR programme [contract no. CT 95-091 (DG 12 SSMA)].



The authors thank Michel Quittelier for his technical assistance.

## REFERENCES

- Abbad-Andaloussi, S., Manginot-Durr, C., Amine, J., Petitdemange, E. & Petitdemange, H. (1995). Isolation and characterization of mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4413–4417.
- Abbad-Andaloussi, S., Dürr, C., Raval, G. & Petitdemange, H. (1996). Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* **142**, 1149–1158.
- Abbe, K., Takahashi, S. & Yamada, T. (1982). Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J Bacteriol* **152**, 175–182.
- Andersch, W., Bahl, H. & Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* **18**, 327–332.
- Bayer, E. A., Morag, E., Shoham, Y., Tormo, J. & Lamed, R. (1996). The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, pp. 155–182. Edited by M. Fletcher. New York: Wiley-Liss.
- Beguín, P. & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* **13**, 25–58.
- Blusson, H., Petitdemange, H. & Gay, R. (1981). A new, fast and sensitive assay for NADH-ferredoxin oxidoreductase detection in *Clostridia*. *Anal Biochem* **110**, 176–181.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Bryant, M. P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* **25**, 1324–1328.
- Cailliez, C., Benoit, L., Thirion, J.-P. & Petitdemange, H. (1992). Characterization of 10 mesophilic cellulolytic *Clostridia* isolated from a municipal solid waste digester. *Curr Microbiol* **25**, 105–112.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350–356.
- Felix, C. R. & Ljungdahl, L. G. (1993). The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annu Rev Microbiol* **47**, 791–819.
- Ferdinand, W. (1964). The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J* **92**, 578–585.
- Gehin, A., Gelhaye, E., Raval, G. & Petitdemange, H. (1995). *Clostridium cellulolyticum* viability and sporulation under cellobiose starvation conditions. *Appl Environ Microbiol* **61**, 868–871.
- Gelhaye, E., Gehin, A. & Petitdemange, H. (1993a). Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3154–3156.
- Gelhaye, E., Petitdemange, H. & Gay, R. (1993b). Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J Bacteriol* **175**, 3452–3458.
- Giallo, J., Gaudin, C., Belaich, J.-P., Petitdemange, E. & Caillet-Mangin, F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl Environ Microbiol* **45**, 843–849.
- Girbal, L. & Soucaille, P. (1994). Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J Bacteriol* **176**, 6433–6438.
- Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S. & Soucaille, P. (1995a). How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* **16**, 151–162.
- Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I. & Soucaille, P. (1995b). Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 287–297.
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol* **33**, 117–132.
- Hüsemann, M. H. W. & Papoutsakis, E. T. (1989). Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch culture fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**, 585–595.
- Hyun, H. H., Zeikus, J. G., Longin, R., Millet, J. & Ryter, A. (1983). Ultrastructure and extreme heat resistance of spores from thermophilic *Clostridium* species. *J Bacteriol* **156**, 1332–1337.
- Junelles, A. M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. & Gay, R. (1988). Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr Microbiol* **17**, 299–303.
- Jungermann, K., Thauer, R. K., Leimenstoll, G. & Decker, K. (1973). Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim Biophys Acta* **305**, 268–280.
- Klingenberg, M. (1965). Spectrophotometric and fluorimetric methods: nicotinamide adenine dinucleotides (NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH). In *Methods of Enzymatic Analysis* vol. 4, 2nd edn, pp. 2045–2059. Edited by H. U. Bergmeyer. New York & London: Academic Press.
- Krebs, E. G. (1955). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. *Methods Enzymol* **1**, 407–411.
- Krebs, H. A., Freedland, R. A., Hems, R. & Stubbs, M. (1969). Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem J* **112**, 117–124.
- Lamed, R. & Zeikus, J. G. (1980). Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J Bacteriol* **144**, 569–578.
- Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* **49**, 399–426.
- Lipmann, F. & Tuttle, L. C. (1945). A specific micromethod for determination of acyl-phosphates. *J Biol Chem* **159**, 21–28.
- Lou, J., Dawson, K. A. & Strobel, H. J. (1996). Role of phosphorylolytic cleavage in cellobiose and cellodextrin metabolism by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1770–1773.
- Lovitt, R. W., Shen, G. J. & Zeikus, J. G. (1988). Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J Bacteriol* **170**, 2809–2815.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* **31**, 426–428.
- Mortenson, L. E., Valentine, R. C. & Carnahan, J. E. (1963). Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **238**, 794–800.

- Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Fonty, G. & Gouet, P. (1996). *In vitro* interactions between rumen H<sub>2</sub>-producing cellulolytic microorganisms and H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate reducing bacteria. *Anaerobe* 2, 175–180.
- Ng, T. & Zeikus, J. G. (1982). Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J Bacteriol* 150, 1391–1399.
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G. & Gay, R. (1976). Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in *Clostridia* of the butyric group. *Biochim Biophys Acta* 421, 334–347.
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J. & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int J Syst Bacteriol* 34, 155–159.
- Robson, R. L., Robson, R. M. & Morris, J. G. (1974). The biosynthesis of granulose by *Clostridium pasteurianum*. *Biochem J* 144, 503–511.
- Russell, J. B., Bond, D. R. & Cook, G. M. (1996). The fructose diphosphate/phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram-positive anaerobes. *Res Microbiol* 147, 528–535.
- Schimz, K. L., Broll, B. & John, B. (1983). Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) of *Cellulomonas*: occurrence, induction, and its role in cellobiose metabolism. *Arch Microbiol* 135, 241–249.
- Strobel, H. J. (1995). Growth of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum* in continuous culture. *Curr Microbiol* 31, 210–214.
- Strobel, H. J., Caldwell, F. C. & Dawson, K. A. (1995). Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl Environ Microbiol* 61, 4012–4015.
- Thauer, R. K., Rupprecht, E., Ohrlhoff, C., Jungermann, K. & Decker, K. (1971). Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluyveri*. *J Biol Chem* 246, 954–959.
- Thurston, B., Dawson, K. A. & Strobel, H. J. (1993). Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol* 59, 2631–2637.
- Vasconcelos, I., Girbal, L. & Soucaille, P. (1994). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* 176, 1443–1450.
- Weimer, P. J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J Dairy Sci* 79, 1496–1502.
- Wells, J. E., Russel, J. B., Shi, Y. & Weimer, P. J. (1995). Cello-dextrin efflux by the cellulolytic ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* and its potential role in the growth of non-adherent bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61, 1757–1762.
- Wimpenny, J. W. T. & Firth, A. (1972). Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J Bacteriol* 111, 24–32.
- Wolin, M. J. & Miller, T. L. (1988). Microbe-microbe interactions. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 361–386. Edited by P. N. Hobson. London: Elsevier.

Received 13 June 1997; revised 6 October 1997; accepted 7 October 1997.

### III. Conclusion.

Cette étude a permis de dresser un schéma détaillé des régulations métaboliques mises en œuvre par *C. cellulolyticum* cultivé sur milieu complexe avec du cellobiose comme source de carbone.

L'acétate est le produit majeur du catabolisme du cellobiose par *C. cellulolyticum*. Sa vitesse de formation augmente avec le flux carboné, conduisant à une production importante d'ATP et à un défaut de régénération du NADH. La production de composés plus réduits, tels que éthanol ou lactate, est insuffisante pour compenser cette régénération. Sur milieu complexe, *C. cellulolyticum* n'est donc pas capable d'induire de changements métaboliques propices à la régénération du NADH, tels qu'une induction de la formation de lactate ou d'éthanol, comme cela a été montré chez d'autres clostridia tel que *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1995a).

Une autre voie de régénération du NADH chez les clostridia met en jeu le système NADH-fd-réductase/hydrogénase, qui catalyse le transfert d'électrons du NADH à un transporteur, la ferrédoxine puis à des protons pour former de l'hydrogène. Cependant, cette réaction est défavorable sur le plan thermodynamique (Jungermann *et al.*, 1973) et un transfert interspécifique d'hydrogène est nécessaire pour que cette réaction soit efficace (Morvan *et al.*, 1996; Wolin and Miller, 1988).

La faible vitesse de réoxydation du NADH conduit à une accumulation intracellulaire de ce nucléotide réduit (augmentation de 12 fois de la teneur des cellules en NADH), responsable de la limitation de croissance de cette bactérie. Une accumulation de NADH a été observée chez d'autres clostridia, en particulier chez *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1995a) et *C. butyricum* (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996). Par ailleurs, nous avons mis en évidence qu'un rapport NADH/NAD<sup>+</sup> élevé conduisait, *in vitro*, à une inhibition de l'activité GAPDH, ce qui suggère qu'une limitation du flux de carbone peut intervenir à ce niveau comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Girbal *et al.*, 1995a; Girbal and Soucaille, 1994; Lovitt *et al.*, 1988). L'existence d'une forte activité GAPDH, mesurée *in vitro*, permettrait de compenser cette inhibition et d'assurer un flux de carbone maximal de 0,680 mmol de cellobiose par g de cellules et par heure sur milieu complexe.

Ces résultats démontrent que le catabolisme de *C. cellulolyticum* est adapté à de faibles flux de carbone, en accord avec ce que cette bactérie doit rencontrer dans son



écosystème naturel. En effet, il a été montré précédemment que la croissance de *C. cellulolyticum* a lieu lorsque les cellules adhèrent à la cellulose (Gelhaye, 1993; Gelhaye *et al.*, 1993a, b). Or la cellulose est recouverte d'autres polymères, xylane et lignine en particulier, qui limitent la cellulolyse et donc l'apport en éléments carbonés. Par ailleurs, dans la nature, l'hydrogène produit par les bactéries cellulolytiques est utilisé par d'autres bactéries, en particulier les méthanogènes (Morvan *et al.*, 1996; Wolin and Miller, 1988), ce qui est favorable au fonctionnement du système NADH-fd-réductase-hydrogénase.

Enfin, les activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme du carbone chez *C. cellulolyticum* (en particulier GAPDH, activité phosphoroclastique et acétate kinase), mesurées *in vitro*, sont particulièrement élevées, compte-tenu des flux de carbone observés chez cette bactérie. Elles pourraient permettre à *C. cellulolyticum* d'entrer en compétition de façon efficace avec les autres bactéries non cellulolytiques de son écosystème, vis-à-vis de l'utilisation des substrats carbonés solubles.



### **CHAPITRE 3. APPORT D'UN MILIEU SYNTHETIQUE CONCERNANT LES FLUX DE CARBONE ET D'ELECTRONS CHEZ *C. CELLULOLYTICUM* CULTIVE EN CULTURE CONTINUE.**

#### **I. Introduction.**

Nous avons montré précédemment (Payot *et al.*, 1998) que le flux de carbone est limité, lorsque *C. cellulolyticum* est cultivé sur milieu complexe, par une vitesse lente de réoxydation du NADH, conduisant à une accumulation de ce nucléotide réduit.

Par ailleurs, l'analyse du métabolisme de bactéries cultivées sur milieu complexe est rendue difficile par l'utilisation de multiples composés présents dans ce milieu.

Enfin, de nombreux écosystèmes naturels sont oligotrophes (Koch, 1997) et les bactéries de cet écosystème ne rencontrent donc pas une telle abondance nutritionnelle.

Sur la base de ces considérations, une étude du catabolisme du cellobiose de *C. cellulolyticum*, cultivé en chemostat dans des conditions de limitation en carbone, a été réalisée en utilisant un milieu synthétique. Ce milieu, de composition définie, ne comporte pas d'extrait de levure, remplacé par une solution d'oligoéléments et des vitamines.

#### **II. Résultats.**

Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article intitulé: 'Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium.' (Journal of Bacteriology).



## Carbon and Electron Flow in *Clostridium cellulolyticum* Grown in Chemostat Culture on Synthetic Medium

E. GUEDON, S. PAYOT, M. DESVAUX, AND H. PETITDEMANGE\*

Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France

Received 15 December 1998/Accepted 19 March 1999

Previous results indicated poor sugar consumption and early inhibition of metabolism and growth when *Clostridium cellulolyticum* was cultured on medium containing cellobiose and yeast extract. Changing from complex medium to a synthetic medium had a strong effect on (i) the specific cellobiose consumption, which was increased threefold; and (ii) the electron flow, since the NADH/NAD<sup>+</sup> ratios ranged from 0.29 to 2.08 on synthetic medium whereas ratios as high as 42 to 57 on complex medium were observed. These data indicate a better control of the carbon flow on mineral salts medium than on complex medium. By continuous culture, it was shown that the electron flow from glycolysis was balanced by the production of hydrogen gas, ethanol, and lactate. At low levels of carbon flow, pyruvate was preferentially cleaved to acetate and ethanol, enabling the bacteria to maximize ATP formation. A high catabolic rate led to pyruvate overflow and to increased ethanol and lactate production. *In vitro*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and ethanol dehydrogenase levels were higher under conditions giving higher *in vivo* specific production rates. Redox balance is essentially maintained by NADH-ferredoxin reductase-hydrogenase at low levels of carbon flow and by ethanol dehydrogenase and lactate dehydrogenase at high levels of carbon flow. The same maximum growth rate (0.150 h<sup>-1</sup>) was found in both mineral salts and complex media, proving that the uptake of nutrients or the generation of biosynthetic precursors occurred faster than their utilization. On synthetic medium, cellobiose carbon was converted into cell mass and catabolized to produce ATP, while on complex medium, it served mainly as an energy supply and, if present in excess, led to an accumulation of intracellular metabolites as demonstrated for NADH. Cells grown on synthetic medium and at high levels of carbon flow were able to induce regulatory responses such as the production of ethanol and lactate dehydrogenase.

Cellulolytic clostridia are of cardinal importance in anaerobic environments rich in plant material (4, 23, 42). For many years, the cellulase complex of cellulolytic clostridia and genes encoding cellulases have been the subjects of considerable research, which has led to the cellulosome concept (1–3, 12). The cellulosomes found at the surface of the cells, where they form protuberances, are responsible for the specific adherence of numerous cellulolytic clostridia to cellulose. They contain a multiplicity of enzyme components showing a marked synergism against cellulosic compounds. Thus, enzymes involved in degradation of cellulose and hemicellulose have been well characterized, while few studies have focused on the carbon metabolic pathway. Poor sugar consumption and an early inhibition of metabolism and growth have been documented (7, 10, 15, 18, 19, 27, 37, 38), and *Clostridium cellulolyticum*, a mesophilic cellulolytic bacterium isolated from compost (35), shows this behavior. Using yeast extract, Casamino Acids, and vitamin supplements, Giallo et al. (15) tried to improve *C. cellulolyticum* growth, but without success; nevertheless, complex media were used systematically for the cultivation of this organism (4, 7, 13–16, 34). However, the complex metabolism associated with the use of the numerous compounds included in the rich media is such that analyses of metabolism and energy use are difficult to undertake. Moreover, many natural ecosystems are oligotrophic and rarely contain all nutrients in high quantity (22). In light of these considerations, during this

investigation a synthetic medium was used to study the behavior of *C. cellulolyticum* under conditions of nutrient limitation. To permit identification of regulatory responses occasioned by low nutrient concentrations, studies were conducted in chemostats, which can maintain low steady-state nutrient concentrations, using cellobiose as the carbon source, since this disaccharide is the major end product of the cellulose degradation process (32, 39).

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** All chemicals were of highest-purity analytical grade. Unless indicated otherwise, commercial reagents, enzymes, and coenzymes were supplied by Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. All gases used were purchased from Air Liquide, Paris, France.

**Organism and medium.** The bacterium used in this study, *C. cellulolyticum* ATCC 35319, was originally isolated by Petitdemange et al. from decayed grass (35). Stock cultures of *C. cellulolyticum* were maintained on cellulose and were grown for one transfer in cellobiose before initiation of growth experiments. The anaerobic culture technique used was that proposed by Hungate (20) as modified by Bryant (6).

The defined medium used in all experiments was a modification of the CM3 medium described by Weimer and Zeikus (44), in which 5 g of yeast extract per liter is replaced by oligoelement and vitamin solutions. The composition was (in grams liter<sup>-1</sup> unless otherwise indicated): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.40; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 2.90; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.00; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.10; CaCl<sub>2</sub>, 0.02; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 9.15% (wt/vol) in 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 μl; oligoelement solution, 1.0 ml; vitamin solution, 10 ml; Na<sub>2</sub>S, 0.50; and resazurin at 0.2% (wt/vol), 0.5 ml. In addition, a constant limited cellobiose concentration (5.84 mM) was added to the feed medium.

The oligoelement solution contained (in grams liter<sup>-1</sup> unless otherwise indicated): FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5.00; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.44; MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.12; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.25; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.20; (Mo)<sub>7</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1.00; NiCl<sub>2</sub>, 0.04; CoCl<sub>2</sub>, 0.02; HBO<sub>3</sub>, 0.03; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.02; HCl (10 M), 50.0 ml.

The composition of the vitamin solution was (in milligrams per 100 ml of distilled water): *d*-biotin, 10; para-aminobenzoic acid, 25; nicotinic acid, 15; riboflavin, 25; pantothenic acid, 25; thiamine, 25; and cyanocobalamin, 10. The vitamin solution was sterilized by filtration through a 0.2-μm-pore-size filter.

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +, Domaine Scientifique Victor Grignard, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France. Phone: (33) 3 83 91 20 53. Fax: (33) 3 83 91 25 50. E-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr.



**Growth conditions.** *C. cellulolyticum* ATCC 35319 was grown in chemostat culture at varying dilution rates on cellobiose (5.84 mM) as carbon and energy source. Cultures were maintained aseptically in a 2-liter bioreactor (LSL-Bio-lafitte, St. Germain en Laye, France) with a 1.5-liter working volume. The temperature was maintained at 34°C, and the pH was controlled at 7.2 by the automatic addition of 1 M NaOH. All tubing used was made of Viton (Du Pont Co., Wilmington, Del.) to eliminate oxygen entry. Agitation was kept constant at 50 rpm. Medium was pumped into the fermentor at the appropriate dilution rate. The volume was kept constant at 1.5 liters by automatic regulation of the culture level. The inoculum was 10% by volume and was in the exponential growth phase. The culture was grown in batch for 15 h before the medium flow was started.

A period of three to four residence times was found to be sufficient to achieve steady-state values of biomass and residual cellobiose concentrations. Generally, these cultures were maintained 28 days. Cultures were carried out at atmospheric pressure, but due to the low  $q_{\text{cellobiose}}$  values (the specific rates of cellobiose used), the fermentor was sparged with oxygen-free nitrogen ( $6 \text{ ml min}^{-1}$ ) to prevent back diffusion of oxygen into the fermentor headspace. If a pink color of resorufin appeared, the culture became unstable and washout occurred.

**Analytical procedures.** Bacterial growth was measured spectrophotometrically at 600 nm and calibrated against cell dry weight measurements. Samples (30 ml) were centrifuged for 10 min at  $8,000 \times g$ , washed with 0.9% (wt/vol) NaCl, and dried at 65°C to constant weight (48 h). A mean biomass formula of  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  and an average extracellular protein formula of  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_9\text{N}_6$  were determined by elemental analysis (Service Central d'Analyses, CNRS, Vernaison, France) and were used for elemental recovery calculations.

Cell-free supernatants ( $10,000 \times g$ , 15 min, 4°C) were stored at -80°C. Cellobiose was determined colorimetrically by using dinitrosalicylic reagent (29). Acetate, lactate, ethanol, and succinate were estimated by using the appropriate enzyme kits (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Extracellular proteins from the cell-free supernatant were measured by the Bradford dye method (5). The quantity of amino acids present in supernatant was measured by using the procedure of Church et al. (11) and by ion exchange chromatography on a cation-exchange resin with a Beckman 7300 amino acid analyzer. The average elemental amino acid composition was  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}$ . Exopolysaccharides were determined by using glucose as a standard as described previously (34). Ammonia was assayed by the method of Chaney and Marbach (8).

Gas samples were assayed for hydrogen and carbon dioxide by means of an Intersmat model IGC MB chromatograph equipped with a thermoconductivity detector (80 mA) and a column (2 m by 2 mm) fitted with Carbosieve (120 to 140 mesh size; Supelco). The column temperature was 100°C and the carrier gas was argon (1.2 bar at the column head). The injection temperature was 130°C and the detector temperature was 110°C. One-milliliter samples of the culture gas phase were injected directly into the gas chromatography apparatus with a 1-ml syringe.

Cell lysis was monitored by recording the DNA levels as a proportion of the intracellular cell proteins versus the protein/DNA ratios found in the supernatant. Cell DNA was measured by the method of Giles and Myers (17), and the DNA level in cell-free supernatants was determined after concentration by ethanol precipitation (36).

**Assay of glycolytic intermediates in cell extracts.** Dihydroxyacetone phosphate (DHAP), glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and fructose-1,6-bisphosphate (FBP) were extracted from a culture broth sample by  $\text{HClO}_4$  by using the rapid system described by Thomas et al. (40). The average time between cells leaving the fermentor and mixing with  $\text{HClO}_4$  was ca. 30 ms, and the final  $\text{HClO}_4$  concentration was 0.6 M. Samples were held in the syringe with the needle closed by a septum for 2 min at room temperature. Extracts were placed in ice for 10 min under  $\text{N}_2$  atmosphere before addition of 230 mg of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and were finally neutralized with 3 M KOH. Extracts were centrifuged ( $10,000 \times g$ , 4°C, 10 min), and supernatants were stored at -80°C until assayed.

Metabolites were measured by coupling appropriate enzyme assays with fluorimetric determination of the coenzyme NADH. Emission was measured at 459 nm after excitation at 341 nm with a fluorimeter (model F2000; Hitachi, Tokyo, Japan). DHAP, GAP, and FBP concentrations were determined by using an assay mixture containing 50 mM triethanolamine buffer (pH 7.6), 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12.5  $\mu\text{M}$  NADH, extract, and 4 U of glycerophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) to initiate DHAP consumption. After complete depletion of the DHAP in the extract, 100 U of triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) was added to measure the GAP concentration. Addition of 2.5 U of fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) allowed the FBP concentration in the extract to be measured.

**Determination of nucleotide pools.** Levels of nucleotides, ATP, ADP, NAD(P)<sup>+</sup>, and NAD(P)H in the biomass were measured by first extracting the nucleotides from a sample of culture. ATP and ADP were extracted with perchloric acid as described above for glycolytic intermediates.

ATP levels were measured by a luminescence assay employing the luciferin-luciferase system (Microbiol Biomass Test kit; Celsis Lumac, Landgraaf, The Netherlands). ADP was converted to ATP in a reaction mixture containing 2 ml of supernatant, 14 mM phosphocreatine in glycine buffer (0.1 M, pH 9.0), 0.4 mM  $\text{MgSO}_4$  and 4 U of creatine phosphokinase from rabbit muscle (EC 2.7.3.2) maintained for 15 min at 38°C. The reaction was stopped by heating (100°C) for 3 min, and the mixture was centrifuged for 15 min at  $8,000 \times g$ . NAD(P)<sup>+</sup> and

NAD(P)H were extracted with HCl and KOH, respectively, as described by Wimpenny and Firth (45).

Levels of coenzymes in both extracts were determined by fluorimetric measurements (see above). NAD<sup>+</sup> was assayed with NAD(H)-specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1), and NADP<sup>+</sup> was assayed with a glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (21, 24). NADH levels were determined by lactate dehydrogenase assay (21). NADPH was measured in a reaction mixture containing 100 mM triethanolamine buffer (pH 6.0), 20 mM  $\alpha$ -ketoglutaric acid, and 20 U of NAD(P)H-specific glutamate dehydrogenase from *Proteus* species (EC 1.4.1.4).

**Assay of extracellular pyruvate.** The NADH fluorimetric assay (see above) was adapted for the measurement of extracellular pyruvate by using 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.6) and 12.5  $\mu\text{M}$  NADH. Enzymatic determination of intracellular pyruvate levels was not possible due to significant interference with extracellular pyruvate, which lead to erroneous estimates of intracellular concentrations.

**Preparation of cell extracts.** Cell extracts were obtained as described previously (34). Protein concentrations of cell extracts were determined by the Lowry method (26) by using crystalline bovine serum albumin as the standard.

**Enzyme assays.** Fd-NAD(P)<sup>+</sup> reductase, NADH-fd reductase, hydrogenase (EC 1.1.2.7.1), glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), acetate kinase (EC 2.7.2.1), alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (ADH), and lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) (LDH), activities were assayed at 34°C as described previously (34). Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4) activity was determined by the method of Miller et al. (30) with carboxymethylcellulose as the substrate.

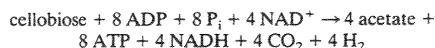
**Determination of the  $K_m$  values of LDH and PFO for pyruvate.** Crude extract (5 ml) was dialyzed anaerobically against 5 liters of phosphate buffer (5 mM, pH 7.4) changed three times at 4°C to remove intracellular pyruvate and FBP. LDH activity was measured as described previously (34). To determine  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  of the LDH, the NADH concentration was held constant at 0.4 mM and the pyruvate concentrations were varied from 0.25 to 30.00 mM. Pyruvate-fd oxidoreductase (PFO) (EC 1.2.7.1) was assayed as described by Meinecke et al. (28) except that 1 mM methyl viologen was used as the artificial electron acceptor. The reduction of methyl viologen was measured at 570 nm, and to determine  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  of the PFO, the pyruvate concentrations were varied from 0.05 to 2.00 mM.

**Calculations.** According to Papoutsakis and Meyer (33), a stoichiometric balance equation for biomass formation from cellobiose can be written in the form:

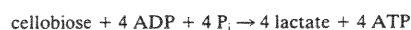


where  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  denotes the elemental composition of the biomass.

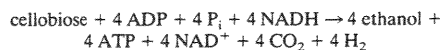
The main products of cellobiose fermentation by *C. cellulolyticum* were acetate, lactate, ethanol,  $\text{H}_2$ , and  $\text{CO}_2$  (15); because of the very low concentrations of extracellular pyruvate (detected in the medium only at dilution rates from 0.062 to  $0.138 \text{ h}^{-1}$ ), we have omitted this compound in the reactions leading to the formation of the metabolites, the formula for which can be written as follows:



The conversion of cellobiose to lactate is as follows:



The conversion of cellobiose to ethanol can be written as follows:



NADH is formed by GAPDH, and ATP is formed by phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase, and acetate kinase. The specific rates of NADH production and NADH consumption were calculated as follows:  $q_{\text{NADH produced}} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{ethanol}} - q_{\text{NADH used by ethanol and lactate production}} = q_{\text{lactate}} + 2 q_{\text{ethanol}}$  and  $q_{\text{NADH oxidized by the path NADH-fd-hydrogenase}} (q_{\text{NADH-fd}}) = q_{\text{NADH produced}} - q_{\text{NADH used}} (q_{\text{acetate}}, q_{\text{lactate}}, \text{ and } q_{\text{ethanol}} \text{ are the specific rates of product formation in millimoles per gram of cells per hour}). In the following sections,  $q_{\text{cellobiose}}$  is the specific rate of cellobiose used in millimoles per gram of cells per hour. The specific rate of pyruvate formation ( $q_{\text{pyruvate}}$ ) was determined as follows:  $q_{\text{pyruvate}} = q_{\text{acetate}} + q_{\text{lactate}} + q_{\text{ethanol}}$ .  $Y_{\text{ATP}}$  can be calculated (using acetate, lactate, and ethanol concentrations [concn] according to the equations described above) as follows:$

$$Y_{\text{ATP}} = \text{biomass concn} / (2 \text{ concn}_{\text{acetate}} + \text{conc}_{\text{ethanol}}).$$

$Y_{\text{ATP}}$  is expressed in grams of cells per mole of ATP produced.

Carbon recoveries were calculated from the production of metabolites, biomass, amino acids, proteins, and polysaccharides present in supernatant.  $\text{CO}_2$  levels were calculated from the concentrations of acetate and ethanol.

TABLE 1. Fermentation parameters for continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

Parameter <sup>a</sup>	Result obtained at a D (h <sup>-1</sup> ) of:						
	0.016	0.033	0.053	0.062	0.085	0.120	0.138
Biomass concn (g liter <sup>-1</sup> )	0.145 ± 0.005	0.210 ± 0.007	0.229 ± 0.007	0.250 ± 0.008	0.310 ± 0.012	0.370 ± 0.015	0.243 ± 0.009
Residual concn (mM) <sup>b</sup> of cellobiose	0.15 ± 0.06	0.14 ± 0.06	0.05 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.17 ± 0.07	0.11 ± 0.05	2.35 ± 0.12
$q_{\text{cellobiose}}$ (mmol [g of cells] <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.63	0.89	1.34	1.41	1.55	1.86	1.98
$q_{\text{pyruvate}}$ (mmol [g of cells] <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1.63	2.73	2.98	3.21	3.79	4.27	4.35
Product yield <sup>c</sup>							
Acetate	74.8	68.5	62.7	65.3	55.4	51.1	47.8
Lactate	2.8	2.0	2.5	4.5	6.6	11.5	8.3
Ethanol	22.5	29.5	34.9	30.6	38.0	37.5	43.9
Extracellular proteins (mg liter <sup>-1</sup> )	41.5 ± 1.5	14.0 ± 0.6	66.6 ± 2.8	42.0 ± 1.7	68.9 ± 2.7	<5.0	<5.0
Extracellular amino acids (mM)	1.14 ± 0.06	1.20 ± 0.07	1.05 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.98 ± 0.03	1.03 ± 0.06	0.82 ± 0.03
Polysaccharide (mg liter <sup>-1</sup> )	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5	5.6 ± 0.6	5.0 ± 0.6	8.3 ± 0.7	8.6 ± 0.7	27.7 ± 1.6
$Y_{\text{ATP}}$ (g of cells [mol of ATP] <sup>-1</sup> )	5.6	7.2	10.9	10.7	14.4	18.6	21.4
Carbon recovery (%)	84.2	98.2	80.5	77.9	90.7	86.8	90.0

<sup>a</sup> Values are the averages (± standard deviations) from three different chemostats. All other values were determined with an average accuracy of ±10%.

<sup>b</sup> The cellobiose and ammonium inputs were 5.84 and 15.13 mM, respectively.

<sup>c</sup> Product yields are expressed as percentages of  $q_{\text{pyruvate}}$ .

## RESULTS

**Effect of the dilution rate on biomass and metabolite formation.** *C. cellulolyticum* was grown under cellobiose limitation at proportions of culture volume replaced per hour (D) of 0.016 to 0.138 h<sup>-1</sup>, the highest D value at which a steady state could be attained (Table 1), since a maximum growth rate

( $\mu_{\text{max}}$ ) of 0.150 h<sup>-1</sup> was calculated during the early exponential phase of batch growth. At a cellobiose concentration in the feed medium of 5.84 mM and over a wide range of low dilution rates, the residual cellobiose concentrations were low and increased only at a D of 0.138 h<sup>-1</sup>. These data are typical of a continuous culture carried out under carbon limitation. The dry weight increased between 0.016 and 0.120 h<sup>-1</sup> and decreased markedly at 0.138 h<sup>-1</sup>, corresponding to cellobiose accumulation.

Table 1 summarizes the concentrations of the most important products measured at each steady state as a function of the growth rate. At all D values, the residual ammonium concentrations ranging from 9.5 to 13.7 mM were always in excess. Acetate, ethanol, and lactate were the primary metabolic end products; succinate accumulation was not observed. The rate of cellobiose consumption varied from 0.63 to 1.98 mmol (g of cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> with increasing growth rate. The ratio of  $q_{\text{pyruvate}}$  to  $q_{\text{cellobiose}}$  indicated that 55 to 77% of the consumed cellobiose was converted into end products and the rest was converted into biomass, polysaccharides, proteins, and amino acids.

Whatever the dilution rate, growth on ammonium led to amino acid appearance in the medium varying from 3 to 67  $\mu\text{mol liter}^{-1}$ . Besides the common amino acids, the following other amino compounds accumulated in the medium: phosphoserine (27  $\mu\text{mol liter}^{-1}$ ), citrulline (4  $\mu\text{mol liter}^{-1}$ ), aminobutyrate (2.5  $\mu\text{mol liter}^{-1}$ ), ornithine (3.5  $\mu\text{mol liter}^{-1}$ ), and

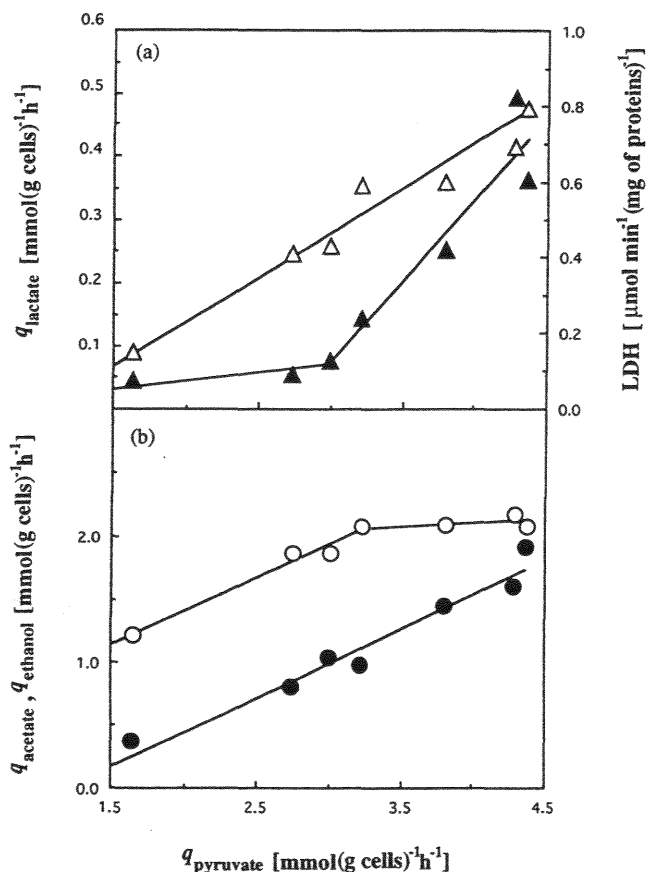


FIG. 1. Influence of the specific rates of pyruvate production in a cellobiose-limited continuous culture of *C. cellulolyticum* on specific rates of lactate production (▲) and in vitro specific LDH activities (△) (a) and on specific rates of acetate (○) and ethanol production (●) (b).

TABLE 2. Coenzyme balance for continuous steady-state culture of *C. cellulolyticum*

Parameter <sup>a</sup>	Result obtained at a D (h <sup>-1</sup> ) of:						
	0.016	0.033	0.053	0.062	0.085	0.120	0.138
$q_{\text{NADH}}$ produced	1.63	2.73	2.98	3.21	3.79	4.27	4.35
$q_{\text{NADH}}$ used	0.78	1.67	2.16	2.10	3.13	3.69	4.18
$q_{\text{NADH}}$ produced/ $q_{\text{NADH}}$ used	2.09	1.63	1.38	1.53	1.21	1.16	1.04
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ratio	ND <sup>c</sup>	1.69	1.37	ND	1.33	1.29	ND
$q_{\text{NADH-id}}$ from NADH <sup>b</sup>	0.85	1.06	0.82	1.11	0.66	0.58	0.17

<sup>a</sup>  $q_{\text{NADH}}$  produced,  $q_{\text{NADH}}$  used, and  $q_{\text{NADH-id}}$  from NADH are the specific rate of NADH production, the specific rate of NADH utilization, and the specific rate of hydrogen production from NADH, respectively (in millimoles per gram of cells per hour).

<sup>b</sup>  $q_{\text{NADH-id}}$  from NADH was calculated as  $q_{\text{NADH}}$  produced -  $q_{\text{NADH}}$  used.

<sup>c</sup> ND, not determined.

TABLE 3. Nucleotide levels in continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

Nucleotide	Concentration ( $\mu\text{mol} [\text{g of cells}]^{-1}$ ) <sup>a</sup> observed at a D ( $\text{h}^{-1}$ ) of:						
	0.016	0.033	0.053	0.062	0.085	0.120	0.138
NADH	8.89 ± 1.62	3.50 ± 0.67	4.06 ± 0.76	3.65 ± 0.65	6.16 ± 1.19	6.73 ± 1.25	5.51 ± 1.03
NAD <sup>+</sup>	4.27 ± 1.19	10.42 ± 2.71	10.35 ± 2.59	11.53 ± 3.19	15.03 ± 3.35	23.11 ± 3.70	22.05 ± 3.41
NADH/NAD <sup>+</sup>	2.08	0.33	0.39	0.32	0.41	0.29	0.25
NADH + NAD <sup>+</sup> pool	13.16	13.92	14.41	15.18	21.19	29.84	27.56
NADPH	8.27 ± 1.30	5.66 ± 0.98	3.18 ± 0.50	2.04 ± 0.37	3.87 ± 0.68	5.54 ± 0.89	6.46 ± 1.11
NADP <sup>+</sup>	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01

<sup>a</sup> Values are the averages ( $\pm$  standard deviations) from three different chemostats.

<sup>b</sup> ND, not detectable.

phosphoethanolamine ( $4 \mu\text{mol liter}^{-1}$ ). There was no apparent correlation between the extent of extracellular amino acids and protein accumulation. Cell lysis was a minor phenomenon since the protein/DNA ratios in cell extracts were found to be approximately 16 to 21, whereas values between 783 and 842 were found in the supernatant. DNA accumulation coming from cell lysis was chiefly observed when cellobiose was depleted. Conversely, carboxymethylcellulase activity was found to be related to the production of extracellular proteins. Extracellular polysaccharide production increased with the carbon flow mainly at a D of  $0.138 \text{ h}^{-1}$ . The global carbon balance (calculated by taking into account these compounds) was found to be in the range of 77.9 to 98.2%.

Cells growing on limiting concentrations of cellobiose formed hardly any lactate at low growth rates (Table 1); at a D of  $0.016 \text{ h}^{-1}$ , 74.8% of the  $q_{\text{pyruvate}}$  representing the cellobiose involved in energy production was converted into acetate, 22.5% was converted into ethanol, and only 2.8% was converted into lactate. The ratio of end products changed with the increase of the carbon flow and was strictly connected with levels of  $q_{\text{pyruvate}}$ ; at a D of  $0.138 \text{ h}^{-1}$ , the percentage of acetate decreased to 47.8% whereas lactate and ethanol percentages increased to 8.3 and 43.9%, respectively. The specific rate of lactate production increased rapidly when the specific rate of pyruvate production reached approximately  $3 \text{ mmol (g of cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 1a). Ethanol production increased linearly with the specific rate of pyruvate production, whereas acetate production showed a biphasic linear increase, slowing down when the specific rates of pyruvate production reached approximately  $3 \text{ mmol (g of cells)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 1b).

**Redox balances.** The formation of biomass from cellobiose is stoichiometrically written as follows:



where  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  denotes the elemental biomass composition and corresponds to a molecular weight of  $101 \text{ g mol}^{-1}$ .

Since  $Y_{\text{ATP}}$  values were found to be between 5.6 and  $21.4 \text{ g mol of ATP}^{-1}$  in continuous culture (Table 1), an average  $Y_{\text{ATP}}$  of  $12.7 \text{ g mol of ATP}^{-1}$  is calculated, and the preceding equation can be rewritten as



From this equation, reducing equivalents NAD(P)H required for biomass synthesis were supplied via the NAD(P)H generated from biomass formation, and no excess of NAD(P)H which could be balanced by the formation of products was formed. Furthermore, we have assumed that little  $\text{CO}_2$  was produced from general decarboxylation enzymes implicated in biomass synthesis. The pathways to acetic acid, ethanol, and lactic acid generate ATP for synthesis and maintenance of biomass.

The coenzyme balance calculated from the known catabolic pathways producing or consuming reducing equivalents demonstrate an excess of NADH since the  $q_{\text{NADH}}$  produced/ $q_{\text{NADH}}$  used ratio was always greater than 1 except at a D of  $0.138 \text{ h}^{-1}$ , where the NADH used equilibrated the NADH produced (Table 2). In spite of this imbalance, the NADH/NAD<sup>+</sup> ratios ranged from 0.25 to 0.41, meaning that the cells contained more NAD<sup>+</sup> than NADH except at a D of  $0.016 \text{ h}^{-1}$ , where a ratio of 2.08 was observed (Table 3). The regeneration of the excess of NADH into NAD<sup>+</sup> is due to the path NADH-fd-hydrogenase, since the measured  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  ratios were found to be greater than 1 (Table 2), although the phosphoclastic reaction produces 1 mol of  $\text{CO}_2$  and 1 mol of  $\text{H}_2$  per mol of pyruvate oxidized (31). It must be noted that the NAD<sup>+</sup> + NADH pools increased from 13.16 to  $29.84 \mu\text{mol (g of cells)}^{-1}$  with the increase of D.

TABLE 4. Enzymatic activities from cell extracts of continuous cultures of *C. cellulolyticum*

Enzyme	Specific activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg of protein}]^{-1}$ ) <sup>a</sup> observed at a D ( $\text{h}^{-1}$ ) of:						
	0.016	0.033	0.053	0.062	0.085	0.120	0.138
GAPDH	1.31 ± 0.17	3.34 ± 0.47	3.63 ± 0.45	3.30 ± 0.43	4.90 ± 0.66	4.41 ± 0.53	5.74 ± 0.70
Hydrogenase	0.030 ± 0.006	0.031 ± 0.004	0.042 ± 0.008	0.069 ± 0.018	0.068 ± 0.012	0.145 ± 0.022	0.176 ± 0.025
Fd-NADP <sup>+</sup> reductase	0.057 ± 0.015	0.070 ± 0.018	0.050 ± 0.013	0.072 ± 0.017	0.051 ± 0.012	0.062 ± 0.016	0.060 ± 0.014
Fd-NAD <sup>+</sup> reductase	0.047 ± 0.013	0.044 ± 0.011	0.046 ± 0.011	0.054 ± 0.015	0.047 ± 0.014	0.043 ± 0.010	0.054 ± 0.015
NADH-fd reductase	0.017 ± 0.004	0.009 ± 0.003	0.019 ± 0.006	0.018 ± 0.005	0.029 ± 0.009	0.018 ± 0.006	0.020 ± 0.006
Lactate dehydrogenase	0.15 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.60 ± 0.06	0.69 ± 0.10	0.79 ± 0.10
Alcohol dehydrogenase	0.22 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.51 ± 0.06	0.58 ± 0.06	1.52 ± 0.14	1.73 ± 0.19
Acetate kinase	1.15 ± 0.13	1.22 ± 0.18	1.15 ± 0.11	1.16 ± 0.11	1.57 ± 0.06	2.34 ± 0.25	2.02 ± 0.21

<sup>a</sup> One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of  $1 \mu\text{mol}$  of substrate per min. Values are the mean determinations ( $\pm$  standard deviations) from three different chemostats.



TABLE 5. Extracellular pyruvate levels and intracellular metabolite in continuous steady-state cultures of *C. cellulolyticum*

D (h <sup>-1</sup> )	Extracellular pyruvate ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Intracellular metabolite ( $\mu\text{mol}$ [g of cells] <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		
		DHAP	GAP	FBP
0.033	ND <sup>b</sup>	7.9 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.1
0.053	ND	8.9 $\pm$ 1.0	7.4 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.2
0.062	79.0 $\pm$ 4.3	15.5 $\pm$ 1.6	7.1 $\pm$ 1.2	2.1 $\pm$ 0.2
0.085	138.7 $\pm$ 7.7	21.9 $\pm$ 2.3	6.0 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.5
0.120	147.3 $\pm$ 8.0	30.2 $\pm$ 2.9	6.4 $\pm$ 1.2	2.4 $\pm$ 0.3
0.138	70.2 $\pm$ 3.5	32.7 $\pm$ 3.2	7.4 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 0.4

<sup>a</sup> Values are the averages of three determinations ( $\pm$  standard deviations).

<sup>b</sup> ND, not detectable.

Intracellular levels of NAD(P)<sup>+</sup> and NAD(P)H were measured under different growth conditions (Table 3). Whatever the dilution rate, levels of NADP<sup>+</sup> were hardly detectable or were undetectable, whereas the NADPH levels were between 2.04 and 8.27  $\mu\text{mol}$  (g of cells)<sup>-1</sup> and were available for biosynthesis reactions.

**Enzyme activities.** Specific activities in extracts of pelleted cells were measured at each steady state, and the influence of the growth rate on the specific activities of the enzymes is shown in Table 4. In vitro, GAPDH, lactate dehydrogenase, ethanol dehydrogenase, and acetate kinase activities were higher under conditions giving higher in vivo specific production rates. From the lowest (0.016 h<sup>-1</sup>) to the highest (0.138 h<sup>-1</sup>) D values, GAPDH increased 4.4-fold, LDH increased 5.3-fold, ADH increased 7.9-fold, and acetate kinase increased 1.8-fold.

A comparison of the specific activities measured with the flows of metabolites suggested that LDH had in vitro specific activities that correlated only weakly with the rate of lactate production (Fig. 1a). This can be explained by variation in the concentration of intracellular compounds which could regulate the lactate dehydrogenase activity. An increase in the extracellular pyruvate which was probably correlated with intracellular pyruvate was also noticed, but this intracellular pyruvate con-

centration was difficult to measure due to significant interference from extracellular pyruvate (Table 5). Excretion of pyruvate, a partially oxidized metabolic intermediate, must be considered an overflow and means that the PFO could no longer support the flux arriving from cellobiose. This overflow was well correlated with lactate formation (Fig. 2).

The apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values for pyruvate catalyzed by the LDH and the PFO were calculated from standard Lineweaver-Burk plots (data not shown), and  $K_m$  values were found to be 4.5 and 0.57 mM, respectively. These two enzymes show markedly different  $V_{max}/K_m$  ratios for pyruvate,  $0.182 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  in the case of LDH and  $5.02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  for the PFO, explaining the pyruvate overflow. As a consequence of the PFO saturation and the high apparent  $K_m$  value of the LDH for pyruvate, an increase of the intracellular pool of triose-phosphate occurred, namely, the DHAP, whereas GAP remained constant (Table 5). An increase of the intracellular FBP was also noticed, this compound being a facultative activator of the LDH activity. By assuming an internal volume of 1.67 ml (g of cell)<sup>-1</sup> (41), the steady-state internal FBP concentration was 0.60 to 2.04 mM (Table 5). LDH activity assayed in dialyzed cell extracts was increased 2.2-fold and 2.8-fold in presence of 1.00 mM and 2.00 mM FBP, respectively, and 1.8-fold by prior incubation with 4.50 mM pyruvate.

At each steady state, no NADPH-fd reductase activity was detected but a high level of fd-NADP<sup>+</sup> reductase activity was measured (Table 4), which suggests the involvement of NADPH-fd oxidoreductase in the production of NADPH, particularly since no glucose-6-phosphate dehydrogenase and transhydrogenase activities were detected.

With high specific activities of fd-NAD<sup>+</sup> reductase and of NADH-fd reductase, the NADH-fd oxidoreductase can function reversibly. However, as product formation coincided with an excess of NADH produced (Table 2), the NADH-fd reductase activity combined with hydrogenase activity could function in NADH oxidation and H<sub>2</sub> production, explaining how H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ratios greater than 1 were obtained (Table 2).

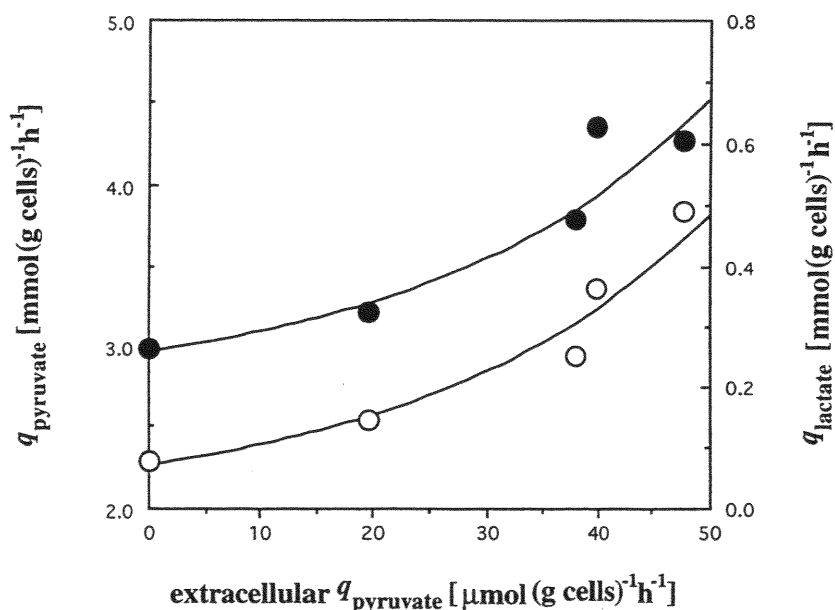


FIG. 2. Relation between the specific rates of extracellular pyruvate diffusion and the specific rates of pyruvate production (●) coming from cellobiose catabolism and the specific rates of lactate production (○).

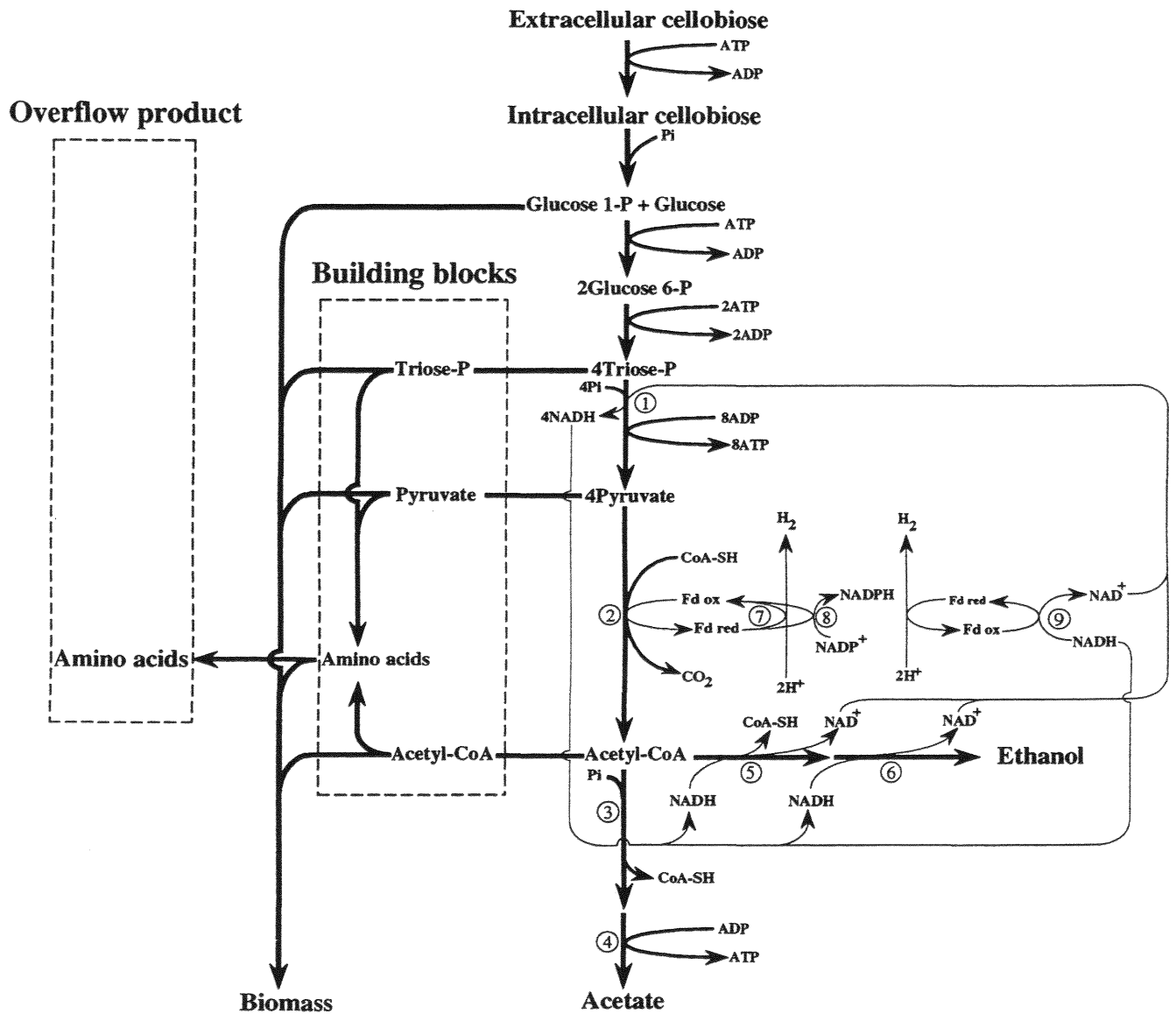


FIG. 3. Scheme of the carbon and electron flow distribution at a D of 0.033 h<sup>-1</sup>. Only the major flows are indicated in the direction of the arrows. Carbon and electron flows are symbolized by thick and thin lines, respectively. Enzymes (indicated by circled numbers): 1, GAPDH; 2, PFO; 3, phosphotransacetylase; 4, acetate kinase; 5, acetaldehyde dehydrogenase; 6, ADH; 7, hydrogenase; 8, Fd-NADP<sup>+</sup> reductase; 9, NADH-fd reductase.

**DISCUSSION**

The results presented in this article give consistent information on the mechanisms used by *C. cellulolyticum* to regulate cellobiose catabolism. Previous work carried out by using complex medium have led to a bottleneck, since carbon flow was stopped by a high level of intracellular NADH (34). This study shows that changing from complex to synthetic medium had strong effects on the following: (i) specific cellobiose consumption, which was increased from 0.68 (for the complex medium) to 1.98 mmol (g of cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (for the synthetic medium), whereas the highest dilution rate at which a steady state could be attained was increased from 0.120 (for the complex medium) to 0.138 h<sup>-1</sup> (for the synthetic medium) (in complex medium at a growth rate [μ] of 0.120 h<sup>-1</sup>, the dilution rate approaches the washout point since the dry weight of cells decreased by 78% of the maximal biomass [34] whereas in synthetic medium at a μ of 0.138 h<sup>-1</sup>, the biomass decreased

by 35%); (ii) electron flow, since the NADH/NAD<sup>+</sup> ratios were in the range 0.29 to 2.08 whereas ratios as high as 42 to 57 were observed on complex media (34). Clearly, these data indicate a better control of cellobiose catabolism by *C. cellulolyticum* on mineral salts medium than on complex medium.

When *C. cellulolyticum* was grown on complex medium, regardless of the dilution rate, cellobiose catabolism showed the same pattern, i.e., acetate was the main product, whereas the biosynthesis of ethanol and lactate was low (34). Conversely, on synthetic medium, this study reveals that formation of end products and their ratios can change within broad limits. These changes were not due to iron-limited culture media, which could have effects on the biosynthesis of iron proteins such as ferredoxin (25), PFO (43), and hydrogenase (9) and hence on the cellobiose metabolism, since we found that the growth of *C. cellulolyticum* was limited when the iron added to the medium was less than 0.2 mg liter<sup>-1</sup> (data not shown).





numerous precursors were found in the synthetic culture medium. The fact that lactate production occurred only in conditions of pyruvate overflow avoids competition between the lactate pathway and (i) PFO, which maximizes ATP formation via acetate production, and (ii) anabolism, since pyruvate is also the precursor of compounds such as alanine, valine, and leucine.

We can suppose that in natural environments, *C. cellulolyticum* will rarely find nutrient substances in high concentrations and that the complex medium with high concentrations of substrate may be unfavorable to *C. cellulolyticum*, which was unable to deal with a surfeit of substrates; under these conditions, the nutrients or products of its metabolism, such as were demonstrated for NADH (34), may accumulate intracellularly to toxic levels. It can be argued that during the course of evolution, *C. cellulolyticum* has evolved to optimize cellobiose catabolism and nitrogen anabolism under nutrient-poor conditions.

This study of synthetic medium with cellobiose has permitted the identification of regulatory responses of *C. cellulolyticum* and serves as a basis for additional work using bacteria growing on cellulose. Much remains to be learned about the physiology of these bacteria on insoluble substrates.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities FAIR program (contract CT 95-0191 [DG 12 SSMA]).

We thank M. Young for a critical reading of the manuscript. The technical assistance of Guy Raval and Cynthia Rousselot was greatly appreciated.

#### REFERENCES

- Bayer, E. A., Y. Shoham, J. Tormo, and R. Lamed. 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose, p. 155-182. In M. Fletcher (ed.), *Bacterial adhesion molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, New York, N.Y.
- Bayer, E. A., E. Morag, and R. Lamed. 1994. The cellulosome—a treasure trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12:379-386.
- Béguin, P., and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-28.
- Benoit, L., C. Cailliez, E. Petitdemange, and J. Gitton. 1992. Isolation of cellulolytic mesophilic clostridia from a municipal solid waste digester. *Microb. Ecol.* 23:117-125.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1324-1328.
- Cailliez, C., L. Benoit, J. P. Thirion, and H. Petitdemange. 1992. Characterization of 10 mesophilic cellulolytic clostridia isolated from a municipal solid waste digester. *Curr. Microbiol.* 25:105-112.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Chen, J. S., and L. E. Mortenson. 1974. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Biochim. Biophys. Acta* 371:283-298.
- Chung, K. T. 1976. Inhibitory effects of H<sub>2</sub> on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:342-348.
- Church, F. C., H. P. David, G. L. Catagniani, and H. G. Swaisgood. 1985. An O-phthalaldehyde spectrometric assay for proteinase. *Anal. Biochem.* 146:343-348.
- Felix, C. R., and L. G. Ljungdahl. 1993. The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:791-819.
- Gelhay, E., A. Gehin, and H. Petitdemange. 1993. Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3154-3156.
- Gelhay, E., H. Petitdemange, and R. Gay. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* 175:3452-3458.
- Giallo, J., C. Gaudin, J. P. Belaich, E. Petitdemange, and F. Caillet-Mangin. 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:843-849.
- Giallo, J., C. Gaudin, and J. P. Belaich. 1985. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1216-1221.
- Giles, K. W., and A. Myers. 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206:93.
- Huang, L., and C. W. Forsberg. 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1221-1228.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 33:117-132.
- Klingenberg, M. 1965. Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH, NADPH). Spectrophotometric and fluorimetric methods, p. 2045-2059. In H. Y. Bergmeyer (ed.), *Methods in enzymatic analysis*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Koch, A. L. 1997. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:305-318.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:399-426.
- London, J., and M. Knight. 1966. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 44:241-254.
- Lovenberg, W., B. B. Buchanan, and J. C. Rabinowitz. 1963. Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 238:3899-3913.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maglione, G., and J. B. Russel. 1997. The adverse effect of nitrogen limitation and excess cellobiose on *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:720-725.
- Meinecke, B., J. Bertram, and G. Gottschalk. 1989. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* 152:244-250.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Miller, G. L., R. Blum, W. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Chem.* 32:481-487.
- Mortenson, L. E., R. C. Valentine, and J. E. Carnahan. 1963. Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* 238:794-800.
- Ng, T., and J. G. Zeikus. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrostulfuricum*. *J. Bacteriol.* 150:1391-1399.
- Papoutsakis, E. T., and C. L. Meyer. 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27:50-66.
- Payot, S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhay, and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* 144:375-384.
- Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo, and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:155-159.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shi, Y., and P. J. Weimer. 1996. Utilization of individual cellooligosaccharides by three predominant ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1084-1088.
- Sleat, R., R. Mah, and R. Robinson. 1984. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:88-93.
- Strobel, H. J., F. C. Caldwell, and K. A. Dawson. 1995. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4012-4015.
- Thomas, T. D., D. C. Elwood, and M. C. Longyear. 1979. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.* 138:109-117.
- Thompson, J., and T. D. Thomas. 1977. Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130:583-595.
- Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37:1-81.
- Uyeda, K., and J. C. Rabinowitz. 1971. Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 246:3111-3119.
- Weimer, P. J., and J. G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:289-297.
- Wimpenny, J. W. T., and A. Firth. 1972. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. Bacteriol.* 111:24-32.

### III. Conclusion.

Les résultats de cette étude démontrent que la culture de *C. cellulolyticum* sur milieu synthétique permet:

✓ d'augmenter la vitesse de consommation du cellobiose puisque la valeur maximale obtenue sur milieu synthétique atteint 1,98 mmol de cellobiose consommé par g de cellules et par heure contre 0,68 mmol de cellobiose consommé par g de cellules et par heure sur milieu complexe.

✓ d'augmenter le taux de dilution pouvant être atteint sans lessivage du réacteur ( $0,138 \text{ h}^{-1}$  par opposition à  $0,120 \text{ h}^{-1}$  sur milieu complexe).

✓ de diminuer le rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (0,29 à 2,08 contre 42 à 57 sur milieu complexe).

Ces résultats indiquent que, sur milieu synthétique, *C. cellulolyticum* est capable de mettre en place des régulations qui n'étaient pas mises en œuvre sur milieu complexe.

En effet, sur milieu synthétique, des changements peuvent intervenir concernant la répartition entre les différents produits terminaux:

✓ à de faibles taux de dilution, dans des conditions de limitation du flux de cellobiose et de synthèse d'ATP, le pyruvate conduit préférentiellement à la formation d'acétate et d'éthanol. Cela permet à la bactérie d'optimiser sa synthèse d'ATP. Dans ces conditions, le maintien de l'équilibre redox est assuré par l'activité NADH-fd-réductase, comme en témoigne le rapport  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  supérieur à 1.

✓ L'augmentation du taux de dilution conduit à une production de lactate accrue lorsque la vitesse de consommation de cellobiose atteint 1,34 mmol de cellobiose par g de cellules et par heure (valeur supérieure à la vitesse de consommation de cellobiose maximale atteinte sur milieu complexe). Cette augmentation coïncide avec une accumulation de pyruvate qui témoigne de la saturation de la pyruvate-fd oxydoréductase. Les productions d'éthanol et de lactate permettent d'assurer le maintien de l'équilibre redox au sein de la cellule.

L'augmentation de la production de lactate, qui intervient lorsque le pyruvate s'accumule, permettrait d'éviter que cette voie n'entre en compétition (i) avec la voie de la pyruvate-fd-oxydoréductase qui assure une production maximale d'ATP via la formation d'acétate et (ii) avec l'anabolisme puisque le pyruvate est un précurseur d'acides aminés.

Sur milieu synthétique, le carbone issu du cellobiose peut entrer dans la composition de la masse cellulaire ou être utilisé pour produire de l'ATP alors que, sur milieu complexe, le cellobiose sert essentiellement de source d'énergie du fait de la présence de macromolécules préexistantes dans l'extrait de levure. Les conditions de culture sur milieu synthétique sont vraisemblablement plus proches de celles rencontrées par *C. cellulolyticum* dans son écosystème naturel ce qui expliquerait la mise en œuvre de régulations qui n'existaient pas sur milieu complexe. *C. cellulolyticum* n'est pas adapté pour faire face à l'abondance nutritionnelle fournie par le milieu complexe, ce qui expliquerait le dérèglement interne observé chez cette bactérie cultivée sur ce milieu.



## **CHAPITRE 4. ANALYSE DU PROCESSUS D'INHIBITION DE CROISSANCE ET DE SA LEVEE LORS DE CULTURES EN BATCH DE *C. CELLULOLYTICUM* SUR MILIEU COMPLEXE.**

### **I. Introduction.**

Nous avons montré que, lors de cultures en continu sur milieu complexe, la croissance de *C. cellulolyticum* était limitée par une vitesse faible de réoxydation du NADH, conduisant à une accumulation intracellulaire de ce nucléotide réduit (Payot *et al.*, 1998).

L'utilisation d'un milieu synthétique permettrait une augmentation de trois fois de la vitesse spécifique de consommation du cellobiose et une diminution du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> (Guedon *et al.*, 1999).

Ainsi, sur milieu synthétique, les cellules sont capables de mettre en œuvre des régulations pour contrôler le flux de carbone contrairement à ce qui est observé sur milieu complexe. *C. cellulolyticum* augmente notamment sa production d'éthanol et de lactate en accroissant les niveaux des enzymes correspondantes.

Dans cette étude, nous avons analysé plus en détail ce processus d'inhibition en étudiant la cinétique d'apparition du phénomène lors de cultures en batch de *C. cellulolyticum* sur milieu complexe. Nous avons, par ailleurs, mimé ce phénomène en réalisant des cultures sous atmosphère de CO.

### **II. Résultats.**

Les résultats de ces travaux sont exposés dans l'article suivant: 'Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *C. cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose.' (Research in Microbiology).



## Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose

Sophie Payot, Emmanuel Guedon, Eric Gelhaye, Henri Petitdemange\*

Laboratoire de biochimie des bactéries Gram+, université Henri Poincaré, faculté des sciences, BP 239,  
54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex, France

**Abstract** — When grown in batch cultures in fermentors with 23.4 mM cellobiose, *Clostridium cellulolyticum* displayed biphasic growth kinetics not associated with sequential substrate consumption and which led to a twofold higher production of biomass than previously reported. In the first growth phase, acetate was the major product of cellobiose metabolism, since lactate and ethanol productions remained low. Furthermore, an accumulation of intracellular NADH was observed. The transition towards the second growth phase was accompanied by an induction of lactate production, in such a way that lactate became the major product of *C. cellulolyticum* metabolism. In addition, a decrease in NADH concentration was measured, concomitant with this induction of lactate production and with the growth resumption. During both growth phases, the NADH-ferredoxin reductase-hydrogenase system played a major function in NADH regeneration, since H<sub>2</sub> production was 1.4- to 1.5-fold higher than that of CO<sub>2</sub>. Thus, we found that lactate production serves as an additional catabolic pathway enabling *C. cellulolyticum* to cope with excesses of carbon and NADH produced. Growth experiments on *C. cellulolyticum* under an atmosphere of carbon monoxide mimicked this phenomenon and confirmed that a high intracellular level of NADH can provide a barrier to bacterial growth. © 1999 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

*Clostridium cellulolyticum* / cellobiose / growth inhibition / NADH / lactate

### 1. Introduction

Cellulose makes up the major portion of plant matter and, as such, represents the most abundant renewable source of organic raw material of the planet. Cellulose is a very stable, linear polymer of  $\beta$ -1,4-linked glucose units [16] and is a relatively difficult substrate for microbes to degrade. Nevertheless, a wide variety of bacteria and fungi have evolved to efficiently hydrolyze cellulose-containing plant materials, thus counteracting its accumulation [29].

*Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319, a mesophilic cellulolytic bacterium, has been extensively studied to determine its growth parameters [9–12, 24]. In batch cultures on cellobiose, *C. cellulolyticum* uses low sugar quantities due to early inhibition of metabolism and growth, with this phenomenon having been reported in several other cellulolytic bacteria [4, 17, 21, 27, 28].

Using continuous cultures and a complex medium, Payot et al. suggested that growth of *C. cellulolyticum* is limited due to a low rate of NADH reoxidation leading to intracellular accumulation of the reduced nucleotide [24]. Changing from a complex to a synthetic medium enabled a threefold increase in specific cellobiose consumption and a decrease in NADH/NAD<sup>+</sup> ratios [6]. These data indicate that the carbon flow is better regulated on a

\* Correspondence and reprints

Tel.: + 33 3 83 91 20 53;

fax: + 33 3 83 91 25 50; hpetitde@lcb.u-nancy.fr

Abbreviations: fd, ferredoxin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; OD, optical density

mineral salt medium than on a complex medium. In addition, cells grown on a synthetic medium and at high levels of carbon flow were able to induce regulatory responses such as the production of ethanol and lactate by increasing the corresponding enzyme levels [6]. Such regulatory responses were not observed on a complex medium using continuous cultures, as small amounts of lactate and ethanol were found [24]. Production was not sufficient to balance out the NADH produced in the GAPDH step of glycolysis and led to an accumulation of NADH in the cell [24].

From knowledge obtained with continuous cultures, we decided to analyse the kinetics of the onset of the inhibition process in batch cultures using a complex medium and a high cellobiose concentration in order to further understand the metabolic regulation of *C. cellulolyticum*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All chemicals were reagent grade. Enzymes and coenzymes were obtained from Sigma. All gases used were purchased from Air Liquide.

### 2.2. Organism

*C. cellulolyticum* ATCC 35319, a mesophilic cellulolytic bacterium isolated from decayed grass [25], was used.

### 2.3. Medium and culture conditions

The strain was grown anaerobically at 34 °C in a complex medium (CM3) described previously [24].

The strain was routinely transferred to a medium containing 7.5 gL<sup>-1</sup> of cellulose MN 300 (Serva Feinbiochemica). Routine transfers were also carried out in 9 mL of medium supplemented with cellobiose (ICN Biochemicals) to a final concentration of 3 gL<sup>-1</sup>.

The medium was reduced by the Hungate technique [18] and was dispensed under a con-

stant flow of N<sub>2</sub> in Hungate tubes (Bellco Glass) or 'penicillin flasks' before autoclaving 20 min at 120 °C. The anaerobic culture technique used was that proposed by Hungate [18] as modified by Bryant [3].

Batch cultures were carried out in a 2-L fermentor (LSL Biolafitte) (1.5 L working volume) under filter-sterilized nitrogen gas and with gentle stirring (50 rpm). The temperature was controlled at 34 °C and medium pH was adjusted to 7.2 with 1 M NaOH. The bioreactor was inoculated (10%, v/v) with an exponential preculture.

In order to determine the effect of gases, culture-containing bottles were connected to a vacuum pump. Gases produced by the culture were removed by a vacuum of 500 mm of mercury column and replaced by an atmosphere of carbon monoxide, nitrogen, or hydrogen.

### 2.4. Growth measurement

Growth was measured by reading optical density (OD) at 600 nm with a Beckman Model 34 spectrophotometer. It was established that an optical density of 1 at 600 nm corresponded to a bacterial dry weight of 0.5 gL<sup>-1</sup> [7].

### 2.5. Analytical methods

The reducing sugars were determined by the method of Miller [23] using cellobiose as the standard. Glucose was measured enzymatically using glucose oxidase (Glucose Diagnostic Kit, Sigma) and undetermined reducing sugars (in mol equivalent glucose/L) were determined by subtracting cellobiose and glucose concentrations from total reducing sugars.

Ethanol, L-lactate, and acetate were determined spectrophotometrically with enzyme kits (Boehringer Mannheim).

Gas samples were assayed for hydrogen and carbon dioxide by means of an Intersmat model IGC MB chromatograph equipped with a thermoconductivity detector (80 mA) and a column (2 m by 2 mm) fitted with Carbosieve (120–140 mesh; Supelco). The column temperature was 100 °C and the carrier gas was argon (1.2 bar at



the column head). The injection temperature was 130 °C and the detector temperature was 110 °C. A 1-mL sample of the culture gas phase was injected directly into the gas chromatography apparatus by means of a 1-mL syringe.

## 2.6. Preparation of cell-free extracts

Cells were centrifuged at 12 000 g for 20 min at 4 °C. After washing with Tris buffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, pH 7.4), cells were resuspended in this buffer. The cells were then sonicated four times for 20 s at a frequency of 20 kcycles s<sup>-1</sup>, separated by 60 s (MSE, 150 W ultrasonic disintegrator). The supernatant was collected from the cell lysate following centrifugation at 12 000 g for 20 min at 4 °C. At each step, extracts were maintained under anaerobic conditions by oxygen-free nitrogen gassing. Protein concentrations of cell extracts were determined according to the Bradford method [2] using crystalline bovine serum albumin as the standard.

## 2.7. Enzyme assays

Enzymes were assayed as described previously [24].

## 2.8. Extraction of nucleotides

NADH and NAD<sup>+</sup> levels were measured after extraction of culture broth samples. Ten-mL culture samples were rapidly removed from the fermentor with sterile syringes and immediately put into tubes containing extractant. Cells were not separated from the medium except for the NAD<sup>+</sup> determination. NAD<sup>+</sup> was extracted with HCl (NADH was degraded), NADH was extracted with KOH (degrading NAD<sup>+</sup>) as described by Wimpenny and Firth [31]. For the NAD<sup>+</sup> determination, cells were centrifuged and resuspended in deionized water to avoid medium interference during the fluorimetric assays. NADH was measured using a lactate dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) assay [20], in which the decrease in fluorescence (Hitachi, model F-2000) was proportional to the quantity of NADH. NAD<sup>+</sup> was assayed with an NADH-

specific alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) [20, 30] and the resulting NADH was determined by fluorimetry.

## 3. Results

### 3.1. Growth characteristics

Batch cultures with 23.4 mM cellobiose were performed in pH regulated fermentors (pH 7.2). Under these conditions, *C. cellulolyticum* displayed biphasic growth kinetics (figure 1A). Indeed, growth of *C. cellulolyticum* occurred for 13–14 h with a biomass production of 0.50–0.55 gL<sup>-1</sup> as previously reported [11] and after a growthless phase of 3–4 h, growth resumption was observed with a biomass production of 1.0 gL<sup>-1</sup>.

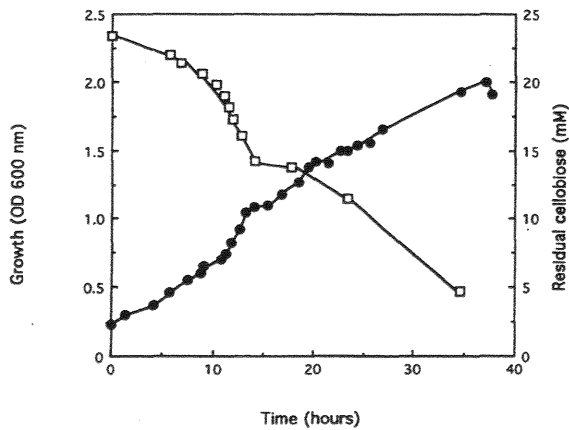
Cellobiose was the only sugar used by the cells (figure 1A). Indeed, only a small amount of glucose (0.5 mM) and other undetermined reducing sugars (1.7 mM eq. glucose) were detected in the culture medium, even before inoculation. No variation in the concentrations of these compounds was observed during either growth phase.

### 3.2. Metabolite production

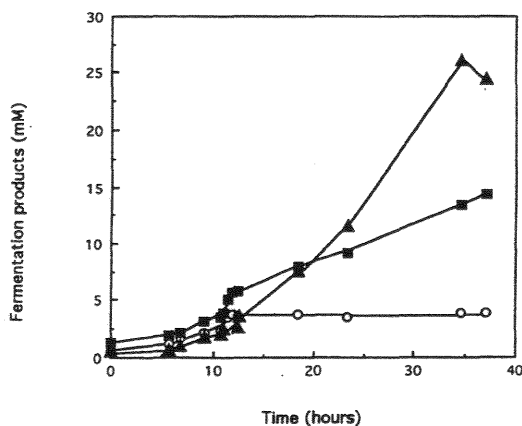
As reported earlier [8, 11], the main products of cellobiose fermentation were acetate, lactate, ethanol, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. As shown in figure 1B, a mixed acid fermentation occurred during the first growth phase leading to the formation of about 6 mM acetate, 4 mM ethanol, and 3 mM lactate. In addition, pyruvate production was detected during this first growth phase, since the extracellular concentration of this compound increased from 2.5 to 12.0 μM.

During the second growth phase, we observed an increase in lactate production with a final concentration of lactate reaching 26 mM. During this period, ethanol production was stopped, whereas acetate increased to 14 mM (figure 1B). At the same time, the pyruvate concentration increased to 30 μM (data not shown). In addition, the rate of acetate production decreased from an average of 1.2 mmol

A.



B.



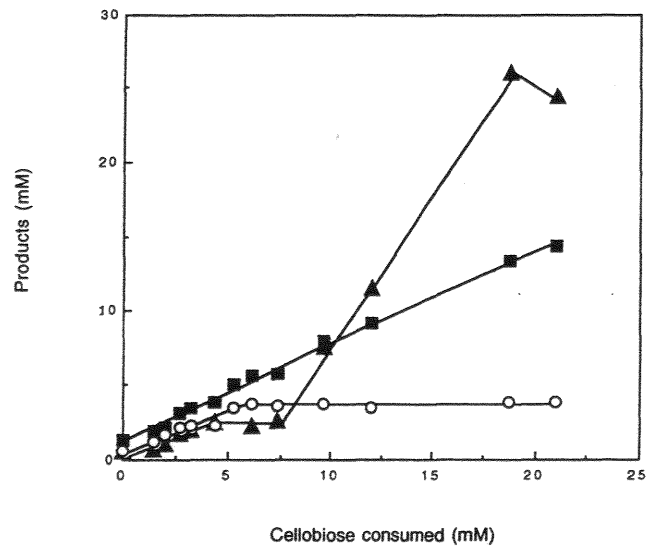
**Figure 1.** Growth kinetics of *C. cellulolyticum* in CM3 medium with 23.4 mM cellobiose in pH 7.2 regulated fermentors: **A.** Optical density (●) and residual cellobiose concentration (□); **B.** fermentation products: acetate (■), lactate (▲) and ethanol (○). Each point is the mean value obtained from three separate cultures (SD less than 5%).

(g cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the first growth phase to an average of 0.5 mmol (g cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in this second growth phase.

Furthermore, we followed the relative productions of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. During both growth phases, the ratio H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> did not vary substantially and was found to be 1.4 and 1.5.

### 3.3. Fermentation parameters

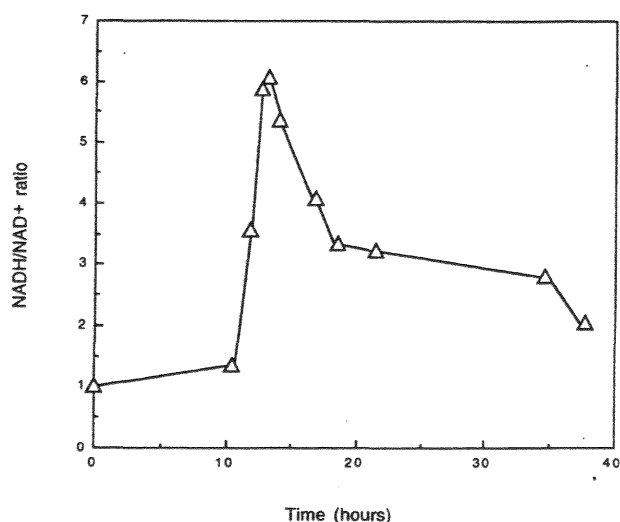
During both growth phases, acetate production increased linearly with cellobiose con-



**Figure 2.** Metabolite production (acetate, (■), lactate (▲), and ethanol (○)) as a function of cellobiose consumed in batch cultures of *C. cellulolyticum* performed with 23.4 mM cellobiose in pH 7.2 regulated fermentors. Each point is the mean value obtained from three separate cultures (SD less than 5%).

sumed, with a quite constant calculated yield of 0.7 to 0.8 mol acetate (mol cellobiose)<sup>-1</sup>. By contrast, ethanol production was stopped beyond 7 mM cellobiose consumed (corresponding to the second growth phase) with a yield decreasing from 0.5 mol ethanol (mol cellobiose)<sup>-1</sup> to zero. In addition, the part of the cellobiose consumed for lactate production was significantly increased, with a yield ranging from 0.8 to 2.0 mol lactate (mol cellobiose)<sup>-1</sup> beyond 7 mM cellobiose consumed.

Such an increase in lactate production led to higher carbon recovery: 61% compared to 41% only below 7 mM cellobiose consumed (e.g., in the first growth phase). Carbon recoveries did not include cells, since it is difficult to estimate the amount of cellobiose used for biomass production on a complex medium. Assays for glycogen synthesis revealed glycogen storage reaching about 25 mg (g cells)<sup>-1</sup>. Furthermore, microscopic observation revealed a polysaccharidic network where the cells were embedded, which would account for the low values observed in carbon recovery. Several procedures were tested to measure these exopolysaccha-



**Figure 3.** Time course of NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in batch cultures of *C. cellulolyticum* performed with 23.4 mM cellobiose in pH 7.2 regulated fermentors. Each point is the mean value obtained from three separate cultures (SD less than 5%).

rides. None gave satisfactory results. Interference, probably due to a component of the complex CM3 medium used, may have been responsible for the results obtained (high background and nonreproducibility). Furthermore, filtration or dialysis of the samples did not remove this interference.

### 3.4. Nucleotide levels

The intracellular concentrations of NADH and NAD<sup>+</sup> were followed during both growth phases. Variations in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio (figure 3) were due chiefly to variations in NADH concentrations, since the intracellular NAD<sup>+</sup> concentration did not vary substantially (around 1.5  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$ ).

In the first growth phase, due to the increase in the intracellular NADH level (reaching about 9.5  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$ ), the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio varied from 1 to 6 (figure 3). After 13 h of fermentation (corresponding to the beginning of the transition toward the primarily lactic fermentation; figure 1B), the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio decreased (figure 3). This decrease in the intracellular NADH concentration was also concomitant with growth resumption (figure 1A).

### 3.5. Catabolic enzymatic activities

To further investigate the observed phenomenon, catabolic enzymatic activities were measured at different growth stages, i.e., i) in the first growth phase (OD 0.42), ii) in the transition phase (OD 0.95), and iii) during the second growth phase (OD 1.56 and OD 1.80) (see figure 1).

All the oxidoreductases exhibited maximal activity with NAD<sup>+</sup> rather than with NADP<sup>+</sup>, except in the case of fd-NADP<sup>+</sup> reductase activity (fd-NAD<sup>+</sup> and NADPH-fd reductase activities were rarely detected). Measured enzymatic activities were found to decrease during growth, except for that of LDH, the activity of which increased (table I). The decrease in phosphoroclastic activity from 0.330 (at OD 0.42) to 0.099  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (at OD 1.8) correlated with the transition toward primarily lactic fermentation.

### 3.6. Effect of CO and H<sub>2</sub> on growth and product formation

CO is a known inhibitor of hydrogenase [15]. When batch cultures were performed under a CO atmosphere, growth inhibition was obtained, since the biomass produced and cellobiose consumed reached only 0.25  $\text{g L}^{-1}$  and 9.2 mM, respectively. Furthermore, CO gassing triggered the production of pyruvate (the maximal production of pyruvate observed in these conditions reached about 2000  $\mu\text{M}$  compared to 30  $\mu\text{M}$  in control conditions).

In addition, CO gassing led to a 3.5-fold increase in the NADH level (from 6 to 21.2  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$ ). This increase in the intracellular NADH concentration was observed after a 1.8 mM cellobiose consumption as compared to a 7.9-mM cellobiose consumption under a nitrogen atmosphere (figure 4A). As observed under a nitrogen atmosphere, the NAD<sup>+</sup> concentration remained relatively unchanged (about 1.0  $\mu\text{mol (g cells)}^{-1}$ ) during CO gassing; we therefore chose to show only NADH concentrations in figure 4A. The induction of lactate production was also strongly moved forward (at 2.7 mM cellobiose consumed) compared to the control



**Table 1.** Enzymatic activities from cell extracts of batch cultures of *C. cellulolyticum*.

Enzyme	Specific activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$ )			
	OD 0.42	OD 0.95	OD 1.56	OD 1.80
GAPDH	3.7 (0.8)	3.7 (0.8)	2.0 (0.3)	2.8 (0.4)
Phosphoroclastic activity	0.330 (0.070)	0.156 (0.015)	0.123 (0.010)	0.099 (0.009)
Hydrogenase	3.64 (0.34)	2.35 (0.80)	0.69 (0.05)	0.71 (0.05)
Lactate dehydrogenase	0.116 (0.003)	0.111 (0.017)	0.184 (0.008)	0.231 (0.010)
Acetate kinase	5.14 (0.62)	3.70 (0.50)	2.27 (0.40)	1.73 (0.30)
Alcohol dehydrogenase	0.296 (0.021)	0.30 (0.05)	0.11 (0.01)	ND
fd-NADP <sup>+</sup> reductase	0.012 (0.003)	0.018 (0.003)	0.008 (0.001)	ND
NADH-fd reductase	0.027 (0.002)	0.014 (0.002)	0.012 (0.001)	ND

Figures in parentheses indicate standard deviation from triplicate experiments. ND, not determined.

experiment (7.5 mM cellobiose consumed) (figure 4B).

H<sub>2</sub> gassing did not lead to significant changes in cellobiose catabolism compared to control cultures performed under a nitrogen atmosphere: in particular, no change was observed in the endproduct formation (lactate, acetate, and ethanol), nor in the intracellular NADH concentration (data not shown).

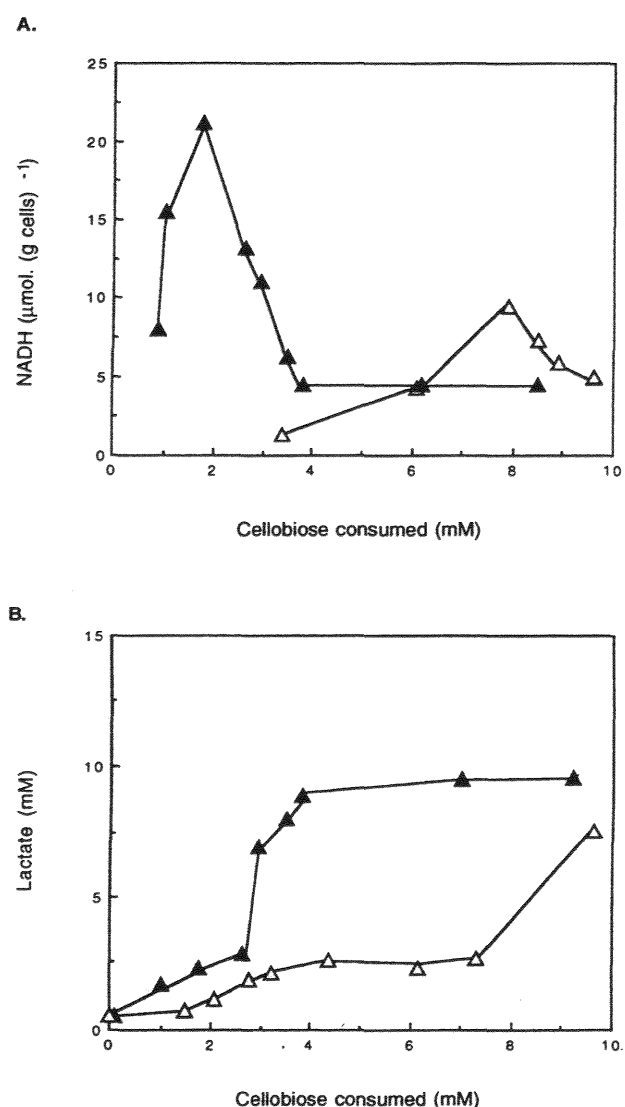
#### 4. Discussion

*C. cellulolyticum* was previously found to undergo early growth stoppage when grown in batch cultures on cellobiose [11]. Furthermore, using chemostat cultures, we had previously suggested that growth of *C. cellulolyticum* is limited due to a low rate of NADH reoxidation leading to an intracellular accumulation of the reduced nucleotide [24]. In addition, a threefold increase in the specific cellobiose consumption, along with a decrease in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratios, were obtained using continuous cultures carried out on a synthetic medium. These data indicate that better control of carbon and electron flows was achieved on a synthetic medium. On a synthetic medium, cellobiose carbon was converted into cell biomass and catabolized to produce ATP, whereas on a complex medium, it served mainly as an energy supply and, if present in excess, led to an accumulation of intracellular metabolites as demonstrated for NADH. Furthermore, regulatory responses,

such as induction of ethanol and lactate productions, which were not observed on a complex medium using continuous cultures, were obtained using a synthetic medium. This production of reduced compounds contributes to maintaining the redox balance and explains the lower NADH/NAD<sup>+</sup> obtained on a synthetic medium [6].

In this study, we demonstrated that, under our experimental conditions (pH-regulated fermentors, 23.4 mM initial cellobiose concentration), *C. cellulolyticum* displays biphasic growth kinetics. This phenomenon is not associated with sequential substrate consumption since cellobiose was the only substrate used throughout growth. In these conditions, the maximal detected biomass was twofold higher than reported previously [8, 11].

The first growth phase is characterised by a mixed acid fermentation. In this case, since ethanol and lactate production remained low, the major way to regenerate the produced NADH is hydrogen production via the NADH-fd reductase/hydrogenase system, important enzymes controlling the electron flow in anaerobic fermentation [19]. Indeed, the detected H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ratio (1.4–1.5) and the strongly detected hydrogenase activity demonstrate that the NADH-fd reductase/hydrogenase system functions in this first growth phase. However, the increase in the intracellular NADH concentration suggests that this pathway is not able to cope with the flow of NADH produced. H<sub>2</sub>



**Figure 4.** **A.** Intracellular NADH concentration and **B.** lactate production as a function of cellobiose consumed under  $N_2$  ( $\Delta$ ) or  $CO$  ( $\blacktriangle$ ) atmosphere in batch cultures of *C. cellulolyticum* performed with 23.4 mM cellobiose. Each point is the mean value obtained from three separate cultures (SD less than 5%).

production is not inhibited by hydrogen accumulation. Indeed, as reported previously [11], our experiments confirmed that under a hydrogen atmosphere, no major changes in the growth parameters of *C. cellulolyticum* on cellobiose occurred. Since a high NADH/NAD<sup>+</sup> ratio inhibits in vitro GAPDH activity in *C. cellulolyticum* [24], a possible limitation of the

carbon flow through glycolytic and acid or solvent-producing-pathways could occur during this growth phase. Such a bottleneck could explain the low carbon recovery observed in this first growth phase, with a large part of the cellobiose consumed being devoted to polysaccharides and glycogen biosynthesis.

In continuous cultures on a complex medium, no induction of lactate production was observed [24]. In this study, we demonstrated that, in batch culture, this NADH oxidizing pathway is induced. This induction, correlated with the increase of LDH activity, was found to be concomitant with the cell ability to decrease the NADH concentration, allowing cellobiose consumption and growth resumptions. In addition, in this second growth phase, the NADH-fd reductase/hydrogenase system continued to function, since the  $H_2/CO_2$  ratio remained constant (1.4–1.5).

Since the production of lactate enables an equilibrium between NADH produced and consumed, it did not require involvement of the NADH-fd reductase/hydrogenase system to reoxidize NADH. Moreover, the decrease in the rate of acetate production in the second growth phase led to a lower rate of NADH production. Indeed, acetate is produced from pyruvate which, in turn, is formed via the glycolysis pathway with NADH production at the GAPDH step. Since acetate production does not enable NADH consumption, the balance is in favour of NADH production when pyruvate is converted into acetate. We hence hypothesize that the NADH-fd reductase/hydrogenase system activity enables the removal of excess intracellular NADH. This could explain the decrease in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio observed. In addition to its role as a carbon overflow pathway, lactate production could hence indirectly favour NADH reoxidation, thus enabling resumption of growth and cellobiose consumption.

Similar growth inhibition can be obtained by employing  $CO$  gassing of batch cultures of *C. cellulolyticum*. The results obtained from the  $CO$  challenge demonstrate that inhibition of the hydrogenase activity mimicked saturation of the NADH-fd reductase/hydrogenase system.

Hydrogenase inhibition led to insufficient NADH oxidation, which was responsible for an increase in the intracellular NADH concentration. An induction of lactate production was triggered and favoured a decrease in NADH cell content.

Many clostridia are able to induce a metabolic shift to produce solvents (ethanol, butanol, or acetone) [14]. We demonstrate that, in batch cultures on a complex medium, *C. cellulolyticum* is able to induce lactate production but not production of solvents such as ethanol. This metabolic behaviour is not a shift from acetic fermentation to homolactic fermentation as observed in many species of lactic acid bacteria [26]. In *C. cellulolyticum*, lactate production is an additional catabolic pathway allowing the bacterium to cope with an excess of carbon and NADH produced.

Furthermore, in this study, we have shown that *C. cellulolyticum* is able to modify the size of the nicotinamide adenine dinucleotide pool. Although intracellular NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations play an important role in the cellular metabolic network of microorganisms, few data are reported in the literature concerning their level of evolution during growth phases. In clostridia, the intracellular concentrations of NAD(H) were chiefly determined under carbon limitation and were found to be around 7–14  $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$  [13, 22]. Nevertheless, values as high as 39.8  $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$  were reported in *C. kluyveri* [5]. In *C. butyricum*, intracellular concentrations increased from 3.9 to 24.5  $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$  with increasing dilution rate, whereas the NAD<sup>+</sup> content remained almost constant [1]. In *C. cellulolyticum* grown in continuous culture, the NADH concentration sharply increased with the dilution rate and also with the carbon flow, from 3 to 40  $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$ ; in parallel, the NAD<sup>+</sup> concentrations remained low (from 0.5 to 1.0  $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$ ). It is well known that in batch cultures, the specific growth rates, the specific rates of substrate consumption, and metabolite production change during the experiment. In these conditions and due to the low rate of NADH reoxidation, a concomitant increase in the pool

size of nicotinamide adenine dinucleotide probably could help the cells to maintain the constant NAD<sup>+</sup> pool size needed for cellobiose catabolism. Further studies are required to clearly understand the role and regulation of these observed changes in the pool size of nicotinamide adenine dinucleotides.

**Résumé** — L'induction de la production de lactate permet la reprise de croissance de *C. cellulolyticum*, cultivé en batch sur cellobiose, en diminuant la concentration intracellulaire de NADH. Des cultures en batch de *C. cellulolyticum* ont été réalisées en fermenteur à pH régulé avec 23,4 mM de cellobiose. Dans ces conditions de culture, la croissance de *C. cellulolyticum* présente deux phases distinctes, bien que le même substrat soit utilisé tout au long de la croissance. La biomasse obtenue est alors deux fois plus élevée que celle décrite habituellement. Lors de la première phase de croissance, le produit majeur du métabolisme est l'acétate, la production de lactate ou d'éthanol restant faible. De plus, on observe une accumulation de NADH intracellulaire. La reprise de croissance s'accompagne d'une induction de la production de lactate, le lactate devenant alors le produit majoritaire du métabolisme de *C. cellulolyticum*; et d'une diminution de la concentration intracellulaire de NADH. Lors des deux phases de croissance, la production de H<sub>2</sub> demeure 1,4 à 1,5 fois plus élevée que celle de CO<sub>2</sub>, ce qui témoigne du rôle joué par le système NADH-ferredoxine réductase-hydrogénase dans la régénération du NADH. La production de lactate constitue donc une voie additionnelle permettant à *C. cellulolyticum* de faire face aux excès de carbone et de NADH produit. Des expériences de croissance réalisées sous atmosphère de CO ont permis de mimer ce phénomène et confirment qu'un niveau élevé de NADH intracellulaire peut constituer un frein pour la croissance bactérienne. © 1999 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

*Clostridium cellulolyticum* / cellobiose / inhibition de croissance / NADH / lactate

## Acknowledgments

We thank Dr E. McRae for English grammar and spelling corrections. This work was supported by the Commission of European Com-



munities FAIR Program (contract no. CT 95-0191 (DG 12 SSMA)) and by the program Agrice (no. 97 01 041).

## References

- [1] Abbad-Andaloussi S., Durr C., Raval G., Petitdemange H., Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose, *Microbiology* 142 (1996) 1149-1158.
- [2] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [3] Bryant M.P., Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria, *Am. J. Clin. Nutr.* 25 (1972) 1324-1328.
- [4] Cailliez C., Benoit L., Thirion J.P., Petitdemange H., Characterization of 10 mesophilic cellulolytic Clostridia isolated from a municipal solid waste digester, *Curr. Microbiol.* 25 (1992) 105-112.
- [5] Decker K., Pfitzer S., Determination of steady-state concentration of adenine nucleotides in growing *C. kluuyveri* cells by biosynthetic labeling, *Anal. Biochem.* 50 (1972) 529-539.
- [6] Guedon E., Payot S., Desvaux M., Petitdemange H., Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3262-3269.
- [7] Gehin A., Gelhaye E., Raval G., Petitdemange H., *Clostridium cellulolyticum* viability and sporulation under cellobiose starvation conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 868-871.
- [8] Gehin A., Cailliez C., Petitdemange E., Benoit L., Studies of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 under dialysis and co-culture conditions, *Lett. Appl. Microbiol.* 23 (1996) 208-212.
- [9] Gelhaye E., Gehin A., Petitdemange H., Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 3154-3156.
- [10] Gelhaye E., Petitdemange H., Gay R., Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 3452-3458.
- [11] Giallo J., Gaudin C., Belaich J.P., Petitdemange E., Caillet-Mangin F., Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic Clostridium sp. strain H10 *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 843-849.
- [12] Giallo J., Gaudin C., Belaich J.P., Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10 *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1985) 1216-1221.
- [13] Girbal L., Soucaille P., Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6433-6438.
- [14] Girbal L., Croux C., Vasconcelos I., Soucaille P., Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *FEMS Microbiol. Rev.* 17 (1995) 287-297.
- [15] Gray C.T., Gest H., Biological formation of molecular hydrogen, *Science* 148 (1965) 186-192.
- [16] Hon D.N.S., Cellulose: a random walk along its historical path, *Cellulose I* (1994) 1-25.
- [17] Huang L., Forsberg C.W., Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1221-1228.
- [18] Hungate R.E., A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, *Methods in Microbiology*, London, Academic Press, vol. in: Norris J.R., Ribbons D.W. (Eds), 33, 1969, pp. 117-132.
- [19] Jungermann K., Thauer R.K., Leimenstoll G., Decker K., Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia, *Biochim. Biophys. Acta* 305 (1973) 268-280.
- [20] Klingenberg M., Spectrophotometric and fluorimetric methods: nicotinamide adenine dinucleotides (NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH) in: Bergmeyer H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, second edition, Academic Press, New York, vol. 4, pp. 1965, 2045-2059.
- [21] Maglione G., Russel J.B., The adverse effect of nitrogen limitation and excess-cellobiose on *Fibrobacter succinogenes*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 720-725.
- [22] Meyer C.L., Papoutsakis T., Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 450-459.
- [23] Miller G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426-428.
- [24] Payot S., Guedon E., Cailliez C., Gelhaye E., Petitdemange H., Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth, *Microbiology* 144 (1998) 375-384.
- [25] Petitdemange E., Caillet F., Giallo J., Gaudin C., *Clostridium cellulolyticum* sp. nov. a cellulolytic mesophilic species from decayed grass, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (1984) 155-159.
- [26] Russel J.B., Bond D.R., Cook G.M., The fructose diphosphate/phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram positive anaerobes, *Res. Microbiol.* 147 (1996) 528-535.
- [27] Shi Y., Weimer P.J., Utilization of individual cellooligosaccharides by three predominant ruminal cellulolytic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1084-1088.
- [28] Sleat R., Mah R., Robinson R., Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov., *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 88-93.
- [29] Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R., Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, *Adv. Microbiol. Physiol.* 37 (1995) 1-81.
- [30] Vasconcelos I., Girbal L., Soucaille P., Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixture of glucose and glycerol, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 1443-1450.
- [31] Wimpenny J.T.W., Firth A., Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and effect of oxygen, *J. Bacteriol.* 111 (1972) 24-32.

### III. Conclusion.

Les résultats de ces travaux indiquent que, lors de cultures en batch réalisées en fermenteur à pH régulé avec une concentration élevée en cellobiose (23,4 mM), la croissance de *C. cellulolyticum* présente deux phases distinctes. Il ne s'agit pas d'une diauxie puisque le même substrat est utilisé tout au long de la croissance. Dans ces conditions de culture, on obtient une biomasse deux fois plus élevée que celle décrite habituellement.

Lors de la première phase de croissance, le produit majeur du métabolisme est l'acétate, la production de lactate et d'éthanol restant faible. Le système NADH-fd-oxydoréductase/hydrogénase constitue alors la voie majeure de régénération du NADH, comme en témoignent le rapport  $H_2/CO_2$  supérieur à 1 et la forte activité hydrogénase mesurée. Cependant, une accumulation de NADH est observée ce qui suggère que ce système n'est pas suffisant pour régénérer la totalité du NADH produit. La production d'hydrogène n'est pas responsable du processus d'inhibition puisque, lors de cultures réalisées sous atmosphère de  $H_2$ , les paramètres de croissance ne sont pas modifiés. Puisqu'un rapport  $NADH/NAD^+$  élevé inhibe l'activité GAPDH de *C. cellulolyticum in vitro* (Payot *et al.*, 1998), une limitation du flux carboné pourrait intervenir à ce niveau. Cela expliquerait le faible rendement carboné obtenu lors de cette première phase de croissance, une part importante du cellobiose consommé étant destinée à la biosynthèse de polysaccharides et de glycogène.

Contrairement à ce qui était observé dans le cas des cultures en continu, une induction de la production de lactate a été obtenue lors de ces cultures en batch sur milieu complexe. Cette induction, corrélée à une augmentation de l'activité lactate déshydrogénase, est concomitante avec la diminution de la concentration en NADH, permettant une reprise de la croissance et de la consommation du cellobiose. Dans ces conditions, le système NADH-fd-réductase/hydrogénase continue à fonctionner puisque le rapport  $H_2/CO_2$  reste constant.

La production de lactate permet un équilibre entre NADH produit et NADH consommé et ne nécessite donc pas l'intervention supplémentaire du système NADH-fd-réductase/hydrogénase. A l'opposé, la formation d'acétate engendre une production de NADH lors de la glycolyse, sans régénération ultérieure de NADH. Elle nécessite donc l'intervention de ce système de régénération du NADH. La diminution de la production d'acétate, lors de la deuxième phase de croissance, conduit à une vitesse de formation de NADH plus faible, permettant au système NADH-fd-réductase/hydrogénase d'assurer une régénération suffisante

de NADH. Cela se traduit par une diminution de la teneur intracellulaire en NADH. En plus de son rôle d'évacuation de l'excès de carbone, l'induction de la production de lactate favoriserait donc indirectement la réoxydation du NADH et donc la reprise de croissance et de consommation de cellobiose.

Ce phénomène peut être reproduit en réalisant les cultures sous atmosphère de CO<sub>2</sub>, par le biais de l'inhibition de l'activité hydrogénase. Cette inhibition conduit à un défaut de réoxydation du NADH, augmentant ainsi la teneur en NADH intracellulaire. Dans ces conditions de culture, une induction de la production de lactate a été obtenue.

De nombreux clostridia sont capables d'induire des changements métaboliques, comme *C. acetobutylicum* qui peut déclencher une production de solvants (Girbal *et al.*, 1995a). Lors de cultures en batch sur milieu complexe, *C. cellulolyticum* est capable d'induire la production de lactate, donc d'un deuxième acide et non d'un solvant ce qui témoigne de l'existence d'un comportement particulier pour cette bactérie.

Nous avons montré, par ailleurs, que *C. cellulolyticum* était capable d'augmenter son pool NADH+NAD<sup>+</sup> comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Abbad-Andalousi *et al.*, 1996; Decker and Pfitzer, 1972). Cela permettrait à la cellule de maintenir une teneur constante en NAD<sup>+</sup> nécessaire au catabolisme du cellobiose.



## **CHAPITRE 5. EFFET DE LA VITESSE DE CROISSANCE ET DE LA DISPONIBILITE EN CELLOBIOSE ET EN AMMONIUM SUR LA SPORULATION DE *C. CELLULOLYTICUM*.**

### **I. Introduction.**

La colonisation de la cellulose par *C. cellulolyticum* ferait intervenir les cellules-filles relarguées de la cellulose (Gelhaye *et al.*, 1992; Gelhaye, 1993; Gelhaye *et al.*, 1993a, b), comme cela a été proposé chez les bactéries cellulolytiques du rumen (Weimer, 1996). Ces bactéries, relarguées de la cellulose, se retrouveraient alors en compétition avec les autres bactéries, cellulolytiques ou non, pour l'utilisation des ressources carbonées de l'environnement. Elles seraient donc confrontées rapidement à une limitation nutritionnelle.

*C. cellulolyticum* est capable de se différencier en une forme de résistance, une endospore, ce qui pourrait lui conférer un avantage sélectif dans ce type de situation, d'autant plus qu'il a été montré que ces spores sont capables d'adhérer à la cellulose (Gehin *et al.*, 1996).

La sporulation chez les bactéries à Gram positif a fait l'objet d'études approfondies chez *Bacillus subtilis* (Errington, 1993; Grossman, 1995; Losick, 1986 pour revues), permettant l'établissement de modèles complexes de régulation. Bien que très peu d'informations soient disponibles à l'heure actuelle sur la sporulation chez les clostridia, le processus de sporulation pourrait être similaire à celui décrit chez *B. subtilis*. En effet, plusieurs gènes homologues à ceux de *Bacillus subtilis* (*spoOA* et gènes codant des facteurs sigma spécifiques de sporulation) ont été mis en évidence chez certains clostridia (Sauer *et al.*, 1995; Sauer *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995).

Cependant, les conditions déclenchant la sporulation chez les clostridia apparaissent différentes de celles rencontrées chez *Bacillus subtilis*. La sporulation n'est pas déclenchée par une carence nutritionnelle, mais par des facteurs entraînant une diminution de la vitesse de croissance (source de carbone plus difficilement métabolisable, diminution du pH ou accumulation de produits du métabolisme)(Sauer *et al.*, 1995). Par ailleurs, une répression catabolique s'exerce sur le processus de sporulation chez certains clostridia, notamment *C. thermosaccharolyticum* (Hsu and Ordal, 1969).

Une étude précédente, réalisée en batch, a révélé qu'un pourcentage significatif de sporulation (30 %) n'est observé que lorsque *C. cellulolyticum* est carencé en carbone en

phase exponentielle de croissance (Gehin *et al.*, 1995). Par ailleurs, un excès de cellobiose réprimerait la sporulation chez cette bactérie (Gehin *et al.*, 1995).

A la lumière de ces observations, nous avons entrepris de réaliser une étude des conditions de sporulation de *C. cellulolyticum*. Nous avons déterminé l'influence de la vitesse de croissance et de la disponibilité en cellobiose et ammonium sur la sporulation de cette bactérie lors de cultures en continu.

## **II. Résultats.**

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article intitulé: 'Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation.' (Article accepté pour publication dans le journal 'Applied Microbiology and Biotechnology').

S. Payot, E. Guedon, M. Desvaux, E. Gelhaye\* and E. Petitdemange

Laboratoire de Biochimie des bactéries Gram + , Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, B.P. 239,54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

## Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation

**Abstract**—With the aim of studying nutritional and physiological factors affecting sporulation of *Clostridium cellulolyticum*, steady-state continuous cultures were performed in both complex and synthetic media. Under cellobiose limitation, the probability that cells will sporulate appears to be directly related to the growth rate. In complex medium, the highest percentage of sporulation was 20% at 0.015 h<sup>-1</sup> whereas in synthetic medium it was 10% at 0.035 h<sup>-1</sup>. In both cases, when the dilution rate was either higher or lower the percentage of sporulation decreased between 2 and 4%. At low dilution rates, endospore formation is repressed under cellobiose sufficient concentrations, suggesting the presence of a catabolite repression process by cellobiose. Furthermore, the concentration of the ammonium was important in determining the percentage of sporulation, since ammonium limitation induced extensive sporulation at low growth rates even in presence of cellobiose excess. Furthermore, the sporulation process is not triggered when cells are cellobiose-exhausted both in complex and synthetic media. These data suggested that, in *C. cellulolyticum*, an exogenous supply of carbon source is required throughout the sporulation process. In our experimental conditions, no relationship between glycogen accumulation or glycogen mobilization and endospore formation was detected in *C. cellulolyticum*.

**Key words:** *Clostridium cellulolyticum*; sporulation; cellobiose; ammonium; glycogen.

\* Corresponding author: Tel.: +33 3 83 91 20 53; Fax.: +33 3 83 91 25 50



---

## Introduction

The mesophilic bacterium *Clostridium cellulolyticum*, isolated from a decayed grass (Petitdemange et al. 1984) is a true cellulolytic organism able to grow with cellulose as the sole carbon and energy source. The energetics of growth and the metabolism of this bacterium have been extensively studied (Giallo et al. 1983; Payot et al. 1998). Furthermore, the growth cycle of *C. cellulolyticum* in contact with cellulose has been described (Gelhaye et al. 1993). The cellulose colonisation most likely proceeds via daughter cells released from cellulose sites as postulated for ruminal cellulolytic bacteria (Gelhaye et al. 1992; Weimer 1996). In natural ecosystems, these released bacteria must compete directly with the microbial sugar fermenters. Indeed, these detached bacteria have most likely to cope with nutrient limitation until cells can attach to another cellulose site. In this context, the ability of clostridia to differentiate into highly resistant spores could be important in this kind of adhered life cycle.

Over the last decade, particular attention has been focused on endospore formation in *Bacillus subtilis*, which is recognized as a model system for analysing differentiation in prokaryotic organisms (Errington 1993; Haldenwang 1995; Piggot 1996). Based on morphological studies, sporulation in *Bacillus* spp and anaerobic genus *Clostridium* has long been suggested to employ similar mechanisms (Woods and Jones 1986). However, very little effort has been invested into elucidating the sporulation process in clostridia. Studies were essentially devoted to few strains of *Clostridium* spp. such as *C. acetobutylicum* and *C. perfringens* (Sauer et al. 1995; Shih and Labbe 1994) but very few data are available on the factors triggering the sporulation process in cellulolytic clostridia (Gehin and Petitdemange 1995).

The purpose of this research was to identify nutritional and physiological conditions required for sporulation of *Clostridium cellulolyticum*.

---

## Material and methods

### Bacterial strain.

*C. cellulolyticum* ATCC 35319, a mesophilic cellulolytic bacterium isolated from decayed grass (Petitdemange et al. 1984), was used.

## Experimental cultures.

The strain was grown anaerobically either in a complex medium (CM3) (Payot et al. 1998) or in a synthetic medium. Synthetic medium (SM) used in experiments was a modification of the CM3 medium in which yeast extract was replaced by oligoelement solution (1 ml) and vitamin solution (10 ml). Moreover, cysteine hydrochloride is replaced by  $\text{Na}_2\text{S}$  (0.5 g). In addition, the medium contained cellobiose and ammonium in variable amounts as specified in the result section.

The oligoelement solution contained ( $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.00;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.44;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.12;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.25;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 0.20;  $(\text{Mo})_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.00;  $\text{NiCl}_2$ , 0.04;  $\text{CoCl}_2$ , 0.02;  $\text{HBO}_3$ , 0.03;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 0.02;  $\text{HCl}$  10 M, 50.0 ml.

The composition of the vitamin solution was (in mg for 100 ml of distilled water): d-biotin, 10; para-aminobenzoic acid, 25; nicotinic acid, 15; riboflavin, 25 mg; pantothenic acid, 25 mg; thiamin, 25 and cyanocobalamin, 10. The vitamins in solution were sterilized by filtration with a 0.2  $\mu\text{m}$  filter.

The preparation of inoculum and anaerobic conditions were performed as described previously (Payot et al. 1998).

In complex medium or defined medium, similar maximal growth rate was obtained in batch cultures with cellobiose, e.g.  $0.15 \text{ h}^{-1}$  (corresponding to a generation time of 6.5 hours). This maximal growth rate decreases to  $0.10 \text{ h}^{-1}$  (corresponding to a generation time of 10 hours) using glucose as substrate.

## Fermentation modes.

Continuous cultures were carried out as described previously (Payot et al. 1998). Throughout all the experiments, the pH was kept constant at 7.2 by addition of 1 M NaOH in the fermentor,

## Analytical procedures.

Bacterial growth was measured spectrophotometrically at 600 nm and calibrated against cell dry weight measurement. Samples (30 ml) were centrifuged for 10 min at  $8,000 \times g$ , washed twice with 0.9% (wt/vol) NaCl and dried at  $65^\circ\text{C}$  to constant weight (48 h).

Cell-free supernatants ( $10,000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Cellobiose was determined colorimetrically using dinitrosalicylic reagent (Miller 1959). Ammonium was assayed by the method of Chaney and Marbach (Chaney and Marbach 1962).



Glycogen was assayed by the method of Matheron et al. (Matheron et al. 1998).

### Epifluorescence spores counting.

Epifluorescence counts were made by a standard acridine orange staining method for which 5  $\mu$ l of culture was deposited on a 0.28-cm<sup>2</sup> slide and counted, after staining with acridine orange (0.025% in 0.1 M sodium citrate buffer [pH 6.0]), with a Nikon epifluorescence microscope (model HB 10101 AF). At least two preparations were prepared for each sample to be counted. Cultures samples were diluted to yield two to six cells or spores per square. At least 400 cells (or spores) were counted to calculate the percentage of spores which was expressed as a percentage of the total cells counted by microscopy.

---

## Results

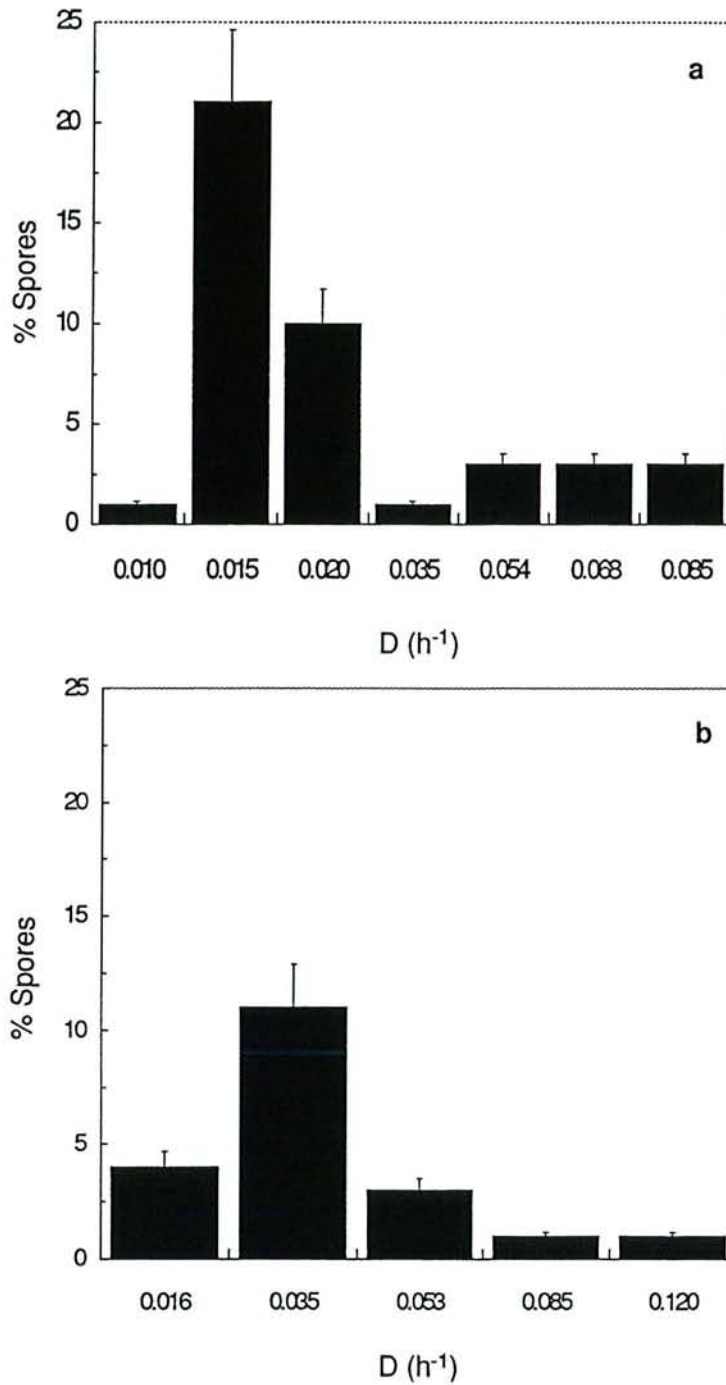
### Influence of dilution rate on *C. cellulolyticum* sporulation:

#### *In cellobiose-limited chemostat cultures:*

In complex medium, at a cellobiose concentration in the feed medium of 2.3 mM, and over a wide range of dilution rates (from 0.010 to 0.085 h<sup>-1</sup>), the residual cellobiose concentrations were low, below 0.1 mM (data not shown). These data are typical of a continuous culture carried out under carbon limitation. Indeed, cellobiose was the sole limiting compound since at fixed value of D, a linear increase in biomass occurred when the concentration of cellobiose in the feed medium was increased. Under these conditions, cultures of *C. cellulolyticum* were observed to sporulate in a narrow range of dilution rates. A maximal percentage of sporulation was found at  $\mu = 0.015$  h<sup>-1</sup> (20%). At  $\mu = 0.020$  h<sup>-1</sup>, this percentage decreased to 10%. When the dilution was either higher or lower, the percentage of sporulation remained between 2 and 4% (Fig. 1a).

In synthetic medium, steady-state continuous cultures were performed using a cellobiose concentration in the feed medium of 5.8 mM. At this concentration and over the tested range of dilution rates (from 0.016 to 0.120 h<sup>-1</sup>), the residual cellobiose concentrations were low, below 0.1 mM (data not shown). Under these conditions, the maximal percentage of sporulation was observed at a dilution rate of 0.035 h<sup>-1</sup> (10%) (Fig. 1b). The efficiency of sporulation decreased when the dilution rates were either higher or lower and remained below 4%. As observed in CM3 medium, the sporulation efficiency depended on the growth rate.





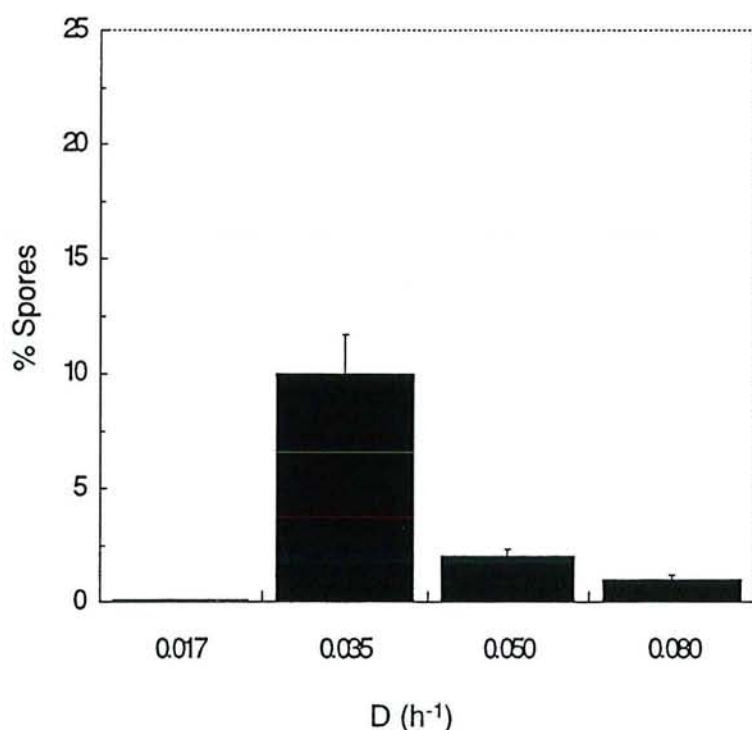
**Figure 1.** Effect of the dilution rate on the percentage of sporulation of *C. cellulolyticum*: a, in complex medium; b, in synthetic medium, under cellobiose limitation (input concentration, 2.3 mM and 5.8 mM respectively). Each percentage is the mean of  $\pm$  SD of at least 400 counted cells (or spores) from two separate cultures.

Furthermore, the maximal percentage of spores was detected at 0.015 h<sup>-1</sup> and 0.035 h<sup>-1</sup> in CM3 and SM medium respectively. At these D values, the specific rates of cellobiose

consumption were measured in both media and were found to be 0.196 and 0.890 mmol (g cells)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in CM3 and SM respectively.

*In ammonium-limited chemostat cultures:*

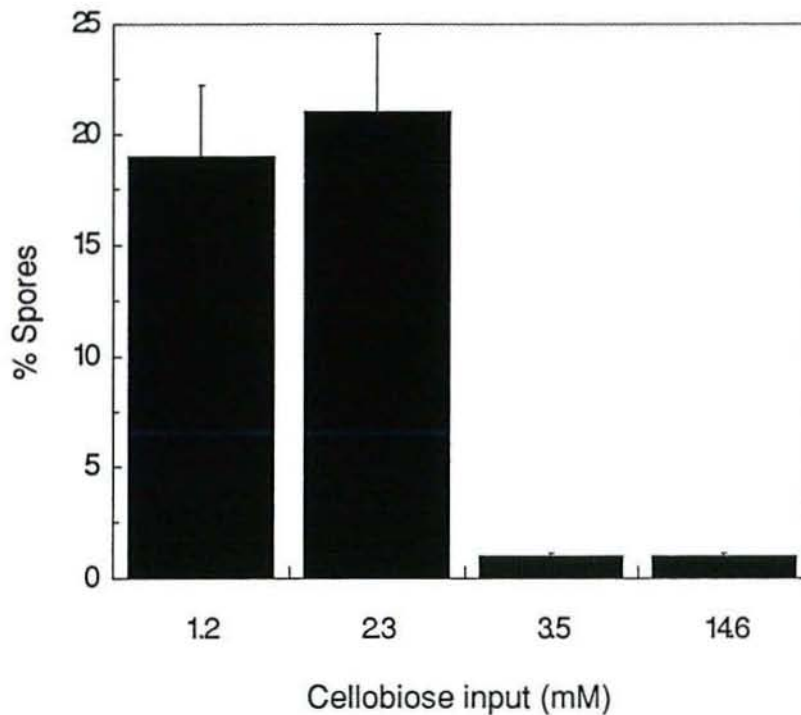
Continuous cultures were performed in SM medium at an ammonium concentration of 4.0 mM in the feed medium versus 15.1 mM in the previous experiments (Fig 2). In the range of dilution rates studied (from 0.017 to 0.080 h<sup>-1</sup>), residual ammonium was hardly detectable (below 0.1 mM). In addition, we have found that, in SM medium, below 8 mM ammonium in the feeding solution, the cell population increased proportionally with increasing ammonium concentration, indicating ammonium-limited continuous cultures. At the same time, the cellobiose concentration of 14.6 mM in the feed medium led to cellobiose-saturated cultures since residual cellobiose concentrations upper than 6.0 mM were measured. Under these conditions, as for cellobiose-limited cultures, the maximal yield of sporulation was detected at a dilution rate of 0.035 h<sup>-1</sup> (10% of detected spores). At lower or higher dilution rates, the sporulation efficiency decreased dramatically (to 0.05 % at 0.017 h<sup>-1</sup> and 2% at 0.080 h<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Effect of the dilution rate on the percentage of sporulation of *C. cellulolyticum* grown in synthetic medium under ammonium limitation (ammonium concentration input ; 4.0 mM). The cultures were performed under cellobiose saturation (cellobiose concentration input ; 14.6 mM). Each percentage is the mean of  $\pm$  SD of at least 400 counted cells (or spores) from two separate cultures.

### Influence of cellobiose concentration input on *C. cellulolyticum* sporulation:

Continuous cultures were performed in complex medium using the dilution rate of  $0.015 \text{ h}^{-1}$  (leading to maximal sporulation percentage) with a cellobiose concentration in the feed medium that varied from 1.2 to 14.6 mM (Fig. 3). The maximal sporulation efficiency was observed at 1.2 and 2.3 mM when the cultures were carried out under cellobiose limitation (residual cellobiose concentrations were below 0.1 mM). When the cellobiose input increased (to 3.5 and 14.6 mM), cultures became cellobiose-saturated and the residual cellobiose concentrations increased (above 3 mM). Under these conditions, the sporulation efficiency decreased (to about 1% spores).



**Figure 3.** Percentage of sporulation of *C. cellulolyticum* grown on complex medium (CM3) at  $D= 0.015 \text{ h}^{-1}$  as a function of cellobiose concentration input. Each percentage is the mean of  $\pm$  SD of at least 400 counted cells (or spores) from two separate cultures.

In synthetic medium, cellobiose-saturated continuous cultures were performed at a range of dilution rates from  $0.016$  to  $0.120 \text{ h}^{-1}$ . Indeed, the biomass formation was inhibited by product accumulation. Under these experimental conditions, the sporulation efficiency was



greatly reduced (< 2% of spores) compared to cellobiose-limited cultures performed at the same dilution rate (reaching 10% of detected spores at 0.035 h<sup>-1</sup>).

#### Effect of cellobiose or ammonium exhaustion on *C. cellulolyticum* sporulation:

For cellobiose- and ammonium-limited cultures performed in complex and synthetic media, the feeding medium flow was stopped once steady-state was obtained. Hence, the cultures became cellobiose- or ammonium-starved and the number of spores was followed for 160 hours. Under these conditions, we did not find any increase of spore percentage whatever the dilution rate considered, in complex and synthetic media.

#### Influence of glycogen production and mobilization on *C. cellulolyticum* sporulation:

The accumulation of glycogen was measured at steady-state continuous cultures both in CM3 and SM. In SM, at  $\mu = 0.035 \text{ h}^{-1}$  glycogen was synthesized at about 50 mg (g cells)<sup>-1</sup> under either ammonia or cellobiose limitation, whereas in complex medium no glycogen production was observed at  $\mu = 0.015 \text{ h}^{-1}$  under cellobiose limitation although these conditions allowed the higher sporulation efficiencies observed. Glycogen production was obtained in steady-state continuous cultures when cellobiose and ammonium were available in excess, either in CM3 and SM. At all dilution rates tested, sporulation percentages were low and maximal values of glycogen as high as 90 and 52 mg (g cells)<sup>-1</sup> were found in complex and synthetic medium respectively. The number of spores was followed for 160 hours for cultures exhibiting maximal glycogen production. Despite glycogen utilisation once cellobiose was exhausted, no increase of the sporulation percentage was observed under our experimental conditions (data not shown).

---

## Discussion

Despite their considerable biotechnological potential and clinical importance (Bahl and Dürre 1993; Woods 1995), very little effort has been invested in elucidating the sporulation process in clostridia (Sauer et al. 1995) and particularly in cellulolytic clostridia (Gehin et al. 1995, Gehin et al. 1996). The purpose of this study was to investigate nutritional and physiological factors required for *C. cellulolyticum* sporulation. In chemostat cultures of *C. cellulolyticum*, the probability that cells will sporulate appears to be directly related to the growth rate and extensive sporulation only occurs at low dilution rates (Fig.1 and Fig.2).

However, at the lowest studied dilution rates, sporulation remained very low. Furthermore, we showed in this study that spore formation in *C. cellulolyticum* is not triggered when cells are starved of cellobiose or ammonium. These results are consistent with previous reports showing that in *Clostridium spp* an exogenous supply of carbon is required throughout the sporulation process, and thus, nutrient starvation resulting in a decreased growth rate does not generally lead to the production of spores in *Clostridium spp* (Sauer et al. 1995; Woods and Jones 1986). In addition to the requirements for cellobiose during spore formation in *C. cellulolyticum*, the presence of ammonium seems to be necessary as postulated for different *Clostridium* species (Woods and Jones 1986). In addition to this requirement, the flow of ammonium was also important in determining the frequency of sporulation. Indeed, even in the presence of cellobiose excess, ammonium limitation induced extensive sporulation at low growth rate in *C. cellulolyticum*. In contrast, in *C. acetobutylicum*, glucose or ammonium limitation did not result in the induction of sporulation and both glucose and ammonia were required for its initiation and development (Long et al. 1984a,b). The connection between nitrogen and carbon utilization in the induction of sporulation remained largely undetermined in *Clostridium* species and further research will be necessary to understand the link between these nutritional factors triggering sporulation in *Clostridium* species (Woods and Jones 1986). Furthermore, this study shows that *C. cellulolyticum* seems to sporulate better when grown in the complex medium containing yeast extract than in the synthetic medium. These data are consistent with previous reports (Woods and Jones 1986); indeed, complex nutritional requirements for sporulation have been reported in several *Clostridium* species, including organic nitrogen sources and mineral salts.

A clear distinction can be made between the species of *Clostridium* in which catabolite repression by a readily metabolizable energy source occurs, for instance *C. perfringens* (Shih and Labbé 1994) or *C. thermosaccharolyticum* (Hsu and Ordal 1969) and those where such catabolite repression is absent as in *C. butyricum* and *C. acetobutylicum* (Woods and Jones 1986). The data reported here show clearly that, although cellobiose could serve as carbon source for sporulation when a limited amount was provided continuously, the sporulation in *C. cellulolyticum* was repressed in the presence of large excess of this substrate. Indeed, at low dilution rate, the sporulation efficiency decreased when the cellobiose input increased (Fig. 3). The increase of cellobiose input led to cellobiose-saturated cultures since biomass production became limited by another metabolic factor. Indeed, whatever the medium used,



the maximal biomass production obtained under cellobiose-limited conditions reached only 0.37 g l<sup>-1</sup> (data not shown).

In some *Clostridium* species, glycogen accumulation normally occurs at the end of exponential growth before the onset of sporulation and is usually degraded during spore formation. This suggests that the reserve polyglucan can serve as a source of carbon for the formation of spores and their maturation (Bergère et al. 1975; Reysenbach et al. 1986; Robson et al. 1974; Strasidine 1972). However, in this study, no relation was found between glycogen accumulation or glycogen mobilization and spore formation in *C. cellulolyticum*.

The initiation of sporulation is a very complex phenomenon requiring several physiological conditions. In *Bacillus subtilis*, which is recognized as a model system for analysing differentiation in prokaryotic organisms (Errington 1993; Haldenwang 1995; Piggot 1996), a variety of different physiological conditions (nutritional signals, population density, cell cycle...) generate signals, that are sensed and transduced to influence the regulatory proteins controlling the pathway leading to endospore formation. This work was initiated to characterize the physiological conditions leading to spore formation in *C. cellulolyticum* using chemostat cultures and a defined medium, a method which allowed to study the influence of well-defined factors on the endospore formation. *C. cellulolyticum* appears to sporulate efficiently at low growth rate, in the presence of an exogenous source of carbon and in the presence of ammonium, and appears to be inhibited by the mechanism of catabolite repression. These first data about the sporulation requirements of this cellulolytic *Clostridium* will permit further experiments in order to complete our understanding of the endospore formation in *C. cellulolyticum*.

### Acknowledgments

This research was supported by grants from the commission of the European communities (Fair n° CT95-0191) and from the Programme Agrice (n° 97.01.041).

---

### References

Bahl H, Dürre P (1993) *Clostridia*. In: Sahm H (ed) Biotechnology, vol. 1, 2nd ed, VCH, Weinheim, pp 285-323.



- Bergère JL, Rousseau M, Mercier C (1975) Polyoside intracellulaire impliqué dans la sporulation de *Clostridium butyricum*. I Cytologie, production et analyse enzymatique préliminaire. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 126: 295-314.
- Chaney AL, Marbach EP (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin Chem 8: 130-132.
- Errington J (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol Rev 57: 1-33.
- Gehin A, Gelhaye E, Raval G, Petitdemange H (1995) *Clostridium cellulolyticum* viability and sporulation under cellobiose starvation conditions. Appl Environ Microbiol 61: 868-871.
- Gehin A, Petitdemange H (1995) The effects of tunicamycin on secretion, adhesion and activities of the cellulase complex of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Res Microbiol 146: 251-262.
- Gehin A, Gelhaye E, Petitdemange H (1996) Adhesion of *Clostridium cellulolyticum* spores to filter paper. Appl Microbiol 80: 187-190.
- Gelhaye E, Claude B, Cailliez C, Burle C, Petitdemange H (1992) Multilayer adhesion to filter paper of two mesophilic cellulolytic clostridia. Curr Microbiol 25: 307-311.
- Gelhaye E, Gehin A, Petitdemange H (1993) Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Appl Environ Microbiol 59: 3154-3156.
- Giallo J, Gaudin C, Belaich JP, Petitdemange E, Caillet-Mangin F (1983) Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. Appl Environ Microbiol 45: 843-849.
- Haldenwang WG (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol Rev 59: 1-30.
- Hsu EJ, Ordal ZJ (1969) Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restricted growth. J Bacteriol 97: 1511-1512.
- Long S, Jones DT, Woods DR (1984a) Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. Appl Microbiol Biotechnol 20: 256-261.
- Long S, Jones DT, Woods DR (1984b) The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. Biotechnol Lett 6: 529-534.
- Matheron C, Delort AM, Gaudet G, Forano E, Liptaj T (1998) <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter*. Appl Environ Microbiol 64: 74-81.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 31: 426-428.

Payot S, Guedon E, Cailliez C, Gelhaye E, Petitdemange H (1998) Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* 144: 375-384.

Petitdemange E, Caillet F, Giallo J, Gaudin C (1984) *Clostridium cellulolyticum* sp. nov. a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int J Syst Bacteriol* 34: 155-159.

Piggot PJ (1996) Spore development in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Genet Dev* 5: 531-537.

Reysenbach AL, Ravenscroft N, Long S, Jones DT, Woods DR (1986) Characterization, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 52: 185-190.

Sauer U, Santangelo JD, Treuner A, Buchholz M, Dürre P (1995) Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS Microbiol Rev* 17: 331-340.

Shih NJ, Labbé RG (1994) Effect of glucose on sporulation and extracellular amylase production by *Clostridium perfringens* Type A in a defined medium. *Curr Microbiol* 29: 163-169.

Strasidine GA (1972) The role of intracellular glucan in endogeneous fermentation and spore maturation in *Clostridium botulinum* type E. *Can J Microbiol* 18: 211-217.

Weimer PJ (1996) Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster ? *J Dairy Sci* 79: 1496-1502.

Woods DR, Jones DT (1986) Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Adv Microb Physiol* 28: 1-64.

Woods DR (1995) The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends Biotechnol* 13: 259-274.





### III. Conclusion.

Jusqu'à maintenant, très peu d'études portant sur la sporulation chez les clostridia ont été réalisées (Sauer *et al.*, 1995) et celles-ci concernaient essentiellement *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium perfringens* (Sauer *et al.*, 1995; Shih and Labbé, 1994). Très peu d'informations sont donc disponibles sur la sporulation chez les bactéries cellulolytiques.

Chez *C. cellulolyticum*, un pourcentage significatif de sporulation (30 %) n'est observé lors de cultures en batch que lorsque cette bactérie est carencée en carbone en phase exponentielle de croissance (Gehin *et al.*, 1995). Par ailleurs, un excès de cellobiose réprimerait la sporulation chez cette bactérie (Gehin *et al.*, 1995).

Les résultats présentés ici démontrent que, lors de cultures en continu de *C. cellulolyticum*, le pourcentage de sporulation est dépendant de la vitesse de croissance de la bactérie. En effet, un pourcentage significatif de sporulation n'est observé que pour de faibles taux de dilution, correspondant à des vitesses de croissance faibles.

Par ailleurs, nous avons montré qu'une carence en cellobiose ou en ammonium n'induisait pas le processus de sporulation chez *C. cellulolyticum*. Ces résultats montrent qu'une source de carbone et d'ammonium est nécessaire au déroulement de la sporulation chez cette bactérie, comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Sauer *et al.*, 1995; Woods and Jones, 1986).

Cependant, la sporulation de *C. cellulolyticum* est réprimée en présence d'un excès de cellobiose, puisque l'augmentation de l'apport en cellobiose, à une vitesse de croissance faible, diminue le pourcentage de sporulation. *C. cellulolyticum* présente donc un comportement similaire à *C. perfringens* (Shih and Labbé, 1994) ou *C. thermosaccharolyticum* (Hsu and Ordal, 1969), par opposition à *C. butyricum* ou *C. acetobutylicum*, bactéries chez lesquelles la sporulation n'est pas soumise à une répression catabolique (Woods and Jones, 1986).

Le flux d'ammonium est un facteur important également puisque même en présence d'un excès de cellobiose, une limitation en ammonium, réalisée lorsque la vitesse de croissance est faible, permet d'induire la sporulation de *C. cellulolyticum*. A l'opposé, chez *C. acetobutylicum*, une limitation en glucose ou en ammonium n'induit pas la sporulation (Long *et al.*, 1984a, b).

Cette étude montre également qu'un pourcentage de sporulation plus important est obtenu lors de cultures sur milieu complexe par rapport à celles conduites sur milieu



synthétique. Cela indique des exigences nutritionnelles complexes pour le processus de sporulation comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Woods and Jones, 1986).

Par ailleurs, chez certains clostridia, une accumulation de glycogène intervient à la fin de la phase exponentielle avant le déclenchement de la sporulation et ce composé est dégradé par la suite lors du déclenchement de la sporulation. Cela suggère que ce polyglucane de réserve pourrait servir de source d'énergie pour la formation des spores et leur maturation (Bergère *et al.*, 1975; Reysenbach *et al.*, 1986; Robson *et al.*, 1974; Strasdine, 1972). Cependant, chez *C. cellulolyticum*, nous n'avons obtenu aucune corrélation entre accumulation ou utilisation de glycogène et formation de spores.

L'initiation de la sporulation est un phénomène très complexe qui nécessite la réunion de multiples paramètres physiologiques. Chez *B. subtilis*, une variété de conditions physiologiques (signaux nutritionnels, densité cellulaire, période du cycle cellulaire,...) génère des signaux, qui sont captés et traduits à l'intérieur de la cellule et influencent des protéines régulatrices de la sporulation (Errington, 1993; Haldenwang, 1995; Piggot, 1996). Lors de cette étude, nous avons mis en évidence que *C. cellulolyticum* ne sporule que dans une gamme très restreinte de vitesses de croissance et d'apports en cellobiose. De plus, des paramètres tels que concentration en ammonium ou composition du milieu modifient le pourcentage de sporulation. Il apparaît donc vraisemblable qu'une régulation aussi complexe que celle décrite chez *B. subtilis* a lieu chez cette bactérie.

## **CHAPITRE 6: CLONAGE, SEQUENCAGE ET CARACTERISATION DE LA REGION PROMOTRICE DU GENE DE LA RUBREDOXINE CHEZ *C. CELLULOLYTICUM* ET DETERMINATION DE LA TENEUR DES CELLULES EN RUBREDOXINE DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE STRESS.**

### **I. Introduction.**

La rubrédoxine est une protéine fer-soufre ne contenant pas de soufre inorganique et caractérisée par la présence d'un atome de fer lié, dans un arrangement tétraédrique, à 4 résidus cystéine de la chaîne polypeptidique.

Compte-tenu de l'ubiquité de cette protéine fer-soufre chez les bactéries anaérobies, nous nous sommes interrogés sur l'existence de cette protéine chez les bactéries cellulolytiques et en particulier chez *C. cellulolyticum*.

En utilisant des amorces oligonucléotidiques basées sur la séquence du gène de *C. pasteurianum* (Mathieu *et al.*, 1992) et localisées dans les régions conservées des rubrédoxines, nous avons mis en évidence l'existence d'un gène codant la rubrédoxine chez cette bactérie.

Dans l'optique de déterminer le rôle de cette protéine chez *C. cellulolyticum*, nous avons donc décidé de cloner, de séquencer ce gène et d'analyser le transcrit ARN correspondant.

Différents rôles, notamment dans la protection face à un stress thermique ou oxydatif, ont été proposés pour la rubrédoxine chez les bactéries anaérobies. Nous avons donc également déterminé le profil d'expression de la rubrédoxine dans différentes conditions susceptibles d'induire cette protéine (pH acide, stress thermique et oxydatif notamment). Nous avons, au préalable, optimisé ces conditions de stress chez *C. cellulolyticum*, c'est-à-dire déterminé les conditions suffisantes pour induire des protéines de stress potentielles sans pour autant causer une mortalité cellulaire trop importante.

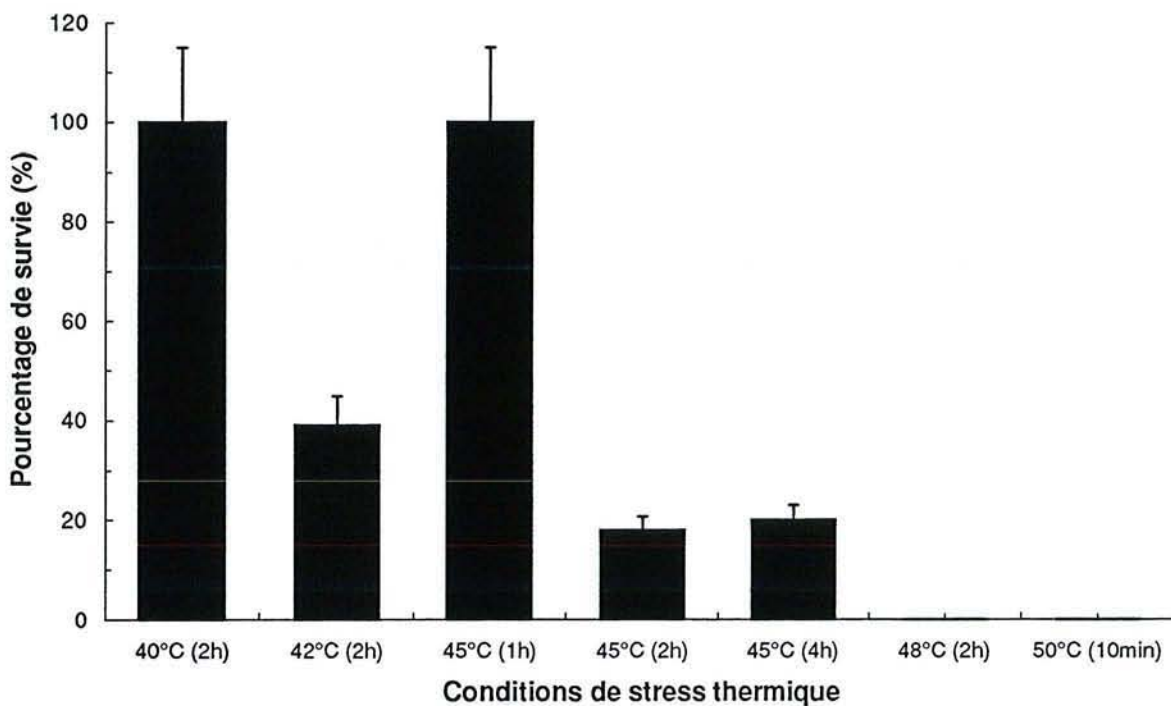
## II. Résultats.

### II.1. Mise au point des conditions de stress chez *C. cellulolyticum*.

#### ✓ Stress thermique:

Des cultures en phase exponentielle de croissance ont été soumises à différentes températures pendant un temps variable: 1 h à 40 °C; 2 h à 42 °C; 1, 2 ou 4 h à 45 °C; 2 à 48 °C ou 10 min à 50 °C (Figure 27).

L'effet de ces stress sur la croissance de *C. cellulolyticum* a été déterminé en mesurant la perte de viabilité cellulaire consécutive aux traitements réalisés. Pour cela, différentes dilutions des cultures ont été étalées sur boîtes de pétri contenant du milieu synthétique et de l'agar puis incubées en anaérobiose ('Anaerocult', Merck). La viabilité cellulaire est estimée par comptage des Colonies Formant Unités (C.F.U) obtenues sur ces boîtes.



**Figure 27** : Résistance de *C. cellulolyticum* à différents stress thermiques.

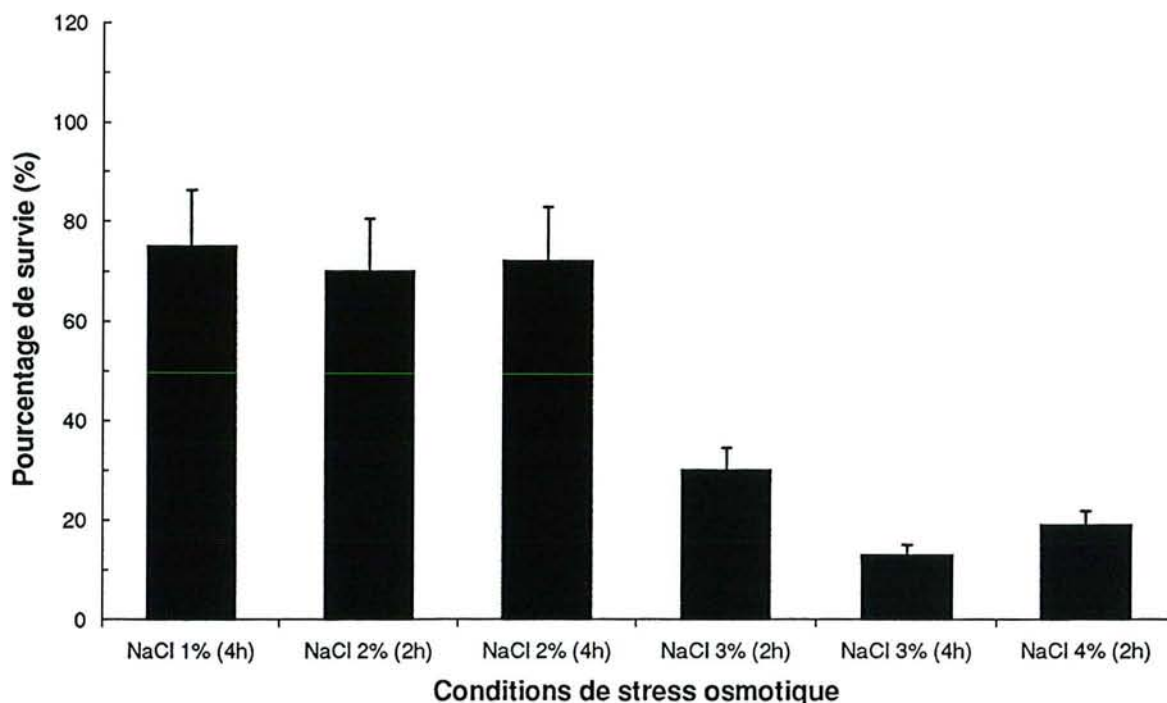
Une perte de viabilité est observée lorsque les cellules sont incubées 2 h à 42 °C (39 % de cellules viables) ou 2 à 4 h à 45 °C (18 et 20 % de survie respectivement). Une



incubation de *C. cellulolyticum* à une température supérieure (48 ou 50 °C) est fatale à la bactérie.

#### ✓ Stress osmotique:

L'effet de différents traitements (ajout de 1, 2, 3 ou 4 % de NaCl pendant 2 et/ou 4 h) a été étudié (Figure 28):

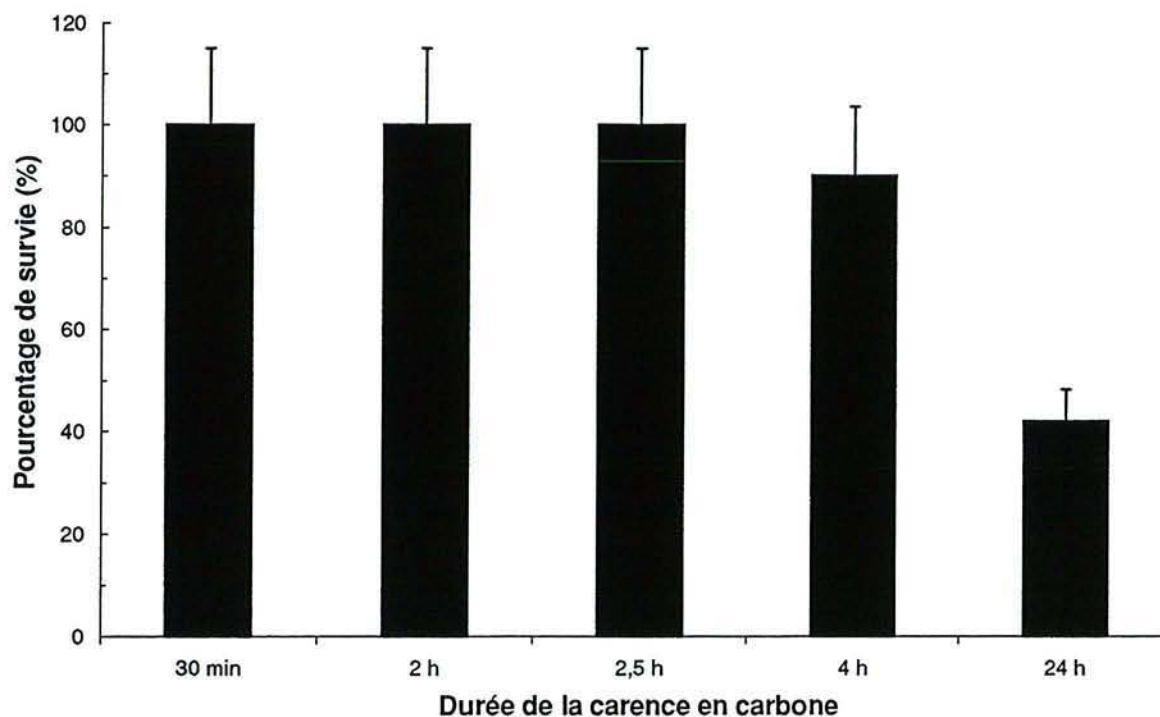


**Figure 28:** Résistance de *C. cellulolyticum* à différents stress osmotiques.

Une perte importante de viabilité de *C. cellulolyticum* est observée pour des concentrations en NaCl ajoutées supérieures à 3 % (moins de 30 % de survie des cellules).

#### ✓ Stress carboné:

Nous avons par ailleurs déterminé la résistance de *C. cellulolyticum* à différentes conditions de carence en carbone: carence brutale d'une durée de 30 min; 2 h; 2,5 h; 4 h ou 24 h. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure 29).

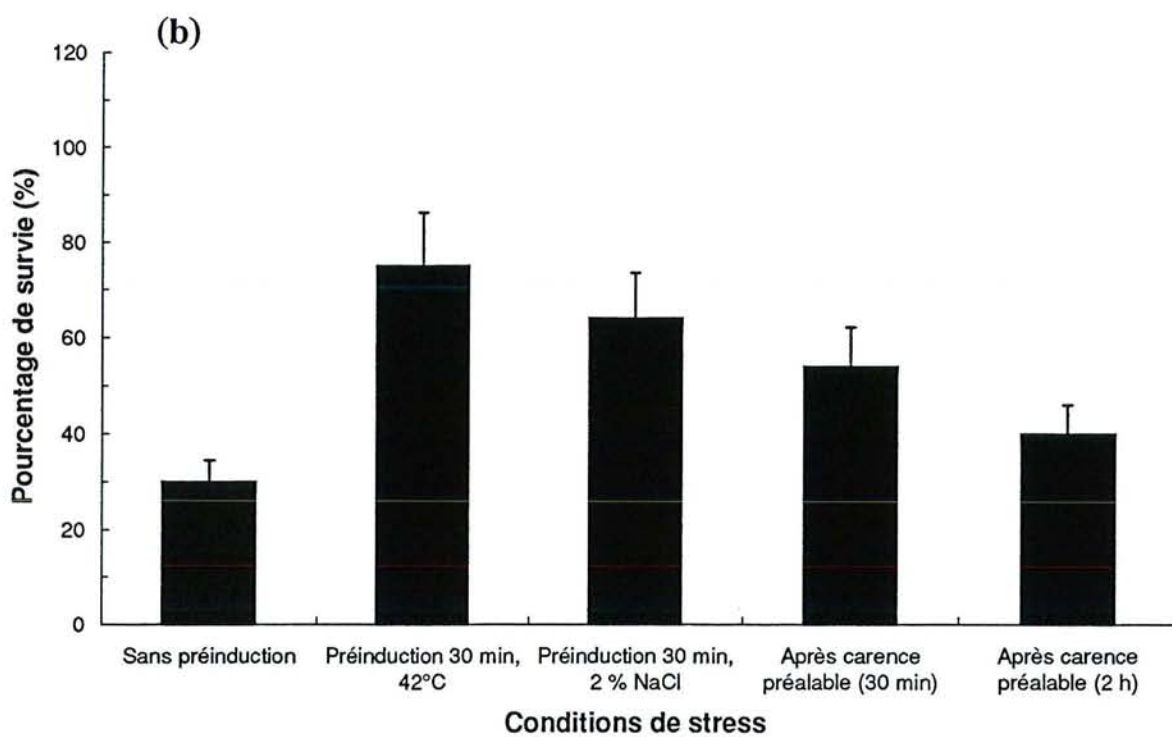
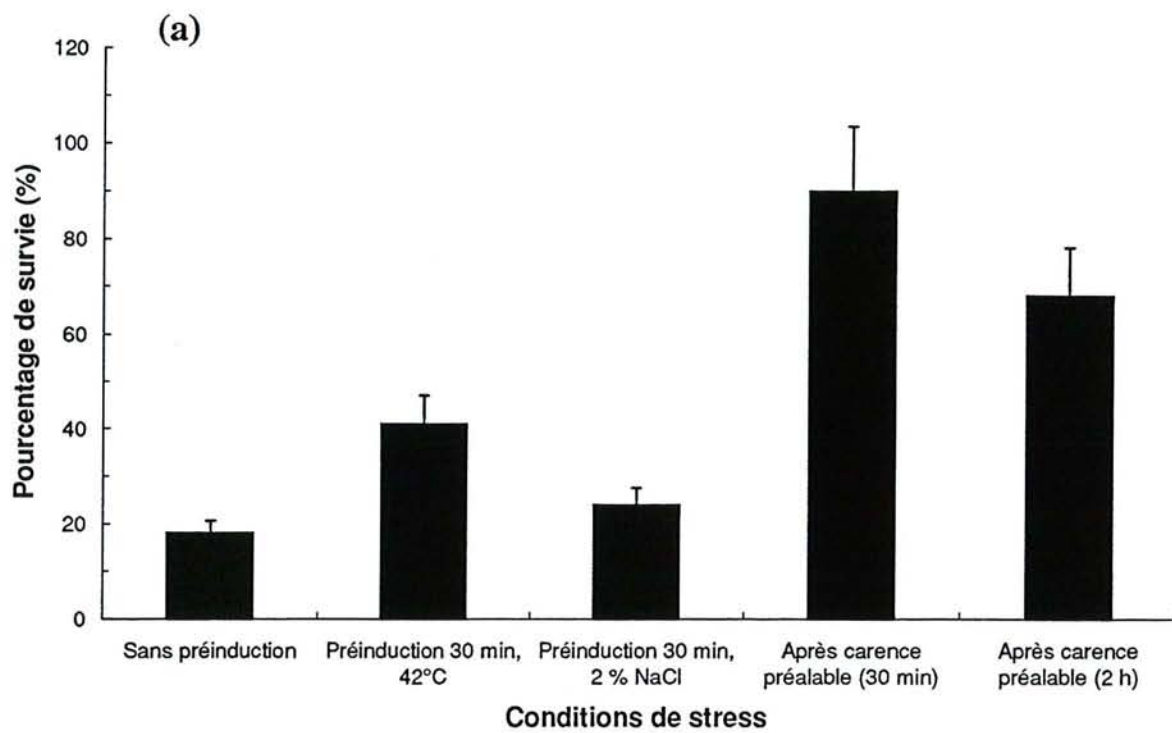


**Figure 29:** Effet d'une carence brutale en carbone sur la viabilité cellulaire de *C. cellulolyticum*.

La viabilité cellulaire se maintient à un taux maximal lorsque la carence en carbone n'excède pas 2,5 h. Après 4 heures de carence, 90 % des cellules sont viables. Ce pourcentage est de 42 % après 24 heures.

✓ **Effet d'un stress modéré préalable (thermique, osmotique ou carence brutale en carbone) sur la résistance de *C. cellulolyticum* à un stress plus important:**

Nous avons soumis les cellules à un traitement préalable constituant un stress modéré (30 min à 42 °C, NaCl 2 % pendant 30 min ou carence brutale de 30 min ou 2 h) puis testé la résistance de ces cellules à des stress plus importants: 2 h à 45 °C, 3 % de NaCl pendant 2 h (stress qui provoquent une perte de viabilité de 70 % environ lorsqu'aucun traitement préalable n'est effectué). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante (Figure 30):



**Figure 30:** Effet d'un stress modéré sur la résistance de *C. cellulolyticum* à un stress (a) thermique (45 °C, 30 min) ou (b) osmotique (3 % NaCl, 30 min) plus important.



Les cellules ayant subi préalablement un traitement de 30 min à 42 °C ou une carence brutale de 30 min ou 2 h résistent mieux à un stress thermique plus important (Figure 30a). En effet, dans ces conditions, la viabilité cellulaire atteint respectivement 41 % et 90 % contre 18 % pour le témoin n'ayant pas subi de pré-traitement. Une pré-induction avec 2 % de NaCl confère une protection plus limitée.

De même, si l'on fait subir aux cellules un stress modéré avant de les soumettre à un stress osmotique important (3 % de NaCl pendant 2 h), on obtient une meilleure résistance de *C. cellulolyticum* face à ce stress (Figure 30b). Ainsi, une pré-incubation des cellules à 42 °C, à 2 % de NaCl ou à une carence en carbone pendant 30 min permet d'augmenter la viabilité cellulaire mesurée après ce choc osmotique (respectivement 75 %, 64 % and 54 % de résistance contre 30 % pour le témoin). Une pré-carence de 2 h confère quant à elle une protection plus modérée (viabilité de 40 %). Par ailleurs, dans tous les cas étudiés, aucune sporulation significative des cultures n'a été obtenue.

## **II.2. Caractérisation du gène de la rubrédoxine chez *C. cellulolyticum* et détermination de la teneur en rubrédoxine dans différentes conditions de stress.**

Les résultats précédents nous ont permis d'identifier les conditions de température, de salinité et de carence susceptibles d'induire des protéines de stress chez *C. cellulolyticum*.

Nous avons, par ailleurs, choisi d'incuber les cultures sous atmosphère d'oxygène et de monoxyde de carbone pendant 30 min et testé différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (60, 100, 300, 1000 et 5000 µM) pour ne retenir finalement que la concentration de 100 µM (conditions suffisantes pour diminuer la vitesse de croissance sans l'annuler totalement). Le stress acide est réalisé à la valeur de pH final d'une culture où ce dernier n'est pas régulé (pH 5). Ces conditions ont été exploitées pour examiner l'hypothèse de l'implication de la rubrédoxine dans la réponse au stress chez *C. cellulolyticum*.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication intitulée: 'Cloning, sequencing and promoter characterisation of the rubredoxin gene of *Clostridium cellulolyticum* and examination of the rubredoxin cell content in different stress conditions' (article soumis pour publication dans le journal 'Research in Microbiology').

**Cloning, sequencing and promoter characterisation of the rubredoxin gene of  
*Clostridium cellulolyticum* and examination of the rubredoxin cell content in different  
stress conditions.**

Sophie Payot, Philippe Gérard, Catherine Cailliez-Grimal and Henri Petitdemange\*.

*Laboratoire de Biochimie des Bactéries Gram +,  
Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex France*

---

**Abstract—** The gene encoding the rubredoxin (Rd) of *Clostridium cellulolyticum* has been cloned and sequenced using PCR and inverse PCR with oligonucleotide primers designed from the gene sequence of *Clostridium pasteurianum*. No open reading frame was found in the upstream and downstream sequenced regions. In addition, promoter-like sequences and a transcription termination signal have been found near the sequence of the rubredoxin gene, which may therefore constitute an independent transcriptional unit. The deduced amino-acid sequence gives a 52 amino-acid protein, which contains all the rubredoxin conserved residues, including the four cysteine ligands of the iron atom. We examined the rubredoxin level of *C. cellulolyticum* in different stress conditions (e.g. heat-shock, oxidative stress, salt stress, under CO atmosphere, at pH 5 or carbon starvation), which could constitute rubredoxin-inducing conditions according to rubredoxin-role proposals in other bacteria. We did not find any induction whatever the condition tested, ruling out these proposed functions.

**Rubredoxin / clostridium / promoter / stress**

---

**Résumé—** Le gène codant la rubrédoxine de *Clostridium cellulolyticum* a été cloné et séquencé en utilisant les techniques de PCR et PCR inverse avec des amorces oligonucléotidiques obtenues à partir de la séquence du gène de *Clostridium pasteurianum*. Aucune phase ouverte de lecture n'apparaît dans les régions amont et aval séquencées. Par ailleurs, des séquences promotrices potentielles et un signal de terminaison de la transcription ont été mis en évidence à proximité du gène de la rubrédoxine. Ce gène pourrait donc constituer une unité transcriptionnelle indépendante. La séquence en acides aminés déduite de la séquence du gène révèle une protéine de 52 acides aminés présentant tous les résidus conservés chez les autres rubrédoxines, dont les quatre cystéines, ligands de l'atome de fer. Nous avons étudié la teneur en rubrédoxine chez *Clostridium cellulolyticum* dans différentes conditions de stress (choc thermique, stress oxydatif, stress salin, sous atmosphère de CO, à pH 5 et en carence de carbone), conditions susceptibles d'induire la rubrédoxine, compte-tenu des différents rôles proposés pour la rubrédoxine chez d'autres bactéries. Aucune induction n'a été mise en évidence, ce qui écarterait ces hypothèses concernant le rôle de la rubrédoxine chez *C. cellulolyticum*.

---

\* Corresponding author: Tel.: +33 3 83 91 20 53; Fax.: +33 3 83 91 25 50; E-mail: hpetitde@lcb.u-nancy.fr



---

## Abbreviations

**AA:** Amino-Acid  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**DEAE:** Diethyl-amino-ethyl  
**dNTP:** Deoxiribonucleoside triphosphate  
**FNR:** Fumarate Nitrate Reduction Protein  
**HSP:** Heat-Shock Protein  
**ORF:** Open reading frame  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**Rd:** rubredoxin  
***rub*:** rubredoxin gene  
**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

---

## 1. Introduction

Rubredoxin (Rd) is a small (ca. 6 kDa) iron-sulfur protein of bacterial origin, in which the iron atom is ligated to 4 cysteinyl side chains (20). So far it has been isolated from a variety of anaerobic bacteria including clostridia (10; 19; 34; 39), sulfate-reducing bacteria (3, 4, 41) and in the aerobic bacteria *Pseudomonas oleovorans* (28) and *Acinetobacter calcoaceticus* (9).

Its physiological function(s) in anaerobes remained elusive and particularly so in the genus *Clostridium*. It could participate in CO oxidation of *Clostridium thermoaceticum* and *Acetobacterium woodi* (33), in the NAD(P)H-nitrate reductase system of *Clostridium perfringens* (40), in lactate metabolism of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (41) and in reduction of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (24). Recently, its involvement in protection against oxygen of *Desulfovibrio gigas* in conjunction with a NADH-Rd-oxidoreductase and a Rd-oxygen-oxidoreductase, has also been demonstrated (6, 7, 11, 43).

Many iron-sulfur proteins are destabilized by exposure to oxidants and this sensitivity enables some of them to serve as 'oxygen sensor' like the transcription factor FNR of *E. coli* (36). In addition, some iron-sulfur proteins could protect cells from oxidative stress. Indeed, Pianzola *et al.* (32) proposed that desulfoferrodoxin could confer protection against oxidative stress by reducing oxidized, inactivated [4Fe-4S] clusters, thereby reversing loss of enzyme activity and preventing release of iron. Another iron-sulfur protein, rubrerythrin, which exhibits a rubredoxin-like FeS<sub>4</sub> site, may protect cells against oxidative stress by both scavenging iron from and donating iron to oxidatively damaged [4Fe-4S] proteins (21). The gene of rubrerythrin is co-transcribed with the rubredoxin gene of *D. vulgaris* leading to the proposal that rubredoxin could be a redox partner to rubrerythrin (21).



Furthermore, in *Clostridium acetobutylicum*, rubredoxin was found to increase when pH decreased (22) and another protein, HSP 21, showing high similarity to rubredoxin of anaerobic bacteria, was found to be induced during heat-shock. It could be a regulator of the heat-shock response in this bacterium (2). Hence, several roles have already been proposed for rubredoxin in different bacteria, in particular in bacterial stress response (oxidative or heat-shock).

Here, we reported the cloning, sequencing and promoter characterization of the rubredoxin (*rub*) gene of a mesophilic cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulolyticum*. Furthermore, taking into account the different proposals for rubredoxin role in other bacteria, we examined the variations of Rd level in different stress conditions (heat-shock, oxidative stress, acid pH, salt stress, carbon starvation). In addition, we have shown previously that *C. cellulolyticum* undergoes early growth inhibition on complex medium, due to NADH reoxidation default (26). CO gasing, by inhibiting hydrogenase, could be used to mimic this phenomenon (27). Since rubredoxin is likely to serve as an electron carrier, we also checked for a potential role of this protein in this particular stress condition.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacteria, plasmids and growth conditions.

*C. cellulolyticum* ATCC 35319 (31) was cultivated anaerobically using chemically defined medium (14). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was used to propagate recombinant derivatives of plasmids pUC 18.

### 2.2. DNA and RNA isolation.

Chromosomal DNA and total RNA were isolated using the method described by Graves *et al.* (12) and Qiagen Midi Kit (Qiagen) respectively. Plasmid DNA was extracted by the alkaline lysis method (37).

### 2.3. Cloning and sequencing of the gene.

PCR amplifications were performed using two primers (PastE, 5'-TGAAGAATTCTACATGTACAGTATGTGG-3' and PastB, 5'-GATCGGATCCTACTCCACACAAAGGACATACCC-3') designed from the sequence of the *rub* gene of *Clostridium pasteurianum* (nucleotides 2-29 and 110-142, with the introduction of an *Eco*RI site and *Bam*HI site, respectively) (23).

*C. cellulolyticum* genomic DNA was digested to completion with restriction enzymes, separated by agarose gel electrophoresis, transferred to positively-charged membrane (Pharmacia) as described by Southern (42) before incubation with the digoxigenin-labelled PCR product (DNA labeling and detection kit, Boehringer-Mannheim). Hybridisation and detection techniques were performed according to the manufacturer's instructions.

For inverse PCR (25), *VspI*-digested genomic DNA (10 µg) was size-fractionated on a 1.5 % agarose gel. DNA fragments in the size range of 450 to 750 bp were excised from the gel and purified using GenElute Agarose spin columns (Supelco). After dilution of the fragment to favour intramolecular ligation, the ligation was performed overnight at 16 °C using 0.1 unit of T4 DNA ligase (Eurogentec) according to the manufacturer's instructions. After ethanol precipitation, the pellet was resuspended in 10 µl Tris-EDTA buffer (pH 8). PCR amplifications were performed with 3 µl of this ligation product, using two primers, Cellulorev1 (5'-AACAGCTTTTGAAGATATACCTGAGGA-3') and Cellulorev2 (5'-TCCCCTTCTTCCGGGTCATAAACA-3') designed from the partial sequence of *C. cellulolyticum rub* gene obtained by sequencing the Past B/Past E amplification product. The amplified fragment was then cloned into pXcmKm12 (digested with *XcmI*), a T-vector based on those constructed by Cha et al. (5) in which a kanamycin-resistance gene has been incorporated between the two *XcmI* sites (N.P. Minton, personal communication). DNA sequencing of both strands was then conducted to determine the up and down sequence of the rubredoxin gene of *C. cellulolyticum*. For this purpose we used the dideoxy-chain termination method (38) with [ $\alpha$ -S<sup>35</sup>] dATP (1,250 Ci/mmol) (NEN Life Science Products) and the T7 sequencing kit (Pharmacia LKB) with M13 reverse, M13 universal, Cellulorev1 and Cellulorev2 primers.

#### **2.4. Nucleotide sequence accession number.**

The sequence data reported here have been deposited in the EMBL nucleotide sequence database under accession number no. AJ 238458.

#### **2.5. Primer extension analysis.**

The Cellulorev2 oligonucleotide was 5' end-labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol) (Amersham) and T4 polynucleotide kinase (Biolabs). For annealing, 20 µg of total RNA and 20 ng of the labelled primer were heated to 65 °C for 10 min in 10 µl of 50 mM Tris-HCl (pH 8.3)-40 mM KCl-6 mM MgCl<sub>2</sub> and then cooled slowly to room temperature (10 min). cDNA synthesis was performed in the same solution for 30 min at 45 °C in the presence



of the non radioactive deoxyribonucleosides triphosphates (dNTPs) (225  $\mu$ M each) and 1 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Life Science). Primer-extended fragment was electrophoresed on a 7 % polyacrylamide-8 M urea sequencing gel with dideoxy sequencing reaction products obtained with the same primer (38).

## 2.6. Prediction of RNA-secondary structure.

Predictions of secondary structure were made with the Mfold program of the GCG software, version 8.1 Unix (1995) that is based on the thermodynamic values proposed by Jeager et al. (15).

## 2.7. Preparation of cell-free extracts for rubredoxin assay and SDS-PAGE.

Cells were grown in synthetic medium (pH 7.8) until they reached mid-exponential phase (OD 600 nm = 0.4), before being exposed to different growth or stress conditions: 34 °C (control), 42 °C (heat shock), 2.5 % NaCl (osmotic shock), pH 5 (acid shock, achieved by 1 N HCl addition), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM or O<sub>2</sub> (1 atm) (oxidative stress), CO (1 atm), for 30 min. Cells to be starved by carbon exhaustion were grown in defined medium containing 0.05 % (w/v) cellobiose instead of 0.3 % (w/v). In addition, to achieve sudden carbon-starvation, cells were harvested by centrifugation under anaerobic conditions and resuspended in cellobiose-free defined medium. Cells were carbon-starved for 30 min, harvested by centrifugation and resuspended in 100 mM Tris-HCl (pH 7.6). After cell disruption by sonication, cell debris were eliminated by centrifugation. For samples to be analysed by SDS-PAGE, proteins were acetone-precipitated and resuspended in Laemmli buffer (16) to a concentration of 0.5 mg/ml. After boiling for 3 min, 10  $\mu$ l of sample was loaded on the gel. The acrylamide concentration was 10 % (w/v) in the stacking gel and 20 % in the separating gel. After electrophoresis (Mini protean, Biorad), the gel was silver-stained (Biorad silver-stain kit) according to the manufacturer's instructions.

The enzyme used for the determination of Rd content in *C. cellulolyticum* extracts was the NADH-Rd-oxidoreductase of *C. acetobutylicum*, free from rubredoxin by ion exchange chromatography (29, 30). Rd was recovered from *C. cellulolyticum* crude extracts using the same method since DEAE column-adsorbed-rubredoxin is eluted using buffer of higher ionic strength (1 M Tris-HCl instead of 100 mM Tris-HCl, pH 7.6).

Rd, purified from *C. cellulolyticum*, was used to establish standard curves prior to each new assay. This Rd was isolated from *C. cellulolyticum* according to the procedure of LeGall and Forget (18). Rd exhibited an A<sub>280</sub>/A<sub>490</sub> ratio equal to 2.53, which is characteristic





labelled and used as a probe for Southern hybridisation of *C. cellulolyticum* digested DNA. Whatever the endonuclease(s) used (*Bgl*II, *Bcl*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Nde*I, *Xba*I, *Bam*HI, *Vsp*I, *Sa*II, *Xho*I) to digest the genomic DNA, a single fragment hybridised with the probe (data not shown). These data indicated that the *rub* gene was present as a single copy in the genome of *C. cellulolyticum*.

To obtain extremities and sequence context of the rubredoxin gene, inverse PCR was undertaken. As a fragment smaller than 2 kbp is necessary to increase intramolecular ligation frequency and to succeed in amplifying the circular resultant fragment, we chosen the *Vsp*I digestion since it generated a fragment of almost 590 bp which hybridised with the labelled-probe. A PCR product of expected size was obtained and directly cloned into pXcmKm12 vector. The PCR product was sequenced on both strands and compiled with the internal *rub* gene sequence to give the sequence shown in figure 2.

```

VspI
1  ATTAATAATCATAAACTACTCGTTGGCGAATACTAAGGGCAGGGGACAGAG
51  GTGATGCTTTTATGAGTAGCGGGGATGATATCAGAGCTAGACTGGAAGAT
101 CTTAAATGCTATATGTATAATGAAATACAACGTTTGATTTCCCAGAGTAC
151 AGAGACTGTAGAAGTCAGTGCTTCTGCGAATACCCGGAAGTATAACCGAC
201 TAAACACCAAAAAGGCTCTTAAAAATTGAAAAGAAAATTTTAAAAAAGG

      -35          -10          +1
251  TGTTATGCAAGATAAAATTTGGGAAATATATAATTGTAGTAATTACAATACA
                                     ★★★★★★  rub
301  ATGAGGTCAGAATCTCTTTTTTCGGCTCGGATTAAATTAGGAGGGTACTAT
                                     M
351  GGATATCTACGTTTGTACAGTATGCGGTTATGTTTATGACCCGGAAGAAG
      D I Y V C T V C G Y V Y D P E E
401  GGGACCCGGACGGTGGAAATTGCACCGGGAACAGCTTTTGAAGATATACCT
      G D P D G G I A P G T A F E D I P
451  GAGGATGGGTATGTCCTCTTTGCGGAGTAGGCAAGGACTTGTTTAAAAA
      E D W V C P L C G V G K D L F E K

501  ACAATAAAAGCATAATTGCATATAATGATTAGTTATTAAGAAGATTCTTA
      Q •                               >>>> >>>>>>>> >
561  GGAGTTGCCCTTAGAATCTTTTTAAAAAATTAAT
      >>          <<<< <<<<<<<< <<<<          VspI

```

**Figure 2.** Nucleotide sequence of the 578 bp *Vsp*I fragment encoding rubredoxin of *C. cellulolyticum*.

The gene has been translated with the one-letter amino acid code with the symbols below the first nucleotide of the corresponding codon. The transcription initiation site is marked +1. The -10 and -35 regions of the promoter are boxed. Putative Shine-Dalgarno sequence is indicated by stars and inverted repeats are indicated by open arrows representing the length and orientation of the stem.



The *VspI* fragment contained 159 bp, corresponding to the open reading frame (ORF) encoding rubredoxin. Neither the upstream (circa 340 bp), nor the downstream (circa 80 bp) regions appear to contain a truncated ORF. Hence, this fragment carried the entire *rub* gene of *C. cellulolyticum*. The G+C contents of coding and intergenic regions are 45 % and 35 % respectively. A potential Shine-Dalgarno sequence (AGGAGG) is located 5 bp upstream of the ATG start codon (fig.2), constituting a characteristic ribosome-binding site.

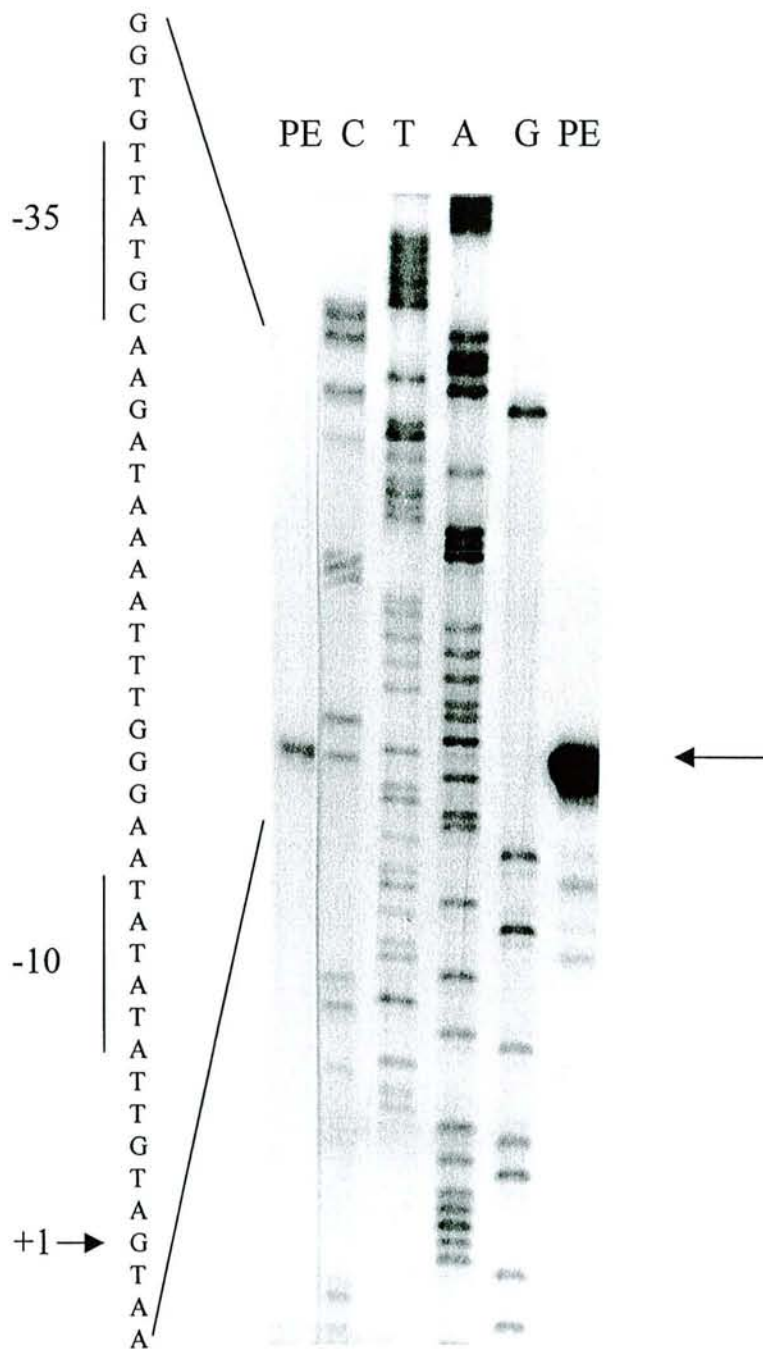
The deduced amino acid sequence gives a 52 amino acid protein whose calculated molecular mass is 6.1 kDa. This protein contains all the rubredoxin conserved residues, including the four cysteine ligands (C6, C9, C39, C42) of the iron atom. We next compared the sequence with rubredoxins of other micro-organisms using a binary alignment method. The data showed a high degree of sequence identity with other rubredoxins: from 78.8 % (for rubredoxin of *Clostridium sticklandii*) to 53.8 % (for rubredoxin of *Peptococcus aerogenes*) (fig. 1).

### 3.2. Primer extension analysis of transcriptional start site:

To define precisely the transcriptional start site, primer extension was performed with reverse transcriptase using the Cellulorev2 primer. One single cDNA was obtained (fig. 3; PE, product of primer extension (2.5 µl of the 10 µl primer-extended product or 2.5 µl of the 10-fold diluted fragment, respectively), CTAG, products of sequencing reactions obtained by using the same oligonucleotide. The position of putative -10 and -35 promoter sequences and transcriptional start site, on the complementary strand, are indicated). The 3' end of this cDNA, corresponding to the transcription start site, was located 62 bp upstream of the *rub* start codon. Potential promoter sequences were identified: a 'TATA box' was detected 5 bp upstream the transcription start site (5'-TATATA-3') and a potential -35 region was found (5'-TTATGC-3') with a spacer length of 17 bp. In addition, a very A+T rich region (5'-TTTTTAAAAAAA-3') was found at position -50. Prediction of RNA secondary structure was made using Mfold program. We found that a stem-loop structure is likely to occur between positions 29 and 71 downstream the coding region of *rub* gene of *C. cellulolyticum* (fig. 2). This stem-loop structure includes a stretch of U residues and is followed by a rich A+T region (5'-AAAATTAAT-3').







**Figure 3.** Determination of the transcription start site of the *rub* gene of *C. cellulolyticum*.

PE, product of primer extension; CTAG, products of sequencing reactions obtained by using the same oligonucleotide. The position of putative -10 and -35 promoter sequences and transcriptional start site, on the complementary strand, are indicated.

### 3.3. Search for a NADH-rubredoxin oxidoreductase in *C. cellulolyticum*:

An electron acceptor with high affinity for reduced Rd and low affinity for the diaphorases from the extracts is necessary to measure NADH-Rd reductase activities in clostridial crude extracts. Metmyoglobin was shown to be the best electron acceptor of the reduced Rd and its use for the detection of NADH-Rd reductase in clostridia was established (29). No NADH-Rd oxidoreductase activity was detected in *C. cellulolyticum* ATCC 35319 extracts. This result led us to use the NADH-Rd oxidoreductase from *C. acetobutylicum* ATCC 824 to assay the Rd level in *C. cellulolyticum* assay since the *C. cellulolyticum* Rd was proved to react with metmyoglobin in the presence of this enzyme. In fact, we found that the rate of metmyoglobin reduction in the presence of the NADH-Rd-oxidoreductase from *C. acetobutylicum* was constant for at least three minutes and proportional to the amount of *C. cellulolyticum* Rd added, between 0 and 600 picomoles.

### 3.4. Examination of rubredoxin cell content in different stress conditions of *C. cellulolyticum*:

Cells in exponential growth phase were challenged with different stress conditions (fig. 4) e.g., heat-shock (42 °C), salt stress (2.5 % NaCl), carbon starvation (by exhaustion or sudden starvation respectively), oxidative stress (O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), acid stress (pH 5) or CO atmosphere for 30 min. These stress conditions were found to be optimal for *C. cellulolyticum* (data not shown).

The results obtained by measuring enzymatically the rubredoxin level (fig. 4a) were in accordance with those found by electrophoresis of intracellular proteins of *C. cellulolyticum* (fig. 4b). As for the rubredoxin of *C. pasteurianum* (23), rubredoxin of *C. cellulolyticum* was found to co-migrate with the front. No induction was obtained, neither during oxidative stress or heat-shock, nor in the other examined stress conditions; rather the rubredoxin level was found to decrease when cells were challenged with NaCl or carbon-starved. When *C. cellulolyticum* was starved suddenly, no more rubredoxin was detected (fig. 4).

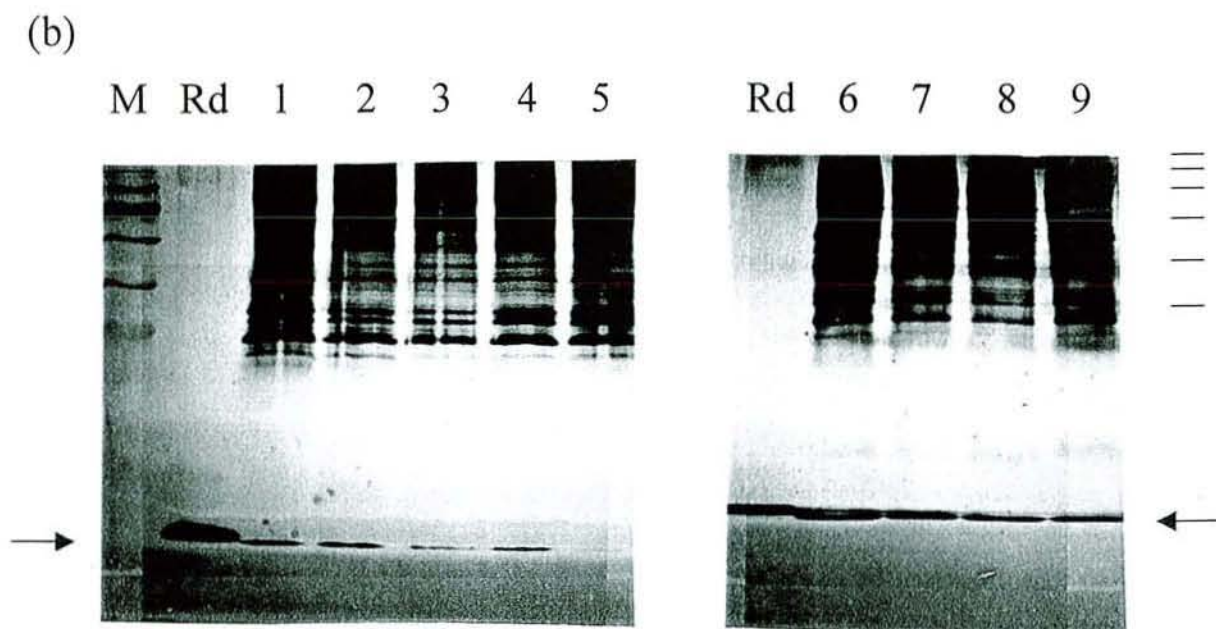
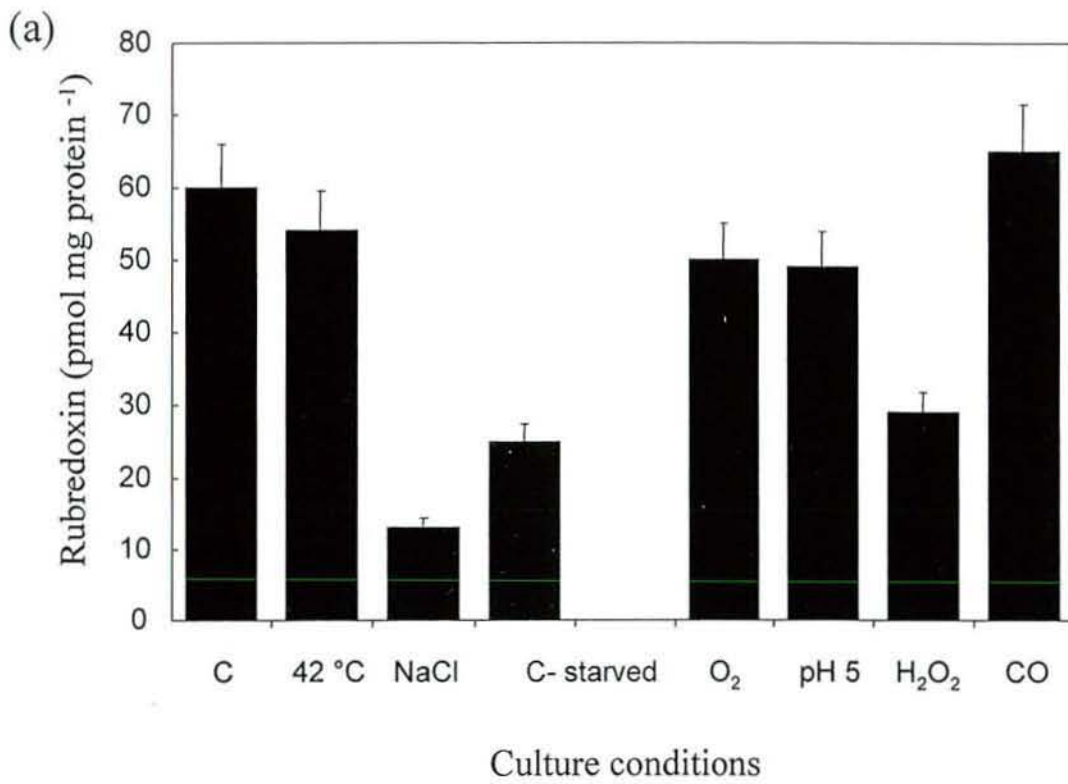
Furthermore, the examination of rubredoxin level during the heat-shock treatment (after 5, 10, 15, 20 and 30 min of exposure to 42 °C) led to the same results e.g., no induction of this iron-sulfur protein in *C. cellulolyticum* (data not shown).

**Figure 4.** Rubredoxin concentration in different culture conditions:

(a) as measured enzymatically by the NADH-oxidoreductase/ Metmyoglobin system (see material and methods). Results presented are means of three different determinations from three different samples. C, Control; C-starved, carbon starvation by exhaustion and sudden starvation, respectively.

(b) as analysed by SDS-PAGE. M, molecular-mass markers (indicated with lines): phosphorylase b, 94 kDa; albumin, 67 kDa, ovalbumin, 43 kDa, carbonic anhydrase, 30 kDa, trypsin inhibitor, 20 kDa,  $\alpha$ -Lactalbumin, 14 kDa; Rd, purified rubredoxin from *C. cellulolyticum*; 1, Control experiment; 2, 42 °C for 30 min; 3, 2.5 % NaCl for 30 min; 4 and 5, Carbon starvation for 30 min (by exhaustion and sudden starvation, respectively) ; 6, O<sub>2</sub> atmosphere for 30 min; 7, pH 5 for 30 min; 8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM for 30 min; 9, CO atmosphere for 30 min. The arrow indicates the position of rubredoxin.





#### 4. DISCUSSION

The sequence of the gene encoding the rubredoxin of *C. cellulolyticum* was determined using PCR and inverse PCR. As for other clostridial genes, the G+C content is higher in the coding region (45 %) than in the intergenic region (35 %) (45) and is in the range expected for this bacterium since the reported mean G+C DNA content of *C. cellulolyticum* is 41 % (moderately low G+C content among saccharolytic clostridia) (31). A characteristic purine tract (AGGAGG) was found 5 bp upstream of the AUG start codon constituting a potential ribosome-binding site. Its sequence matches well those found for other clostridial genes (45). However, spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon of clostridial ribosome-binding sites range from 6-13 nucleotides with an average value of 8 nucleotides. The spacing observed in the *rub* gene of *C. cellulolyticum* is thus a little lower than the optimal spacing found in clostridia.

The deduced amino-acid sequence gives a 52 amino-acid protein which contains all the rubredoxin conserved residues, including the four cysteine ligands of the iron atom. The alignment of this sequence with known sequences of other micro-organisms showed high homology with the rubredoxin of *C. sticklandii* (78.8 % homology) whereas less homology was found with the one of, although phylogenetically closely related, *C. thermosaccharolyticum* (69.2 %). These results suggest that *C. cellulolyticum* rubredoxin gene acquisition resulted from horizontal gene transfer rather than from vertical gene transfer.

The promoter sequences presumably recognized by the major form of clostridial RNA polymerase correspond to the canonical elements recognized by *E. coli* ( $E\sigma^{70}$ ) and *B. subtilis* ( $E\sigma^{43}$ ): -10 (5'-TATAAT-3') and -35 (5'-TTGACA-3') regions separated by 17 bp (8). Potential -10 and -35 regions (5'-TATATA-3' and 5'-TTATGC-3' respectively) were identified upstream the *rub* gene of *C. cellulolyticum* separated by the consensus length of 17 bp. In addition, Graves and Rabinowitz (13) have previously suggested that Gram-positive bacteria might require an 'extended' promoter recognition site in which the -35 element is preceded by a poly-A tract around position -45. We found such A+T rich region (5'-TTTTTAAAAAAA-3') at position -50 of the *rub* gene of *C. cellulolyticum*. This sequence called the 'UP element' was recognised in some promoters as an additional important determinant of promoter activity and is contacted by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase (35). In addition, we found, by secondary structure prediction, that a stem-loop is likely to occur in the RNA transcript in positions 29 to 71 downstream the coding region of the *rub* gene of *C. cellulolyticum*. It includes a stretch of 5 U residues and is followed by an A+T rich region



(5'- AAAATTAAT-3'), characteristic of factor  $\rho$ -independent transcription terminators. Thus, since no ORF was found upstream and downstream sequenced regions of the *rub* gene of *C. cellulolyticum*, the rubredoxin gene of this bacterium probably constitutes an independent transcriptional unit, such result being already found in *C. pasteurianum* (23). Contrary to the clostridia, both coding regions for Rd and a Rd-oxygen-oxidoreductase are clustered in the same operon in *Desulfovibrio gigas* (5, 6), a bacterium where an electron transfer chain composed of Rd, a NADH-Rd oxidoreductase and a Rd-oxygen-oxidoreductase have been characterised. This was the first discovery of a physiological role of Rd in sulfate-reducing bacteria. Such involvement of Rd into an aerobic pathway was not found in *C. cellulolyticum*. Indeed, no Rd-oxygen-oxidoreductase gene was detected in this bacterium and examination of Rd cell content during oxidative stress ( $H_2O_2$  or  $O_2$ ) showed that this protein was not present at higher level than the control experiment.

Inhibition of hydrogenase under CO atmosphere mimics the early inhibition of growth observed for *C. cellulolyticum* due to NADH reoxidation default (26, 27). Since rubredoxin is likely to serve as an electron transfer protein, we checked for a potential induction of this protein in this particular stress condition. As for other examined stress conditions (salt stress, acid stress or carbon starvation), no induction of rubredoxin was found in this growth condition. In addition, since a rubredoxin-like protein could be involved in heat-shock stress response of *C. acetobutylicum* (2), we measured rubredoxin level during heat-shock treatment of *C. cellulolyticum*. Rubredoxin is unlikely to play such a role in *C. cellulolyticum* since no induction was found either.

Many physiological functions have been proposed for rubredoxin in other bacteria (CO oxidation (33), in NADPH-nitrate reductase system (40), in lactate metabolism (41)) but they did not occur in *C. cellulolyticum* since this bacterium does not possess such metabolic pathways. In addition, they require an associated oxidoreductase like NAD(P)H-Rd oxidoreductase, which was found to be absent in *C. cellulolyticum*.

The high redox potential of rubredoxin prevents it from playing a role in many electron transfer reactions and it is not clear, therefore, which electron transfer reaction is catalysed by rubredoxin, particularly so in *C. cellulolyticum*. Thus, the participation of Rd in a physiological reaction in a clostridium remains to be demonstrated.



## Acknowledgments

This work was supported by the Ministère des Affaires Etrangères and The British Council under the ALLIANCE project number 96004. S. Payot was a grant-holder of the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We thank the 'Service commun de biophysicochimie des interactions moléculaires' for supplying facilities in computer analysis.

## REFERENCES

1. Bachmeyer H., Benson A.M., Yasunobu K.T., Garrard W.T., Whiteley H.R., Non-heme iron proteins. IV. Structural studies of *Micrococcus aerogenes* rubredoxin, *Biochemistry* (1968), 7, 968-996.
2. Bahl H., Müller H., Behrens S., Joseph H., Narberhaus F., Expression of heat-shock genes in *Clostridium acetobutylicum*, *FEMS Microbiol.* (1995), 17, 341-348.
3. Bruschi M., The amino acid sequence of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgaris*, *Biochem. Biophys. Acta.* (1976), 434, 4-17.
4. Bruschi, M., The amino acid sequence of rubredoxin from the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1976), 70, 615-621.
5. Cha J., Bishai W., Chandrasegaran S., New vectors for direct cloning of PCR products, *Gene* (1993), 136, 369-370.
6. Chen L., Kiu M.Y., LeGall J., Fareleira P., Santos H., Xavier A.V., Rubredoxin oxidase, a new flavo-hemo-protein, is the site of oxygen reduction to water by the "strict anaerobe" *Desulfovibrio gigas*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993), 193, 100-105.
7. Chen L., Liu M.Y., LeGall J., Fareleira P., Santos H., Xavier A.V., Purification and characterization of an NADH-rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by *Desulfovibrio gigas*, *Eur. J. Biochem.* (1993), 216, 443-448.
8. deHase P.L., Zupancic M.L., Record M.T. Jr, RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase, *J. Bacteriol.* (1998), 180, 3019-3025.
9. Geissdörfer W., Frosch S.C., Haspel G., Ehrt S., Hillen W., Two genes encoding proteins with similarities to rubredoxin and rubredoxin reductase are required for conversion of dodecane to lauric acid in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1, *Microbiology* (1995), 141, 1425-1432.

10. Gérard P., Amine J., Raval G., Petitdemange H., Distribution of the rubredoxin gene among the *Clostridium butyricum* species, *Curr. Microbiol.* (1999), 38, 264-267.
11. Gomes C.M., Silva G., Oliveira S., LeGall J., Liu M.-Y., Xavier A.V., Rodrigues-Pousada C., Teixeira M., Studies on the redox centers of the terminal oxidase from *Desulfovibrio gigas* and evidence for its interaction with rubredoxin, *J. Biol. Chem.* (1997), 272, 22502-22508.
12. Graves M.C., Mullenbach G.T., Rabinowitz J.C., Cloning and nucleotide sequence determination of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985), 82, 1653-1657.
13. Graves M.C., Rabinowitz J.C., In vivo and in vitro transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene: Evidence for 'extended' promoter elements in Gram-positive organisms, *J. Biol. Chem.* (1986), 261, 11409-11415.
14. Guedon E., Payot S., Desvaux M., Petitdemange H., Carbon and electron flow in *Clostridium Cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium, *J. Bacteriol.* (1999), 181, 3262-3269.
15. Jeager J.A., Turner D.H., Zucker M. Improved predictions of secondary structures for RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), 86, 7706-7710.
16. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (1970), 227, 680-685.
17. Lee W.Y., Brune D.C., LoBrutto R., Blankenship R.E., Isolation, characterization, and primary structure of rubredoxin from the photosynthetic bacterium, *Heliobacillus mobilis*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1995), 318, 80-88.
18. LeGall J., Forget N., in: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New-York, 1978, vol. LIII, pp. 613-634.
19. Lovenberg W., Sobel B.E., Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1965), 54, 193-199.
20. Lovenberg W., Walker M.N., in: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds), *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1978, vol. LIII, pp. 340-346.
21. Lumpio H.L., Shenvi N.V., Garg R.P., Summers A.O., Kurtz D.M. Jr, A rubrerythrin operon and nigerythrin gene in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), *J. Bacteriol.* (1997), 179, 4607-4615.
22. Marczak R., Ballongue J., Petitdemange H., Gay R., Differential levels of ferredoxin and rubredoxin in *Clostridium acetobutylicum*, *Biochimie* (1985), 67, 241-248.
23. Mathieu I., Meyer J., Moulis J.M., Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the rubredoxin gene from *Clostridium pasteurianum*, *Biochem. J.* (1992), 285, 255-262.



24. Nölling J., Ishii M., Koch J., Pihl T.D., Reeve J.N., Thauer R.K., Hedderich R., Characterization of a 45-KDa flavoprotein and evidence for a rubredoxin, two proteins that could participate in electron transport from H<sub>2</sub> to CO<sub>2</sub> in methanogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Eur. J. Biochem. (1995), 231, 628-638.
25. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L., Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, Genetics (1988), 120, 621-623.
26. Payot S., Guedon E., Cailliez C., Gelhaye E., Petitdemange H., Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth, Microbiology (1998), 144, 375-384.
27. Payot S., Guedon E., Gelhaye E., Petitdemange H., Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose, Research in Microbiology, in press
28. Peterson J.A., Kusunose M., Kusunose E., Coon M.J., Enzymatic  $\omega$ -oxidation. II. Function of rubredoxin as the electron carrier in  $\omega$ -hydroxylation, J. Biol. Chem. (1967), 242, 4334-4340.
29. Petitdemange H., Blusson H., Gay, R., Detection of NAD(P)H rubredoxin oxidoreductases in clostridia, Anal. Biochem. (1981), 116, 564-570.
30. Petitdemange H., Marczak R., Blusson H., Gay R., Isolation and properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-rubredoxin oxidoreductase of *Clostridium acetobutylicum*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1979), 91, 1258-1265.
31. Petitdemange E., Caillet F., Giallo J., Gaudin C., *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic mesophilic species from decayed grass, Int. J. Syst. Bacteriol. (1984), 34, 155-159.
32. Pianzola M.J., Soubes M., Touati, D., Overproduction of the *rbo* gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack superoxide dismutase in *Escherichia Coli*, J. Bacteriol. (1996), 178, 6736-6742.
33. Ragsdale S.W., Ljungdahl L.G., DerVartanian D.V., Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodi* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme, J. Bacteriol. (1983), 155, 1224-1237.
34. Ragsdale S.W., Ljungdahl L.G., Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents, J. Bacteriol. (1984), 157, 1-6.



35. Ross W., Gosink K.K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R.L., A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase, *Science* (1993), 262, 1407-1413.
36. Rouault T.A., Klausner R.D., Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron, *Trends Biotechnol.* (1996), 21, 174-177.
37. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., in: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, 1989.
38. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977), 74, 5463-5467.
39. Seki Y., Ikeda A., Ishimoto M., Rubredoxin as an intermediary electron carrier for nitrate reduction by NAD(P)H in *Clostridium perfringens*, *J. Biochem.* (1988), 103, 583-584.
40. Seki Y., Seki S., Satoh M., Ikeda A., Ishimoto M., Rubredoxin from *Clostridium perfringens* : complete amino acid sequence and participation in nitrate reduction, *J. Biochem.* (1989), 106, 336-341.
41. Shimizu F., Ogata M., Yagi T., Wakabayashi S., Matsubara H., Amino acid sequence and function of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki, *Biochimie* (1989), 71, 1171-1177.
42. Southern E.M., Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* (1975), 98, 503-517.
43. Voordouw J.K., Voordouw G., Deletion of the *rbo* gene increases the oxygen sensitivity of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Appl. Environ. Microbiol.* (1998), 64, 2882-2887.
44. Woodley K.J., Meyer T.E., The complete amino acid sequence of rubredoxin from green phototrophic bacterium *Chlorobium thiosulfatophilum* strain PM, *Eur. J. Biochem.* (1987), 163, 161-166.
45. Young M., Minton N.P., Staudenbauer W.L., Recent advances in the genetics of the clostridia, *FEMS Microbiol. Rev.* (1989), 63, 301-326.

### III. Conclusion.

La séquence du gène codant la rubrédoxine de *C. cellulolyticum* a été déterminée en utilisant les techniques de PCR et PCR inverse, grâce à des oligonucléotides obtenus à partir de la séquence du gène de la rubrédoxine de *C. pasteurianum* (Mathieu *et al.*, 1992).

Comme pour d'autres gènes de clostridia, le pourcentage en G+C est plus élevé dans les régions codantes (45 %) que dans les zones intergéniques (35 %). Le pourcentage en G+C moyen obtenu est similaire à celui précédemment décrit pour cette bactérie (40-41 %) (Petitdemange *et al.*, 1984).

Un site de fixation aux ribosomes potentiel (5'-AGGAGG-3'), dont la séquence est similaire à celle décrite pour d'autres gènes de clostridia, apparaît 5 paires de base en amont du codon d'initiation ATG. Cependant, l'espacement entre cette séquence de Shine-Dalgarno et le codon d'initiation est légèrement inférieure à celle décrite habituellement chez les clostridia (5 Nt contre 6-13 Nt) (Young *et al.*, 1989).

La séquence protéique déduite de la séquence du gène comprend 52 acides aminés, dont ceux qui sont conservés chez toutes les rubrédoxines y compris les 4 cystéines ligands de l'atome de fer. L'alignement de séquence de la rubrédoxine de *C. cellulolyticum* avec celles décrites chez d'autres micro-organismes laisse apparaître une très forte homologie avec la rubrédoxine de *C. sticklandii* (78 %) pourtant plus éloigné phylogénétiquement de *C. cellulolyticum* que *C. thermosaccharolyticum* (pourcentage d'homologie: 60,2 %). L'acquisition du gène de la rubrédoxine par *C. cellulolyticum* pourrait donc résulter d'un transfert génique horizontal plutôt que vertical.

Les séquences promotrices, reconnues par la forme majeure d'ARN polymérase chez les clostridia, sont similaires à celles décrites pour E- $\sigma^{70}$  chez *E. coli* et E- $\sigma^{43}$  chez *B. subtilis*: régions -10 (5'-TATAAT-3') et -35 (5'-TTGACA-3') séparées de 17 paires de base (deHaseth *et al.*, 1998). Des séquences -10 (5'-TATATA-3') et -35 (5'-TTATGC-3') potentielles, séparées de la distance consensus de 17 paires de base, ont été identifiées en amont du gène de la rubrédoxine de *C. cellulolyticum*. Par ailleurs, comme cela a été décrit chez d'autres bactéries à Gram positif, une séquence riche en A+T (5'-TTTTTAAAAAAA-3') apparaît en position -50. Cette séquence, appelée 'élément UP', pourrait être un élément important de l'activité des promoteurs et entrerait en contact avec la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase (Graves and Rabinowitz, 1986).



De plus, nous avons mis en évidence, par prédiction de la structure secondaire de l'ARNm (Jeager *et al.*, 1989), l'existence d'une structure en tige-boucle susceptible de se former aux positions 29 à 71 en aval du gène de la rubrédoxine. Cette structure inclut une succession de 5 résidus uracile et est suivie d'une région riche en A+T (5'-AAAATTAAT-3'), caractéristique des terminateurs de transcription  $\rho$ -indépendants. Par ailleurs, puisqu'aucune ORF n'apparaît dans les régions amont et aval séquencées, il est probable que le gène de la rubrédoxine constitue une unité transcriptionnelle indépendante, comme cela a été décrit chez *C. pasteurianum* (Mathieu *et al.*, 1992). Chez *D. gigas*, les gènes codant la Rd et la Rd-oxygène-oxydoréductase sont réunis au sein d'un même opéron. Les protéines correspondantes appartiennent à une chaîne de transfert d'électrons comprenant la Rd, une NADH-Rd-oxydoréductase et une Rd-oxygène-oxydoréductase, impliquée dans l'utilisation d'oxygène par cette bactérie (Chen *et al.*, 1993a, b; Gomes *et al.*, 1997). La participation de la Rd de *C. cellulolyticum* à une telle chaîne de transfert d'électrons est à écarter puisqu'aucun gène codant une Rd-oxygène-oxydoréductase, ni aucune activité NADH-Rd-oxydoréductase, n'ont été mis en évidence chez cette bactérie. De plus, le taux intracellulaire de rubrédoxine lors d'un stress oxydatif est identique à celui du témoin.

L'inhibition de l'hydrogénase lors de cultures de *C. cellulolyticum* en atmosphère de CO provoque une inhibition précoce de la croissance de cette bactérie en conduisant à un défaut de réoxydation de NADH et à une accumulation de ce nucléotide réduit (Payot *et al.*, in press). Comme la Rd pourrait servir de protéine de transport d'électrons (rôle démontré *in vitro* mais pas *in vivo* chez *C. pasteurianum* (Lovenberg and Sobel, 1965)), nous avons recherché une éventuelle induction de cette protéine dans les conditions précédemment citées. Comme pour d'autres conditions de stress examinées (pH acide, stress osmotique ou carence en carbone), aucune induction n'a été mise en évidence. Par ailleurs, comme une protéine du même type que la Rd pourrait être impliquée dans la réponse à un choc thermique chez *C. acetobutylicum* (Bahl *et al.*, 1995), nous avons déterminé le niveau intracellulaire en Rd dans des conditions de stress thermique. Les résultats obtenus (pas d'induction observée) vont à l'encontre d'un tel rôle pour la Rd chez *C. cellulolyticum*.

Plusieurs rôles cataboliques ont été proposés pour la Rd: implication dans l'oxydation du CO (Ragsdale *et al.*, 1983), dans un système de réduction des nitrates (Seki *et al.*, 1988) ou dans le métabolisme du lactate (Shimizu *et al.*, 1989). Ces hypothèses concernant le rôle de la rubrédoxine peuvent être écartées chez *C. cellulolyticum* puisque cette bactérie ne possède pas ces voies cataboliques particulières. Par ailleurs, ces voies requièrent une oxydoréductase telles qu'une NAD(P)H oxydoréductase, qui est absente chez *C. cellulolyticum*.



Le haut potentiel redox de la Rd l'empêche d'assurer un rôle dans de nombreuses réactions de transfert d'électrons. La réaction de transfert d'électrons à laquelle la Rd participe reste donc indéterminée, particulièrement chez *C. cellulolyticum*. L'élucidation du rôle de la Rd chez cette bactérie passe donc par la mise en évidence d'un partenaire redox potentiel de cette protéine.

Les conditions de stress examinées (notamment stress thermique, osmotique et carence en carbone) ont fait préalablement l'objet d'une étude complète. Cette étude nous a permis de définir des conditions de stress optimales pour *C. cellulolyticum*. Nous avons également mis en évidence des protections croisées entre les différents stress, ce qui laisse supposer l'existence d'un système d'organisation similaire à celui décrit chez d'autres bactéries: existence de protéines de stress générales et protéines de stress spécifiques.



Conclusion générale et  
perspectives

## **CHAPITRE 7. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

L'optimisation du processus de cellulolyse, étape limitante du processus de biométhanisation, nécessite au préalable une connaissance approfondie des micro-organismes cellulolytiques, parmi lesquels *C. cellulolyticum*.

Dans cette optique, nous avons examiné différents aspects du métabolisme de *C. cellulolyticum*, pouvant jouer un rôle dans la compétitivité de cette bactérie au sein de son écosystème naturel:

✓ analyse du phénomène d'inhibition de croissance précoce observé sur milieu de culture complexe par: ➔ **l'étude du catabolisme du cellobiose chez *C. cellulolyticum* cultivé en chemostat sur milieu complexe'**

➔ **la détermination de l'apport d'un milieu synthétique concernant les flux de carbone et d'électrons chez *C. cellulolyticum* lors de cultures en continu'**

➔ **l'analyse du processus d'inhibition de croissance et de sa levée lors de cultures en batch de *C. cellulolyticum* sur milieu complexe'.**

✓ détermination des conditions requises pour une sporulation efficace de cette bactérie: **'analyse de l'effet de la vitesse de croissance et de la disponibilité en cellobiose et en ammonium sur la sporulation de *C. cellulolyticum*'.**

✓ étude de la réponse à différents stress (thermique, osmotique et carence en carbone) de cette bactérie et analyse du rôle potentiel d'une protéine fer-soufre particulière, la rubrédoxine, en tant que protéine de stress chez ce micro-organisme: **'clonage, séquençage et caractérisation de la région promotrice du gène de la rubrédoxine chez *C. cellulolyticum* et détermination de la teneur des cellules en rubrédoxine dans différentes conditions de stress'.**

La mise en œuvre de cultures de *C. cellulolyticum* en chemostat, sur milieu complexe en présence de cellobiose comme source de carbone, a permis de dresser un schéma détaillé des régulations métaboliques mises en œuvre par cette bactérie. Le profil de fermentation, orienté majoritairement vers la formation d'acétate et non vers la production de composés plus réduits (lactate ou éthanol), conduit à un défaut de régénération du NADH. La faible réoxydation de ce coenzyme entraîne une accumulation de celui-ci et pourrait limiter la



croissance de la bactérie en inhibant l'activité GAPDH, enzyme qui nécessite du  $\text{NAD}^+$  pour son fonctionnement.

Le remplacement du milieu complexe par un milieu synthétique permet de multiplier par 2 la vitesse de consommation du cellobiose et de diminuer le rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Sur milieu synthétique, *C. cellulolyticum* est capable de mettre en place des régulations, telle qu'une induction de la production de lactate, qui n'étaient pas mises en œuvre sur milieu complexe. Cette induction de la production de lactate, qui intervient lorsque le pyruvate s'accumule, permettrait d'éviter que cette voie n'entre en compétition (i) avec la voie de la pyruvate-fd-oxydoréductase qui assure une production maximale d'ATP via la formation d'acétate et (ii) avec l'anabolisme puisque le pyruvate est un précurseur d'acides aminés.

Sur milieu synthétique, le carbone issu du cellobiose peut entrer dans la composition de la masse cellulaire ou être utilisé pour produire de l'ATP alors que, sur milieu complexe, le cellobiose sert essentiellement de source d'énergie du fait de la présence de macromolécules préexistantes dans l'extrait de levure. Les conditions de culture sur milieu synthétique sont vraisemblablement plus proches de celles rencontrées par *C. cellulolyticum* dans son écosystème naturel, ce qui expliquerait la mise en œuvre de régulations qui n'existaient pas sur milieu complexe. *C. cellulolyticum* n'est pas adapté pour faire face à l'abondance nutritionnelle fournie par le milieu complexe, ce qui expliquerait le dérèglement interne observé chez cette bactérie cultivée sur ce milieu. Par ailleurs, les activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme du carbone chez *C. cellulolyticum* (en particulier GAPDH, activité phosphoroclastique et acétate kinase), mesurées *in vitro*, sont particulièrement élevées, compte-tenu des flux de carbone observés chez cette bactérie. Elles pourraient permettre à *C. cellulolyticum* d'entrer en compétition de façon efficace avec les autres bactéries non cellulolytiques de son écosystème, vis-à-vis de l'utilisation des substrats carbonés.

Ces informations sont importantes pour appréhender le comportement de *C. cellulolyticum* dans son milieu naturel. Cependant, une étude du métabolisme de cette bactérie dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans son écosystème s'avèrerait utile: (i) en utilisant comme substrat la cellulose afin d'obtenir un flux de carbone lent, limité par la vitesse d'hydrolyse de la cellulose; (ii) en recréant un écosystème par le biais de co-cultures de cette bactérie avec d'autres bactéries notamment méthanogènes qui, par le biais de transferts interspécifiques ( $\text{H}_2$  notamment) favoriseraient le catabolisme de cette bactérie.

Lorsque des cultures en batch sur milieu complexe sont réalisées en fermenteur à pH régulé avec une concentration élevée en cellobiose (23,4 mM), la croissance de *C. cellulolyticum* est biphasique et la biomasse finale obtenue est doublée par rapport à une croissance classique. La première phase de croissance est caractérisée par une faible production d'éthanol et de lactate. Le système NADH-fd-oxdoréductase/hydrogénase constitue alors la voie majeure de régénération du NADH mais n'est pas suffisante pour régénérer la totalité du NADH, ce qui conduit à une accumulation de ce coenzyme réduit. Contrairement à ce qui était observé lors des cultures en continu, une induction de la production de lactate a alors lieu. Cette induction, corrélée à une augmentation de l'activité lactate déshydrogénase, est concomitante avec la diminution de la concentration en NADH. Cela permet une reprise de la croissance et de la consommation du cellobiose. Ce phénomène peut être reproduit en réalisant les cultures sous atmosphère de CO<sub>2</sub>, inhibiteur de l'activité hydrogénase. Cette inhibition conduit à un défaut de réoxydation du NADH, induisant ainsi une augmentation de la teneur en NADH intracellulaire. Dans ces conditions de culture, une induction de la production de lactate est également observée.

De nombreux clostridia sont capables d'induire des changements métaboliques, comme *C. acetobutylicum* qui peut déclencher une production de solvants (Girbal *et al.*, 1995a). *C. cellulolyticum*, cependant, est capable d'induire la production de lactate, donc d'un deuxième acide, plus fort que l'acétate, et non d'un solvant. Ce comportement est inhabituel chez les clostridia puisque ces bactéries ont un pH intracellulaire plus élevé que les bactéries lactiques, ce qui les contraint à occuper une niche écologique moins acide. Il serait donc intéressant, compte-tenu de ce comportement particulier, d'étudier les régulations du pH intracellulaire chez cette bactérie.

Nous avons montré, par ailleurs, que *C. cellulolyticum* était capable d'augmenter son pool NADH+NAD<sup>+</sup> comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996; Decker and Pfitzer, 1972). Cela permettrait à la cellule de maintenir une teneur constante en NAD<sup>+</sup> nécessaire au catabolisme du cellobiose. Cette capacité de la bactérie à ajuster son pool NADH+NAD<sup>+</sup> en fonction des besoins pourrait également constituer une voie d'études ultérieures intéressante. L'étude des régulations s'exerçant sur la synthèse de ce coenzyme pourrait notamment apporter des informations utiles à la compréhension du métabolisme de *C. cellulolyticum*.

Jusqu'à maintenant, très peu d'études portant sur la sporulation chez les clostridia et chez les bactéries cellulolytiques ont été réalisées (Sauer *et al.*, 1995). Nous avons montré,



lors de ces cultures en continu de *C. cellulolyticum*, que le pourcentage de sporulation est dépendant de la vitesse de croissance de la bactérie. En effet, un pourcentage significatif de sporulation n'est observé que pour de faibles taux de dilution, correspondant à des vitesses de croissance faibles.

Par ailleurs, nous avons montré qu'une carence en cellobiose ou en ammonium n'induisait pas le processus de sporulation chez *C. cellulolyticum*. Ces résultats démontrent qu'une source de carbone et d'ammonium est nécessaire au déroulement de la sporulation chez cette bactérie, comme cela a été décrit chez d'autres clostridia (Sauer *et al.*, 1995; Woods and Jones, 1986).

Cependant, la sporulation de *C. cellulolyticum* est réprimée en présence d'un excès de cellobiose. *C. cellulolyticum* présente donc un comportement similaire à *C. perfringens* (Shih and Labbé, 1994) ou *C. thermosaccharolyticum* (Hsu and Ordal, 1969), par opposition à *C. butyricum* ou *C. acetobutylicum*, bactéries chez lesquelles la sporulation n'est pas soumise à une répression catabolique (Woods and Jones, 1986).

Le flux d'ammonium est un facteur important également puisque même en présence d'un excès de cellobiose, une limitation en ammonium, réalisée lorsque la vitesse de croissance est faible, permet d'induire la sporulation de *C. cellulolyticum*.

Par ailleurs, chez certains clostridia, une accumulation de glycogène intervient à la fin de la phase exponentielle avant le déclenchement de la sporulation et ce composé est dégradé par la suite lors du déclenchement de la sporulation. Cela suggère que ce polyglucane de réserve pourrait servir de source d'énergie pour la formation des spores et leur maturation (Bergère *et al.*, 1975; Reysenbach *et al.*, 1986; Robson *et al.*, 1974; Strasidine, 1972). Cependant, chez *C. cellulolyticum*, nous n'avons obtenu aucune corrélation entre accumulation ou utilisation de glycogène et formation de spores.

L'initiation de la sporulation est un phénomène très complexe qui nécessite la réunion de multiples paramètres physiologiques. Chez *B. subtilis*, une variété de conditions physiologiques (signaux nutritionnels, densité cellulaire, période du cycle cellulaire,...) génère des signaux, qui sont captés et traduits à l'intérieur de la cellule et influencent des protéines régulatrices de la sporulation (Errington, 1993; Haldenwang, 1995; Piggot, 1996). Lors de cette étude, nous avons mis en évidence que *C. cellulolyticum* ne sporule que dans une gamme très restreinte de vitesses de croissance et d'apports en cellobiose. De plus, des paramètres tels que la concentration en ammonium ou la composition du milieu modifient le pourcentage de sporulation. Il apparaît donc vraisemblable qu'une régulation aussi complexe que celle décrite chez *B. subtilis* a lieu chez cette bactérie. Il serait donc intéressant



d'approfondir les connaissances concernant la sporulation chez cette bactérie en utilisant notamment une approche moléculaire. Cela apporterait des informations primordiales concernant les voies de régulation de ce processus de différenciation chez les clostridia. Il serait également intéressant d'étudier la relation entre catabolisme du carbone et de l'azote, concernant l'induction de la sporulation de *C. cellulolyticum*.

✓ La détermination de la séquence du gène de la rubrédoxine chez *C. cellulolyticum* et l'analyse des variations de la teneur des cellules en rubrédoxine nous a permis:

➡ de mettre en évidence des séquences nucléotidiques impliquées dans la traduction et la transcription chez cette bactérie et de comparer ces séquences à celles décrites chez d'autres bactéries

➡ d'apporter une preuve supplémentaire de l'ubiquité et de la conservation de la séquence de la rubrédoxine chez les bactéries anaérobies.

➡ de réfuter certaines hypothèses concernant le rôle de cette protéine chez *C. cellulolyticum*.

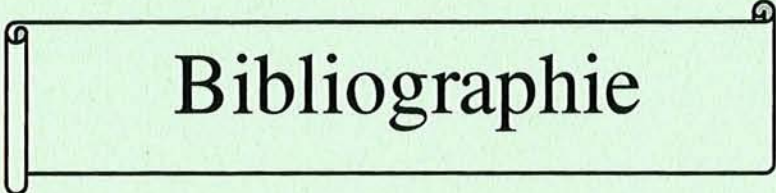
Afin d'élucider son rôle, plusieurs approches seraient intéressantes: (i) dresser un schéma complet des variations de la teneur en rubrédoxine des cellules, (ii) identifier un partenaire redox potentiel de cette protéine, (iii) 'disrupter' le gène correspondant pour déterminer sa fonction.

Le travail concernant la réponse à différents stress de *C. cellulolyticum*, réalisé préalablement à l'étude précédente, nous a permis de définir des conditions de stress optimales pour cette bactérie. Nous avons également mis en évidence des protections croisées entre les différents stress, ce qui laisse supposer l'existence d'un système d'organisation similaire à celui décrit chez d'autres bactéries: existence de protéines de stress générales et protéines de stress spécifiques. La caractérisation de ce type de systèmes requiert l'utilisation de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines (2D). Les premiers essais, portant sur l'incorporation de méthionine marquée au sein des protéines et l'adaptation d'un protocole de 2D à cette bactérie, sont encourageants mais requièrent un investissement (matériel et de temps) beaucoup plus important. Ils ouvrent la voie à un sujet d'études très vaste et d'actualité, qui mérite d'être pleinement exploré.

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont mis en évidence certains aspects du métabolisme de *C. cellulolyticum*, reliés à la capacité d'adaptation de cette

bactérie au sein de son écosystème naturel. Nous nous sommes essentiellement intéressés aux facteurs pouvant inhiber la croissance de cette bactérie, aux conditions de sporulation et à la réponse à différents stress de celle-ci. Toutefois, il apparaît évident que l'ensemble de ces travaux ne constitue qu'une ouverture sur d'autres recherches encore plus vastes, telles le mécanisme et les régulations au niveau moléculaire du processus de sporulation ou la caractérisation des différents systèmes de réponse au stress de cette bactérie. Ces études contribueraient, non seulement à une meilleure connaissance générale du processus de sporulation et de la réponse au stress chez les clostridia, mais aussi à mieux appréhender le comportement de ces bactéries au sein de leur écosystème naturel. Ces bactéries jouent un rôle important dans la dégradation anaérobie de la cellulose, étape importante du processus plus général de biométhanisation. Toutes ces informations pourraient donc se révéler intéressantes pour optimiser ce procédé, dont l'utilisation en vue du recyclage des déchets cellulosiques pourrait être amenée à se développer dans un proche avenir.





# Bibliographie



## BIBLIOGRAPHIE

### A.

Abbad-Andaloussi, S., C. Durr, G. Raval and H. Petitdemange. 1996. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* **142**: 1149-1158.

Abbad-Andaloussi, S., C. Manginot-Durr, J. Amine, E. Petitdemange and H. Petitdemange. 1995. Isolation and characterization of mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4413-4417.

Adams, M. W. W., L. E. Mortenson and J. S. Chen. 1980. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **594**: 105-176.

Ademe. 1998. Les Français et l'environnement: attitudes et comportements. Ademe éditions.

Adman, E. T., L. C. Sieker and L. H. Jensen. 1991. Structure of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**: 337-352.

Akbar, S., C. M. Kang, T. A. Gaidenko and C. W. Price. 1997. Modulator protein RsbR regulates environmental signalling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **24**: 567-78.

Akbar, S., S. Y. Lee, S. A. Boylan and C. W. Price. 1999. Two genes from *Bacillus subtilis* under the sole control of the general transcription factor sigma B. *Microbiology* **145**: 1069-1078.

Albright, L. M., E. Huala and F. M. Ausubel. 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 311-336.

Alexander, J. K. 1972a. Cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *Methods Enzymol.* **28**: 944-948.

Alexander, J. K. 1972b. Cellodextrine phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *Methods Enzymol.* **28**: 948-953.

Alper, S., L. Duncan and R. Losick. 1994. An adenosine nucleotide switch controlling the activity of the cell type-specific transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Cell* **77**: 195-205.

Antelmann, H., J. Bernhardt, R. Schmid and M. Hecker. 1995. A gene at 333° on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified  $\sigma^B$ -dependant general stress protein GspA. *J. Bacteriol.* **177**: 3540-3545.

Antelmann, H., J. Bernhardt, R. Schmid, U. Mach, U. Völker and M. Hecker. 1997. First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **18**: 1451-1463.

Arigoni, F., L. Duncan, S. Alper, R. Losick and P. Stragier. 1996. SpoIIE governs the phosphorylation state of protein regulating transcription factor  $\sigma^F$  during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3238-3242.

Arigoni, F., K. Pogliano, C. D. Webb, P. Stragier and R. Losick. 1995. Localization of protein implicated in establishment of cell type to sites of asymmetric division. *Science* **270**: 637-640.

### B.

Bachmayer, H., J. L. Peel, K. T. Yanusobu and S. G. Mayhew. 1968. Non-heme iron proteins. V. The amino acid sequence of rubredoxin from *Peptostreptococcus elsdenii*. *J. Biol. Chem.* **243**: 1024-1032.



- Bachmayer, H., K. T. Yasunobu and H. R. Whiteley. 1967. The amino acid sequence of *Micrococcus aerogenes* rubredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**: 435-440.
- Bagnara-Tardif, C., C. Gaudin, A. Bélaich, P. Hoest, T. Citard and J. P. Bélaich. 1992. Sequence analysis of a gene cluster encoding cellulases from *Clostridium cellulolyticum*. *Gene* **119**: 17-28.
- Bahl, H. 1993. Heat shock response and onset of solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. In D. R. Woods (ed.), *The Clostridia and Biotechnology*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, M.A.
- Bahl, H. and G. Gottschalk. 1984. Parameters effecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**: 215-223.
- Bahl, H., H. Müller, S. Behrens, J. Heinke and F. Narberhaus. 1995. Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 341-348.
- Bai, U., I. Mandic-Mulec and I. Smith. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Gene Develop.* **7**: 139-148.
- Baker, A. A., W. Helbert, J. Sugiyama and J. M. Mervyn. 1997. High Resolution Atomic Force Microscopy of Native *Valonia* Cellulose I Microcrystals. *J. Struct. Biol.* **119**: 129-138.
- Barak, I., J. Behari, G. Olmedo, P. Guzman, D. P. Brown, E. Castro, D. Walker, J. Westpheling and P. Youngman. 1996. Structure and function of the *Bacillus* SpoIIE protein and its localization to sites of sporulation septum assembly. *Mol. Microbiol.* **19**: 1047-1060.
- Barth, M., C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer and R. Hengge-Aronis. 1995. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 3455-3464.
- Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 548-557.
- Bayer, E. A. and R. Lamed. 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J. Bacteriol.* **167**: 828-836.
- Bayer, E. A., E. Morag, R. Lamed, S. Yaron and Y. Shoham. 1997. Cellulosome structure: four pronged attack using biochemistry, molecular biology, crystallography and bioinformatics. In M. Claeysens, W. Nerinckx and K. Piens (ed.), *Carbohydrates from Trichoderma reesei and other microorganisms. Structure, biochemistry, genetics and application*. The Royal Society of Chemistry, London, United Kingdom.
- Bayer, E. A., E. Morag, Y. Shoham, J. Tormo and R. Lamed. 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In M. Fletcher (ed.), *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Wiley-Liss, New-York.
- Béguin, P. and J. P. Aubert. 1992. La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *Annales de l'Institut Pasteur* **3**: 91-115.
- Béguin, P. and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
- Béguin, P., J. Millet, O. Grépinet, A. Navarro, M. Juy, A. Amit, R. Poljak and J. P. Aubert. 1988. The *cel* (cellulose) degradation genes of *Clostridium thermocellum*. In J. P. Aubert, P. Béguin and J. Millet (ed.), *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Academic Press, London.
- Behari, J. and P. Youngman. 1998. A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J. Bacteriol.* **180**: 6316-6324.
- Bélaich, J. P., C. Tardif, A. Bélaich and C. Gaudin. 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* **57**: 3-14.
- Benson, A., K. Tomoda, J. Chang, G. Matsueda, G. Lode and E. T. Coon. 1971. Evolutionary and phylogenetic relationships of rubredoxin-containing microbes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**: 640-646.



Benson, A. K. and W. G. Haldenwang. 1992. Characterization of a regulatory network that controls  $\sigma^B$  expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 749-757.

Benson, A. K. and W. G. Haldenwang. 1993. *Bacillus subtilis*  $\sigma^B$  is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2330-2334.

Benson, A. K. and W. G. Haldenwang. 1993. Regulation of  $\sigma^B$  levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 2347-2356.

Bergère, J. L., M. Rousseau and C. Mercier. 1975. Polyoside intracellulaire impliqué dans la sporulation de *Clostridium butyricum*. I. Cytologie, production et analyse enzymatique préliminaire. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **126**: 295-314.

Bernhardt, J., U. Völker, B. Völker, H. Antelmann, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker. 1997. Specific and general stress protein in *Bacillus subtilis* - a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**: 999-1017.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.

Blake, P. R., J. B. Park, F. O. Bryant, S. Aono, J. K. Magnuson, E. Eccleston, J. B. Howard, M. F. Summers and M. W. W. Adams. 1991. Determinants of protein hyperthermostability: purification and amino acid sequence of rubredoxin from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* and secondary structure of the zinc adduct by NMR. *Biochemistry* **30**: 10885-10895.

Booth, I. R. 1976. Cell membrane of *Clostridium pasteurianum*. Ph D Thesis, University of Wales.

Bourret, R. B., K. A. Borkovich and M. I. Simon. 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 401-441.

Boylan, S. A., A. R. Redfield and C. W. Price. 1993. Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 7931-7937.

Boylan, S. A., A. Rutherford, S. M. Thomas and C. W. Price. 1992. Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor by a regulatory pathway responsive to stationary phase signals. *J. Bacteriol.* **173**: 7856-7866.

Boylan, S. A., S. M. Thomas and C. W. Price. 1991. Genetic method to identify regulons controlled by non essential elements-isolation of a gene dependent on alternate transcription factor- $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 7856-7866.

Bronnenmeier, K., K. P. Rücknagel and W. L. Staudenbauer. 1991. Purification and properties of a novel type of exo-1,4- $\beta$ -glucanase (Avicelase I) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *Eur. J. Biochem.* **200**: 379-385.

Bruschi, M. 1976a. The amino acid sequence of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta* **434**: 4-17.

Bruschi, M. 1976b. The amino acid sequence of rubredoxin from the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* **70**: 615-621.

Bukau, B. 1993. Regulation of the *E.coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**: 671-680.

Burbulys, D., K. A. Trach and J. A. Koch. 1991. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.

## C.

Cailliez, C., L. Benoit, J. P. Thirion and H. Petitdemange. 1992. Characterization of 10 mesophilic cellulolytic *Clostridia* isolated from a municipal solid waste digester. *Curr. Microbiol* **25**: 105-112.

Cashel, M. 1975. Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**: 301-318.



Cavedon, K., S. B. Leschine and E. Canale-Parola. 1990. Characterization of the extracellular cellulase from a mesophilic *Clostridium* (strain C7). *J. Bacteriol.* **172**: 4231-4237.

Chauvaux, S. 1996. CcpA ad HPr(ser-P): mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **147**: 518-522.

Chen, L., M. Y. Liu, J. LeGall, P. Fareleira, H. Santos and A. V. Xavier. 1993a. Purification and characterization of an NADH-rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by *Desulfovibrio gigas*. *Eur. J. Biochem.* **216**: 443-448.

Chen, L., M. Y. Liu, J. LeGall, P. Fareleira, H. Santos and A. V. Xavier. 1993b. Rubredoxin oxidase, a new flavo-hemo-protein, is the site of oxygen reduction to water by the 'strict anaerobe' *Desulfovibrio gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 100-105.

Chung, J. D., G. Stephanopoulos, K. Ireton and A. D. Grossman. 1994. Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* **176**: 1977-1984.

Cook, G. M., P. H. Janssen and H. W. Morgan. 1993a. Simultaneous uptake and utilisation of glucose and xylose by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**: 55-62.

Cook, G. M., P. H. Janssen and H. W. Morgan. 1993b. Uncoupler-resistant glucose uptake by the thermophilic anaerobe *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (*Clostridium thermohydrosulfuricum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2984-2990.

Cook, G. M. and H. W. Morgan. 1994. Hyperbolic growth of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) increases ethanol production in pH-controlled batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 84-89.

Craig, E. A., B. D. Gambill and R. J. Nebon. 1993. Heat-shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 402-414.

Creuzet, N., J. F. Berenger and C. Frixon. 1983. Characterization of exoglucanase and synergistic hydrolysis of cellulose in *Clostridium stercorarium*. *Microbiol. Lett.* **20**: 347-350.

## D.

Davison, S. P., J. D. Santangelo, S. J. Reid and D. R. Woods. 1995. A *Clostridium acetobutylicum* regulator gene (*regA*) affecting amylase production in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **141**: 989-996.

Day, M. W., B. T. Hsu, L. Joshua-Tor, J. B. Park, Z. H. Zhou, M. W. W. Adams and D. C. Rees. 1992. X-Ray crystal structures of the oxidized and reduced forms of the rubredoxin from the marine hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Protein Science* **1**: 1494-1507.

Decker, K. and S. Pfitzer. 1972. Determination of steady-state concentration of adenine nucleotides in growing *Clostridium kluyveri* cells by biosynthetic labeling. *Anal. Biochem.* **50**: 529-539.

deHaseth, P. L., M. L. Zupancic and M. T. Record, Jr. 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **180**: 3019-3025.

Deuerling, E., B. Paeslack and W. Schumann. 1995. The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. *J. Bacteriol.* **177**: 4105-4112.

Deutscher, J., E. Küster, U. Bergstedt, V. Charrier and W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049-1053.

Diederich, B., J. F. Wilkinson, T. Magnin, S. M. A. Najafi, J. Errington and M. D. Yudkin. 1994. Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor  $\sigma^F$  of *Bacillus subtilis*. *Gene Develop.* **8**: 2653-2663.



Doi, R. H., M. Goldstein, S. Hashida, J. S. Park and M. Takagi. 1994. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 87-93.

Doremus, M. G., J. C. Linden and A. R. Moreira. 1985. Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 852-860.

Dufour, A. and W. G. Haldenwang. 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti- $\sigma$  factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* **176**: 1813-1820.

Duncan, L., S. Alper, F. Arigoni, R. Losick and P. Stragier. 1995. Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science* **270**: 641-644.

Duncan, L., S. Alper and R. Losick. 1996. SpoIIAA governs the release of the cell-specific transcription factor  $\sigma^F$  from its anti-sigma factor SpoIIAB. *J. Mol Biol.* **260**: 147-164.

Duncan, L. and R. Losick. 1993. SpoIIAB is an anti- $\sigma$  factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein from  $\sigma^F$ *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2325-2329.

## E.

Egeter, O. and R. Brückner. 1996. Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* **21**: 739-749.

Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 1-33.

## F.

Faure, E., C. Bagnara, A. Belaich and J. P. Belaich. 1988. Cloning and expression of two cellulase genes of *Clostridium cellulolyticum* in *Escherichia coli*. *Gene* **65**: 51-58.

Faure, E., A. Bélaich, C. Bagnara, C. Gaudin and J. P. Bélaich. 1989. Sequence analysis of the *Clostridium cellulolyticum* endoglucanase-A-encoding gene, *celCCA*. *Gene* **84**: 39-46.

Feucht, A., T. Magnin, M. D. Yudkin and J. Errington. 1996. Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Gene Develop.* **10**: 794-803.

Flårdh, K., T. Axberg, N. H. Albertson and S. Kjelleberg. 1994. Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence and deletion of the *rel A* gene. *J. Bacteriol.* **176**: 5949-5957.

Freier, D., C. P. Mothershed and J. Wiegel. 1988. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 204-211.

Frey, M., L. Sieker, F. Payan, R. Haser, M. Bruschi, G. Pepe and J. LeGall. 1987. Rubredoxin from *Desulfovibrio gigas*. A molecular model of the oxidized form at 1.4 Å resolution. *J. Mol Biol.* **197**: 525-541.

Fujino, T., P. Béguin and J. P. Aubert. 1993. Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possible involved in the attachment of the cellulosome to the cell surface. *J. Bacteriol.* **175**: 1891-1899.

Fujita, Y., Y. M Iwa, A. Galinier and J. Deutscher. 1995. Specific recognition of the *Bacillus subtilis* *gnt cis*-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.* **17**: 953-960.



## G.

- Gal, L., C. Gaudin, A. Bélaich, S. Pagès, C. Tardif and J. P. Bélaich. 1997. CelG from *Clostridium cellulolyticum* : a multidomain endoglucanase acting efficiently on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* **179**: 6595-6601.
- Gaur, N. K., K. Cabane and I. Smith. 1988. Structure and expression of the *Bacillus subtilis* *sin* operon. *J. Bacteriol.* **170**: 1046-1053.
- Gehin, A., E. Gelhaye and H. Petitdemange. 1996. Adhesion of *Clostridium cellulolyticum* spores to filter paper. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 187-190.
- Gehin, A., E. Gelhaye, G. Raval and H. Petitdemange. 1995. *Clostridium cellulolyticum* viability and sporulation under cellobiose starvation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 868-871.
- Geissdörfer, W., S. C. Frosch, G. Haspel, S. Ehrt and W. Hillen. 1995. Two genes encoding proteins with similarities to rubredoxin and rubredoxin reductase are required for conversion of dodecane to lauric acid in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *Microbiology* **141**: 1425-1432.
- Gelhaye, E. 1993. Etude de l'adhésion et de la colonisation de la cellulose par les *Clostridia* cellulolytiques mésophiles. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Nancy I.
- Gelhaye, E., B. Claude, C. Cailliez, C. Burle and H. Petitdemange. 1992. Multilayer adhesion to filter paper of two mesophilic cellulolytic clostridia. *Cur. Microbiol* **25**: 307-311.
- Gelhaye, E., A. Gehin and H. Petitdemange. 1993a. Colonization of crystalline cellulose by *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3154-3156.
- Gelhaye, E., H. Petitdemange and R. Gay. 1993b. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* **175**: 3452-3458.
- Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguen, D. B. Jensen and M. Cashel. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma$ S is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**: 7982-7989.
- Gérard, P., J. Amine, R. G and H. Petitdemange. 1999. Distribution of the rubredoxin gene among the *Clostridium butyricum* species. *Curr. Microbiol* **38**: 264-267.
- Germain, P., F. Toukourou and L. Donaduzzi. 1986. Ethanol production by anaerobic thermophilic bacteria: regulation of lactate deshydrogenase activity in *Clostridium thermohydrosulfuricus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 300-305.
- Giallo, J. 1984. Etude physiologique d'une bactérie cellulolytique mésophile anaérobie: *C. cellulolyticum* ATCC 35319. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université d'Aix-Marseille I.
- Giallo, J., C. Gaudin, J. P. Bélaich, E. Petitdemange and F. Caillet-Mangin. 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 843-849.
- Gilkes, N. R., D. G. Kilburn, M. L. Langsford, R. C. Miller, Jr, W. W. Wakarchuk, R. A. J. Warren, D. J. Whittle and W. W. K. R. 1984. Isolation and characterization of *Escherichia coli* clones expressing cellulases genes from *Cellulomonas fimi*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1377-1384.
- Girbal, L., C. Croux, I. Vasconcelos and P. Soucaille. 1995a. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 287-297.
- Girbal, L. and P. Soucaille. 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J. Bacteriol.* **176**: 6433-6438.
- Girbal, L. and P. Soucaille. 1998. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol.* **16**: 11-16.



- Girbal, L., I. Vasconcelos, S. Saint-Amans and P. Soucaille. 1995b. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 151-162.
- Gomes, C. M., G. Silva, S. Oliveira, J. LeGall, M. Y. Liu, A. V. Xavier, C. Rodrigues-Pousadas and M. Teixeira. 1997. Studies on the redox centers of the terminal oxidase from *Desulfovibrio gigas* and evidence for its interaction with rubredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**: 22502-22508.
- Gösseringer, R., E. Küster, A. Galinier, J. Deutscher and W. Hillen. 1997. Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite-control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J. Mol. Biol.* **266**: 665-676.
- Graves, M. C. and J. C. Rabinowitz. 1986. *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene: evidence for 'extended' promoter elements in Gram-positive organisms. *J. Biol. Chem.* **261**: 11409-11415.
- Groat, R. G., J. E. Schultz, E. Zychlinsky, A. Bockman and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* **168**: 486-493.
- Groleau, D. and C. W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Biochem.* **27**: 517-530.
- Gross, C. A. 1996. Function and regulation of the heat-shock protein. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D C.
- Grossman, A. D. 1991. Integration of developmental signals and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **65**: 5-8.
- Grossman, A. D. 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 477-508.
- Grossman, A. D. and R. Losick. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4369-4373.
- Grundy, F. J., D. A. Waters, S. H. G. Allen and T. M. Henkin. 1993. Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol.* **175**: 7348-7355.
- Grupe, H. and G. Gottschalk. 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3896-3902.
- Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux and H. Petitdemange. 1999. Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J. Bacteriol.* **181**: 3262-3269.

## H.

- Haldenwang, W. G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**: 1-30.
- Harder, W. and L. Dijkhuizen. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 1-23.
- Hatchikian, E. C. 1979. Isolation and characterization of a rubredoxin and two ferredoxins from *Desulfovibrio africanus*. *Biochim. Biophys. Acta* **548**: 471-483.
- Hecker, M., W. Schumann and U. Völker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 417-428.
- Hecker, M. and U. Völker. 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma^B$  regulon. *Mol. Microbiol.* **29**: 1129-1136.



**Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 839-872.

**Hengge-Aronis, R.** 1993. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell* **72**: 165-168.

**Hengge-Aronis, R.** 1996. Back to log phase:  $\sigma^S$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 887-893.

**Hengge-Aronis, R.** 1996. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D C.

**Henkin, T. M.** 1996. The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 9-15.

**Henkin, T. M., F. J. Grundy, W. L. Nicholson and G. H. Chambliss.** 1991. Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**: 575-584.

**Hernandez, P. E.** 1982. Transport of D-glucose in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**: 469-477.

**Hickey, C. S. and M. G. Johnson.** 1981. Effects of pH shifts, bile salts and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 124-129.

**Hsu, E. J. and Z. J. Ordal.** 1969. Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restricted growth. *J. Bacteriol.* **97**: 1511-1512.

**Hueck, C. J., A. Kraus, D. Schmiedel and W. Hillen.** 1995. Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Mol. Microbiol.* **16**: 855-864.

**Hughes, K. T. and K. Mathee.** 1998. The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 231-86.

**Hüsemann, M. H. W. and E. T. Papoutsakis.** 1989. Comparison between *in vivo* and *in vitro* enzyme activities in continuous and batch culture fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 585-595.

## I.

**Igo, M., M. Lampe, C. Ray, W. Shafer, C. P. Moran, Jr and R. Losick.** 1987. Genetic studies of a secondary RNA polymerase sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3464-3469.

**Ireton, K. and A. D. Grossman.** 1992. Coupling between gene expression and DNA synthesis early during development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8808-8812.

**Ireton, K., D. Z. Rudner, K. J. Siranosian and A. D. Grossman.** 1993. Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the *spoOA* transcription factor. *Gene Develop.* **7**: 283-294.

## J.

**Jeager, J. A., D. H. Turner and M. Zucker.** 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7706-7710.

**Jenkins, D. E., E. A. Tauger and A. Matin.** 1991. Role of RpoH, a heat-shock regulator protein, in *E. coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* **173**: 1992-1996.

Jones, D. T. and D. R. Woods. 1989. Solvent production. In N. P. Minton and D. J. Clarke (ed.), *Clostridia*. Plenum Press, New-York.

Jungermann, K., R. K. Thauer, G. Leimenstoll and K. Decker. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim. Biophys. Acta* **305**: 268-280.

## K.

Kalman, S. S., M. L. Duncan, S. M. Thomas and C. W. Price. 1990. Similar organization of *sigB* and *spolIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **172**: 5575-5585.

Kang, C. M., M. S. Brody, S. Akbar, X. Yang and C. W. Price. 1996. Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor  $\sigma^B$  in response to environmental stress. *J. Bacteriol.* **178**: 3846-3853.

Karmazyn-Campelli, C., C. Bonamy, B. Savelli and P. Straigier. 1989. Tandem genes encoding  $\sigma$ -factors for consecutive steps of development in *Bacillus subtilis*. *Genes develop.* **3**: 150-157.

Kellner, E. M., A. Decatur and C. P. Moran. 1996. Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation. *Mol. Microbiol.* **21**: 913-924.

Kjelleberg, S., M. Hermansson, P. Marden and G. W. Jones. 1987. The transient phase between growth and non growth of heterotrophic bacteria with emphasis on the marine environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 25-49.

Knight, E., Jr and R. W. F. Hardy. 1966. Isolation and characteristics of flavodoxin from nitrogen-fixing *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* **241**: 2752-2756.

Koch, A. L. 1997. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Mol. Biol. Rev.* **61**: 305-318.

Kok, M., R. Oldenhuis, M. P. G. Van Der Linden, C. H. C. Meulenberg, J. Kingma and B. Witholt. 1989. The *Pseudomonas oleovorans alk BAC* operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**: 5442-5451.

Kovacs, T., A. Hargitai and I. Mecs. 1998. pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigma B in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 323-328.

Krüger, E., U. Völker and M. Hecker. 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* **176**: 3360-3367.

## L.

La Farge, B. 1995. Le biogaz. Procédés de fermentation méthanique. Masson, Paris, Milan, Barcelone.

Labbé, R. G. and L. L. Nolin. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. *Infect. Immun.* **34**: 50-54.

Lamed, R., J. H. Lobos and T. M. Su. 1988. Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1216-1221.

Lamed, R., E. Morag, O. Mor-Yosef and E. A. Bayer. 1991. Cellulosome-like entities in *Bacteroides cellulosolvens*. *Curr. Microbiol.* **22**: 27-33.

Lamed, R. and J. G. Zeikus. 1980. Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J. Bacteriol.* **144**: 569-578.



- Lamed, R. and J. G. Zeikus. 1981. Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochem. J.* **195**: 183-190.
- Lange, R., D. Fischer and R. Hengge-Aronis. 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **17**: 4676-4680.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis. 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis. 1994. The cellular concentration of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Gene Develop.* **8**: 1600-1612.
- Lee, W. Y., D. C. Brune, R. LoBrutto and R. E. Blankenship. 1995. Isolation, characterization, and primary structure of rubredoxin from the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**: 80-88.
- LeGall, J., M. Y. Liu, C. M. Gomes, V. Braga, I. Pacheco, M. Regalla, A. V. Xavier and M. Teixeira. 1998. Characterisation of a new rubredoxin isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* 27774: definition of a new family of rubredoxins. *FEBS Lett.* **429**: 295-298.
- Leibovitz, E. and P. Béguin. 1996. A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. *J. Bacteriol.* **178**: 3077-3084.
- Leibovitz, E., H. Ohayon, P. Gounon and P. Béguin. 1997. Characterization and subcellular localization of the *Clostridium thermocellum* scaffolding dockerin binding protein SdbA. *J. Bacteriol.* **179**: 2519-2523.
- Lemaire, M., H. Ohayon, P. Gounon, T. Fujino and P. Béguin. 1995. OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domain to components of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **177**: 2451-2459.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 399-426.
- Leschine, S. B. and E. Canale-Parola. 1983. Mesophilic cellulolytic clostridia from freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 728-737.
- Lewis, P. J., L. J. Wu and J. Errington. 1998. Establishment of prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis*: localisation of SpoIIE phosphatase and initiation of compartment-specific proteolysis. *J. Bacteriol.* **180**: 3276-3284.
- Lin, E. C. 1986. Glycerol facilitator in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **125**: 467-473.
- Lindquist, S. and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- Loewen, P. C., I. Von Ossowski, J. Switala and M. R. Mulvey. 1993. KatF( $\sigma^S$ ) synthesis in *Escherichia coli* is subject to post-transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **175**: 2150-2153.
- Lokman, B. C., M. Heerikhuisen, R. J. Leer, A. van den Broek, Y. Borsboom, S. Chaillou, P. W. Postma and P. H. Pouwels. 1997. Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon. *J. Bacteriol.* **179**: 5391-7.
- Long, S., D. T. Jones and D. R. Woods. 1984a. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 256-261.
- Long, S., D. T. Jones and D. R. Woods. 1984b. The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Biotechnol. Lett.* **6**: 529-534.
- Losick, R. 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 625-669.



Lovenberg, W. and B. E. Sobel. 1965. Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **54**: 193-199.

Lovitt, R. W., G. J. Shen and J. G. Zeikus. 1988. Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J. Bacteriol. **170**: 2809-2815.

Luesink, E., R. Van Herpen, B. Grossiord, O. Kuipers and W. de Vos. 1998. Transcriptional activation of the glycolytic *lac* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. Mol. Microbiol. **30**: 789-798.

Lumppio, H. L., N. V. Shenvi, R. P. Garg, A. O. Summers and D. M. Kurtz, Jr. 1997. A rubrerythrin operon and nigerythrin gene in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). J. Bacteriol. **179**: 4607-4615.

## M.

MacKenzie, C. R., B. D and G. P. Patel. 1985. Studies of cellulose hydrolysis by *Acetivibrio cellulolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 243-248.

Madarro, A., J. L. Perra, J. L. Lequerica, S. Valles, R. Gay and A. Flors. 1991. Partial purification and characterization of the cellulases from *Clostridium cellulolyticum* H10. J. Chem. Technol. Biotechnol. **52**: 393-406.

Maganasik, B. and F. C. Neidhardt. 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Maganasik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington.

Magnin, T., M. Lord, J. Errington and M. D. Yudkin. 1996. Establishing differential gene expression in sporulating *Bacillus subtilis*: phosphorylation of SpoIIAA (anti-anti  $\sigma^F$ ) alters its conformation and prevents formation of a SpoIIAA/SpoIIAB/ADP complex. Mol. Microbiol. **19**: 901-907.

Magnin, T., M. Lord and M. D. Yudkin. 1997. Contribution of partner switching and SpoIIAA cycling to regulation of sigma F activity in sporulating *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **179**: 3922-3927.

Mandic-Mulec, I., N. K. Gaur, U. Bai and I. Smith. 1992. Sin, a stage-specific repressor of cellular differentiation. J. Bacteriol. **174**: 3561-3569.

Marczak, R., J. Ballongue, H. Petitdemange and R. Gay. 1985. Differential levels of ferredoxin and rubredoxin in *Clostridium acetobutylicum*. Biochimie **67**: 241-248.

Mathieu, I., J. Meyer and J. M. Moulis. 1992. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the rubredoxin gene from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. J. **285**: 255-262.

Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *E. coli*. Mol. Microbiol. **5**: 3-10.

Matta-El-Ammouri, G., R. Janati-Idrissi, A. M. Junelles, H. Petitdemange and R. Gay. 1987. Effects of butyric and acetic acids on acetone-butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. Biochimie **69**: 109-115.

Mayer, F., M. P. Coughlan, Y. Mori and L. G. Ljungdahl. 1987. Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2785-2792.

McCann, M. P., C. D. Fraley and A. Matin. 1993. The putative  $\sigma$  factor KatF is regulated posttranscriptionally during starvation. J. Bacteriol. **175**: 2143-2149.



- McCann, M. P., J. P. Kidwell and A. Matin. 1991. The putative sigma factor katF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4188-4194.
- Meinke, A., N. R. Gilkes, E. Kwan, D. G. Kilburn, R. A. Warren and R. C. Miller, Jr. 1994. Cellobiohydrolase A (CbhA) from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi* is a beta-1,4-exocellobiohydrolase analogous to *Trichoderma reesei* CBH II. *Molec. Microbiol.* **12**: 413-422.
- Meyer, C. L. and E. T. Papoutsakis. 1989a. Continuous cultures and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*, part I: ATP supply and demand determine product selectivity. *Bioproc. Eng.* **4**: 1-10.
- Meyer, C. L. and E. T. Papoutsakis. 1989b. Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 450-459.
- Meyer, T. E., J. J. Sharp and R. G. Bartsch. 1971. Isolation and properties of rubredoxin from the photosynthetic green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **234**: 266-269.
- Min, K. T., C. M. Hilditch, B. Diederich, J. Errington and M. D. Yudkin. 1993.  $\sigma^F$ , the first compartment-specific transcription factor of *Bacillus subtilis* is regulated by an anti- $\sigma$  factor that is also a protein kinase. *Cell* **74**: 735-742.
- Miquel, G. 1999. Les nouvelles techniques de recyclage et de valorisation des déchets ménagers et des déchets industriels banals. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, rapport n°415.
- Mitchell, W. J. 1996. Carbohydrate uptake and utilization by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Anaerobe* **2**: 379-384.
- Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microbiol. Physiol.* **39**: 31-130.
- Mitchell, W. J., K. A. Albasheri and M. Yazdani. 1995. Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 317-329.
- Monedero, V., M. Gosalbes and G. Perez-Martinez. 1997. Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J. Bacteriol.* **179**: 6657-6664.
- Monot, F., J. M. Engasser and H. Petitdemange. 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 422-426.
- Morag, E., E. A. Bayer and R. Lamed. 1990. Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. *J. Bacteriol.* **172**: 6098-6105.
- Morange, M. 1993. Les molécules chaperons. *La Recherche* **24**: 123-128.
- Morita, R. Y. 1988. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.* **34**: 436-441.
- Mortenson, L. E. 1964. Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* **81**: 71-77.
- Morvan, B., F. Rieu-Lesme, G. Fonty and P. Gouet. 1996. *In vitro* interactions between rumen H<sub>2</sub>-producing cellulolytic microorganisms and H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate reducing bacteria. *Anaerobe* **2**: 175-180.
- Mueller, J. P. and A. L. Sonenshein. 1992. Role of the *Bacillus subtilis* *gsiA* gene in regulation of early sporulation gene expression. *J. Bacteriol.* **174**: 4374-4383.



Muffler, A., M. Barth, C. Marschall and R. Hengge-Aronis. 1997. Heat-shock regulation of  $\sigma^S$  turn-over: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma^S$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 445-452.

Muffler, A., D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz and R. Hengge-Aronis. 1996a. The response regulator RssB controls stability of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 1333-1339.

Muffler, A., D. Fischer and R. Hengge-Aronis. 1996b. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage QJ RNA replication, is essential for the translational regulation of *rpoS* in *Escherichia coli*. *Gene Develop.* **10**: 1143-1151.

Murray, W. D. and A. W. Khan. 1983. Ethanol production by a newly isolated anaerobe *Clostridium saccharolyticum*: effects of culture medium and growth conditions. *Can. J. Microbiol.* **29**: 342-347.

## N.

Najafi, S. M. A., D. A. Harris and M. D. Yudkin. 1997. Properties of the phosphorylation reaction catalysed by SpoIIAB that helps to regulate sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**: 5628-5631.

Najafi, S. M. A., A. C. Willis and M. D. Yudkin. 1995. Site of phosphorylation of SpoIIAA, the anti-anti-sigma factor for sporulation-specific  $\sigma^F$  of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 2912-2913.

Nakahigashi, K., M. Kanemori, M. Morita, H. Yanagi and T. Yura. 1998. Conserved function and regulation of  $\sigma^{32}$  homologues in Gram-negative bacteria. *J. Biosci.* **23**: 407-414.

Narberhaus, F. and H. Bahl. 1992. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**: 3282-3289.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter. 1994. La régulation de l'expression des gènes: systèmes multigéniques et régulation globale. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham and M. Schaechter (ed.), *Physiologie de la cellule bactérienne, une approche moléculaire*. Masson, Paris.

Ng, T. and J. G. Zeikus. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* **150**: 1391-1399.

Ng, T. K., P. J. Weimer and J. G. Zeikus. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* **114**: 1-7.

Nyström, T., R. M. Olsson and S. Kjelleberg. 1992. Survival, stress resistance and alterations in protein expression in the marine *Vibrio* sp. S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 55-65.

## O.

Ohlsen, K. L., J. K. Grimsley and J. A. Hoch. 1994. Deactivation of the sporulation transcription factor SpoOA by the SpoOE protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1756-1760.

O'Sullivan, A. C. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* **4**: 173-207.

## P.

Pagès, S., A. Bélaich, H. P. Fierobe, C. Tardif, C. Gaudin and J. P. Bélaich. 1999. Sequence analysis of scaffolding protein CipC and ORFXp, a new cohesin-containing protein in *Clostridium cellulolyticum*: comparison of various cohesin domains and subcellular localization of ORFXp. *J. Bacteriol.* **181**: 1801-1810.



- Pagès, S., A. Bélaich, C. Tardif, C. Reverbel-Leroy, C. Gaudin and J. P. Bélaich. 1996. Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein CipC of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *J. Bacteriol.* **178**: 2279-2286.
- Pagès, S., L. Gal, A. Bélaich, C. Gaudin, C. Tardif and J. P. Bélaich. 1997. Role of scaffolding protein CipC of *Clostridium cellulolyticum* in cellulose degradation. *J. Bacteriol.* **179**: 2810-2816.
- Palmer, G. and J. Reedijk. 1991. Nomenclature of electron-transfer proteins. *Eur. J. Biochem.* **200**: 599-611.
- Papoutsakis, E. T. 1984. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 174-187.
- Payot, S., E. Guedon, C. Cailliez, E. Gelhaye and H. Petitdemange. 1998. Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth. *Microbiology* **144**: 375-384.
- Payot, S., E. Guedon, E. Gelhaye and H. Petitdemange. Induction of lactate production associated with a decrease in NADH cell content enables growth resumption of *Clostridium cellulolyticum* in batch cultures on cellobiose. *Res. Microbiol.*
- Perego, M. 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8612-8617.
- Perego, M. 1998. Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol.* **6**: 366-370.
- Perego, M., C. Hanstein, K. M. Welsh, T. Djavakhishvili, P. Glasser and J. A. Hoch. 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *Bacillus subtilis*. *Cell* **79**: 1047-1055.
- Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher and J. A. Hoch. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**: 173-185.
- Perego, M. and J. Hoch. 1991. Negative regulation of *Bacillus subtilis* sporulation by the *spoOE* gene product. *J. Bacteriol.* **173**: 2514-2520.
- Perego, M. and J. A. Hoch. 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1549-1553.
- Petersohn, A., H. Antelmann, U. Gerth and M. Hecker. 1999. Identification and transcriptional analysis of new members of the sigma B regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145**: 869-880.
- Peterson, J. A., M. Kusunose, E. Kusunose and M. J. Coon. 1968. Enzymatic  $\omega$ -oxidation. III. Purification and properties of rubredoxin, a component of the  $\omega$ -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* **243**: 329-334.
- Petitdemange, E., F. Caillet, J. Giallo and C. Gaudin. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov. a cellulolytic mesophilic species from decayed grass. *Int. J. Syst. Bact.* **34**: 155-159.
- Petitdemange, H., C. Cherrier, G. Raval and R. Gay. 1976. Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in *Clostridia* of the butyric group. *Biochim. Biophys. Acta* **421**: 334-347.
- Pianzola, M. J., M. Soues and D. Touati. 1996. Overproduction of the *rbo* gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6736-6742.
- Pich, A., F. Narberhaus and H. Bahl. 1990. Induction of heat shock proteins during solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 697-704.
- Piggot, P. J. 1996. Spore development in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 531-537.



Postma, P. W., J. W. Lengeler and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.

Pratt, L. A. and T. J. Silhavy. 1996. The response regulator, SprE, controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2488-2492.

Predich, M., G. Nair and I. Smith. 1992. *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spoOF* and *spoOA* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H. *J. Bacteriol.* **174**: 2771-2778.

## Q.

Quesnel, F. 1982. Le gaz des ordures ménagères. *Biofutur* **7**: 41-42.

## R.

Ragsdale, S. W. and L. G. Ljungdahl. 1984. Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents. *J. Bacteriol.* **157**: 1-6.

Ragsdale, S. W., L. G. Ljungdahl and D. V. DerVartanian. 1983. Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodi* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. *J. Bacteriol.* **155**: 1224-1237.

Rao, G. and R. Mutharasan. 1987. Altered electron flow in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum* induced by viologen dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1232-1235.

Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivolta, R. Rabus, J. Stuelke, D. Karamata, M. H. Saier, Jr and W. Hillen. 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* **27**: 1157-1169.

Reverbel-Leroy, C., A. Bélaich, A. Bernadac, C. Gaudin, J. P. Bélaich and C. Tardif. 1996. Molecular study and overexpression of the *Clostridium cellulolyticum celF* cellulase gene in *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**: 1013-1023.

Reysenbach, A. L., N. Ravenscroft, S. Long, D. T. Jones and D. R. Woods. 1986. Characterization, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 185-190.

Rhaese, H. J. and R. Groscurth. 1974. Studies on the control of development. *In vitro* synthesis of HPN and MS nucleotides by ribosome from either sporulating or vegetative cells of *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* **44**: 87-93.

Riethdorf, S., U. Völker, U. Gerth, A. Winkler, S. Engelmann and M. Hecker. 1994. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus subtilis lon* gene. *J. Bacteriol.* **176**: 6518-6527.

Robson, R. L., R. M. Robson and J. G. Morris. 1974. The biosynthesis of granulose by *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. J.* **144**: 503-511.

Rogers, P. 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Adv. appl. Microbiol.* **31**: 1-60.

Rogers, P. and G. Gottschalk. 1993. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in clostridia. In D. R. Woods (ed.), *The Clostridia and Biotechnology*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA.

Roper, G., J. A. Short and P. D. Walker. 1977. The ultrastructure of *Clostridium perfringens* spores. In A. N. Barker, J. Wolf, D. J. Ellar, G. J. Dring and G. W. Gould (ed.), *Spore research*. Academic Press, New-York.

Rouault, T. A. and R. D. Klausner. 1996. Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biotechnol.* **21**: 174-177.



Rudner, D. Z., J. R. Ladeaux, K. Breton and A. D. Grossman. 1991. The *spoOK* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* **173**:

Rungeling, E., T. Laufen and H. Bahl. 1999. Functional characterisation of the chaperones DnaK, DnaJ, and GrpE from *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 119-23.

Russell, J. B. 1990. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3304-3307.

Russell, J. B., D. R. Bond and G. M. Cook. 1996. The fructose diphosphate / phosphate regulation of carbohydrate metabolism in low G+C Gram-positive anaerobes. *Res. Microbiol.* **147**: 528-535.

## S.

Sacks, L. E. and P. A. Thompson. 1977. Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 189-193.

Saeki, K., M. K. Jain, G. J. Shen, R. C. Prince and J. G. Zeikus. 1989a. Purification and properties of ferredoxin and rubredoxin from *Butyrubacterium methylotrophicum*. *J. Bacteriol.* **171**: 4736-4741.

Saeki, K., Y. Yao, S. Wakabayashi, G. J. Shen, J. G. Zeikus and H. Matsubara. 1989b. Ferredoxin and rubredoxin from *Butyrubacterium methylotrophicum*: complete primary structures and construction of phylogenetic trees. *J. Biochem.* **106**: 656-662.

Saier, M. H., Jr. 1989. Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolic repression by the bacterial phosphoenol-pyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* **53**: 109-120.

Saier, M. H., Jr. 1991. Mechanisms of carbohydrate transport in bacteria and comparisons with those in eukaryotes. *In* P. L. Yeagle (ed.), *The structure of biological Membranes*. CRC Press, Boca Raton.

Saier, M. H., Jr. 1996. Regulation of carbon metabolism in bacteria. *Res. Microbiol.* **147**: 439-587.

Saier, M. H., Jr, S. Chauvaux, G. M. Cook, J. Deutscher, I. T. Paulsen, J. Reizer and J. J. Ye. 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **142**: 217-230.

Saier, M. H., Jr, S. Chauvaux, J. Deutscher, J. Reizer and J. J. Ye. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 267-271.

Santangelo, J. D., A. Kuhn, A. Treuner-Lange and P. Dürre. 1998. Sporulation and time course expression of sigma-factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 157-164.

Sauer, U., J. D. Santangelo, A. Treuner, M. Buchholz and P. Dürre. 1995. Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 331-340.

Sauer, U., A. Treuner, M. Buchholz, J. D. Santangelo and P. Dürre. 1994. Sporulation and primary sigma factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6572-6582.

Saxena, S., H. P. Fierobe, C. Gaudin, F. Guerlesquin and J. P. Bélaich. 1995. Biochemical properties of a  $\beta$ -xylosidase from *Clostridium cellulolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3509-3512.

Schultz, J. E., G. I. Latter and A. Matin. 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3903-3909.

Schweder, T., K. H. Lee, O. Lomovskaya and A. Matin. 1996. Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor ( $\sigma^S$ ) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* **178**: 470-476.



- Scott, J. M. and W. G. Haldenwang. 1999. Ogb, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor  $\sigma^B$ . *J. Bacteriol.* **181**: 4653-4660.
- Segal, G. and E. Z. Ron. 1998. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Ann. NY Acad. Sci.* **30**: 147-51.
- Seki, Y., A. Ikeda and M. Ishimoto. 1988. Rubredoxin as an intermediary electron carrier for nitrate reduction by NAD(P)H in *Clostridium perfringens*. *J. Biochem.* **103**: 583-584.
- Shih, N. J. and R. G. Labbé. 1994. Effect of glucose on sporulation and extracellular amylase production by *Clostridium perfringens* Type A in a defined medium. *Curr. Microbiol.* **29**: 163-169.
- Shih, N. J. and R. G. Labbé. 1996. Sporulation-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1441-1443.
- Shima, S., Y. Igarashi and T. Kodama. 1991. Nucleotide sequence analysis of the endoglucanase-encoding gene, *celCCD*, of *Clostridium cellulolyticum*. *Gene* **104**: 33-38.
- Shimizu, F., M. Ogata, T. Yagi, S. Wakabayashi and H. Matsubara. 1989. Amino acid sequence and function of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki. *Biochimie* **71**: 1171-1177.
- Shoseyov, O. and R. H. Doi. 1990. Essential 170-kDa subunit for degradation of cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2192-2195.
- Siegele, D. A. and R. Kolter. 1992. Life after log. *J. Bacteriol.* **174**: 45-348.
- Singleton, P. 1999. *Bactériologie*. Dunod, Paris.
- Spira, B., N. Silberstein and E. Yagil. 1995. Guanosine 3'-5'-Bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol.* **177**: 4053-4058.
- Srinivasan, S. and S. Kjelleberg. 1998. Cycles of famine and feast: starvation and outgrowth strategies of a marine *Vibrio*. *J. Biosci.* **23**: 501-511.
- Steinmetz, M. A. and U. Fischer. 1981. Cytochromes of the non-thiosulfate-utilizing green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Arch. Microbiol.* **130**: 31-37.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa and A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
- Stragier, P. and R. Losick. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 297-341.
- Strasidine, G. A. 1972. The role of intracellular glucan in endogeneous fermentation and spore maturation in *Clostridium botulinum* type E. *Can. J. Microbiol.* **18**: 211-217.
- Strauch, M. A. 1993. Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponential growth to stationary phase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **46**: 121-153.
- Strauch, M. A., K. A. Trach and J. A. Hoch. 1992. SpoOA activates and represses its own synthesis by binding at its dual promoters. *Biochimie* **74**: 619-626.
- Strobel, H. J. 1995. Growth of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum* in continuous culture. *Curr. Microbiol.* **31**: 210-214.
- Strobel, H. J., F. C. Caldwell and K. A. Dawson. 1995. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4012-4015.
- Sun, D., P. Fajardo-Cavazos, M. D. Sussman, F. Tovar-Rojo, R. M. Cabrera-Martinez and P. Setlow. 1991. Effect of the chromosome location of *Bacillus subtilis* forespore genes on their *spo* gene dependence and transcription by  $E\sigma^F$ : identification of features of good  $E\sigma^F$ -dependent promoters. *J. Bacteriol.* **173**: 7867-7874.
- Svitil, A. L., M. Cashel and J. W. Zyskind. 1993. Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **268**: 2307-2311.



## T.

- Tamaru, Y. and R. H. Doi.** 1999. Three surface layer homology domains at the N terminus of the *Clostridium cellulovorans* major cellulosomal subunit EngE. *J. Bacteriol.* **181**: 3270-3276.
- Teeri, T. T., M. Pentillä, S. Keränen, H. Nevalainen and J. K. C. Knowles.** 1991. *In* D. B. Finkelstein and C. Ball (ed.), *Biotechnology of filamentous fungi*. Butterworth-Heinemann, London.
- Terraciano, J. S. and E. R. Kashket.** 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 86-91.
- Terraciano, J. S., E. Rapaport and E. R. Kashket.** 1988. Stress- and growth phase-associated proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1989-1995.
- Thurston, B., K. A. Dawson and H. J. Strobel.** 1993. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2631-2637.
- Tomme, P., A. J. Warren and N. R. Gilkes.** 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**: 1-81.
- Trach, K. A. and J. A. Hoch.** 1989. The *Bacillus subtilis* *spoOB* stage O sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. *J. Bacteriol.* **171**: 1362-1371.
- Truitt, C. L., G. L. Ray, J. E. Trempy, Z. Da-Jian and W. G. Haldenwang.** 1985. Isolation of *Bacillus subtilis* mutants altered in expression of a gene transcribed *in vitro* by a minor form of RNA polymerase ( $E-\sigma^{37}$ ). *J. Bacteriol.* **161**: 515-522.
- Turunen, M., E. Parkkinen, J. Londesborough and M. Korhola.** 1987. Distinct forms of lactate dehydrogenase purified from ethanol- and lactate-producing cells of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2865-2873.
- Tzeng, Y. L., X. Z. Zhou and J. A. Hoch.** 1998. Phosphorylation of the SpoOB response regulator phosphotransferase of the phosphorelay initiating development in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **273**: 23849-23855.

## U.

- Ueda, T., E. T. Lode and M. J. Coon.** 1972. Enzymatic  $\omega$ -oxidation: isolation of homogeneous reduced diphosphopyridine nucleotide-rubredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **247**: 2109-2116.

## V.

- Vancanneyt, M., P. De Vos, L. Vennens and J. De Ley.** 1990. Lactate and ethanol dehydrogenase activities in continuous cultures of *Clostridium thermosaccharolyticum* LMG 6564. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1945-1951.
- Vasconcelos, I., L. Girbal and P. Soucaille.** 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* **176**: 1443-1450.
- Vidwans, S. J., K. Ireton and A. D. Grossman.** 1995. Possible role for the essential GTP-binding protein Ogb in regulating the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 3308-3311.
- Völker, U., M. Björn and M. Hecker.** 1999. Expression of the  $\sigma^B$ -dependant general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 3942-3948.
- Völker, U., A. Dufour and W. G. Haldenwang.** 1995a. The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of  $\sigma^B$ . *J. Bacteriol.* **177**: 114-122.



Völker, U., H. Mach, R. Schmid and M. Hecker. 1992. Stress protein and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2125-2135.

Völker, U., B. Völker, M. Maul, M. Hecker, A. Dufour and W. G. Haldenwang. 1995b. Separate mechanisms activate of  $\sigma^B$  *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**: 3771-3780.

## W.

Waldburger, C., D. Gonzalez and G. H. Chambliss. 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 6321-6327.

Wang, D. I. C., J. Biocic, H. Y. Fang and J. D. Wang. 1979. Direct microbiological conversion of cellulosic biomass to ethanol. *In* (ed.), Proceedings of the third Annual Biomass Energy Systems Conference. National Technical Information Service, Springfield, VA.

Watenpaugh, K. D., L. C. Sieker and L. H. Jensen. 1980. Crystallographic refinement of rubredoxin at 1.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **138**: 615-633.

Weickert, M. J. and S. Adhya. 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* **267**: 15869-15874.

Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* **79**: 1496-1502.

Weir, J., M. Predich, E. Dubnau, G. Nair and I. Smith. 1991. Regulation of *spoOH*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor. *J. Bacteriol.* **173**: 521-529.

Wendrich, T. M. and M. A. Marahiel. 1997. Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **26**: 65-79.

Wetzstein, M., U. Völker, J. Dedio, S. Löbau, U. Zuber, M. Schiesswohl, C. Herget, M. Hecker and W. Schumann. 1992. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 3300-3310.

Wiegel, J. and M. Dykstra. 1984. *Clostridium thermocellum*: adhesion and sporulation while adhered to cellulose and hemicellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 59-65.

Wise, A. A. and C. W. Price. 1995. Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress sigma B in response to environmental signals. *J. Bacteriol.* **177**: 123-133.

Wolin, M. J. and T. L. Miller. 1988. Microbe-microbe interactions. *In* P. N. Hobson (ed.), The rumen microbial ecosystem. Elsevier Scientific Publication, London.

Wong, J., C. Sass and G. N. Bennett. 1995. Sequence and arrangement of genes encoding sigma factors in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **153**: 89-92.

Wood, T. M., C. A. Wilson and C. S. Stewart. 1982. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochem. J.* **205**: 129-137.

Woodley, K. J. and T. E. Meyer. 1987. The complete amino acid sequence of rubredoxin from the green phototrophic bacterium *Chlorobium thiosulfatophilum* strain PM. *Eur. J. Biochem.* **163**: 161-166.

Woods, D. R. and D. T. Jones. 1986. Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Adv. Microbiol. Physiol.* **28**: 1-64.

Wu, L. J., A. Feucht and J. Errington. 1998. Prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis* is driven by sequestration of SpoIIE phosphatase to the prespore side of the asymmetric septum. *Gene Develop.* **12**: 1371-1380.

## Y.

Yablonsky, M. D., T. Bartley, K. O. Elliston, S. K. Kahrs, Z. P. Shalita and D. E. Eveleigh. 1988. Characterization and cloning of the cellulase complex of *Microbispora bispora*. In J. P. Aubert, P. Béguin and J. Millet (ed.), FEMS Symposium No 43 Biochemistry and Genetics of cellulose degradation. Academic Press, London, New-York.

Yamashino, T., C. Ueguchi and T. Mizuno. 1995. Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. EMBO J. **14**: 594-602.

Yamashita, S., H. Yoshikawa, F. Kawamura, H. Takahashi, T. Yamamoto, Y. Kobayashi and H. Saito. 1986. The effect of *spoO* mutations on the expression of *spoOA*- and *spoOF-lacZ* fusions. Mol. Gen. Genet. **205**: 28-33.

Yang, S. S., L. G. Ljungdahl, D. V. Dervartarian and G. D. Watt. 1980. Isolation and characterization of two rubredoxins from *Clostridium thermoaceticum*. Biochim. Biophys. Acta **590**: 24-33.

Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody and C. W. Price. 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. Gene Develop. **10**: 2265-2275.

Yerushalmi, L., B. Volesky and T. Szczesny. 1985. Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**: 103-107.

Young, M., N. P. Minton and W. L. Staudenbauer. 1989. Recent advances in the genetics of the clostridia. FEMS Microbiol. Rev. **63**: 301-326.

Yuan, G. and S. L. Wong. 1995. Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the  $\sigma^{32}$ -like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). J. Bacteriol. **177**: 5427-5433.

Yura, T., H. Nagai and H. Mori. 1993. Regulation of the heat shock response in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **47**: 321-350.

## Z.

Zeikus, J. G. 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **34**: 423-464.

Zhou, X. Z., Madhusudan, J. M. Whiteley, J. A. Hoch and K. I. Varughese. 1997. Purification and preliminary crystallographic studies on the sporulation response regulatory phosphotransferase protein, SpoOB, from *Bacillus subtilis*. Proteins **27**: 597-600.

Zuber, U. and W. Schumann. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **176**: 1359-1363.

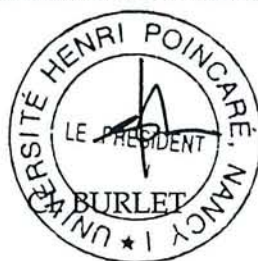
Mademoiselle **PAYOT Sophie**

**DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I**  
en **BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE & CELLULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 15 novembre 1993 n°264

Le Président de l'Université





## RESUME

Des cultures en chémostat de *Clostridium cellulolyticum* ont été mises en œuvre en présence de cellobiose comme source principale de carbone. Sur milieu complexe, le profil de fermentation, orienté majoritairement vers la production d'acétate, conduit à un défaut de régénération du NADH. Il en résulte une accumulation de ce coenzyme réduit qui pourrait limiter la croissance bactérienne en inhibant l'activité glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase. Sur milieu synthétique, la mise en place de régulations particulières (induction de la production de lactate notamment) permet de diminuer le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et d'augmenter la vitesse de consommation de cellobiose. Une induction de la production de lactate est également obtenue lors de cultures en batch de *C. cellulolyticum* sur milieu complexe, à pH régulé avec une concentration de cellobiose élevée. Cette induction permet une reprise de la croissance bactérienne en favorisant la régénération du NADH, doublant ainsi la biomasse bactérienne finale obtenue.

L'étude des conditions de sporulation de *C. cellulolyticum* a permis de montrer que ce processus (i) est dépendant de la vitesse de croissance de la bactérie, (ii) n'est pas déclenché par une carence en cellobiose ou ammonium et (iii) est soumis à une répression catabolique par le cellobiose.

Un gène codant pour une rubrédoxine, protéine fer-soufre qui pourrait servir de transporteur d'électrons, a été mis en évidence chez *C. cellulolyticum*. L'analyse de ce gène et des variations de la teneur des cellules en rubrédoxine a permis (i) de mettre en évidence des signaux caractéristiques de transcription et de traduction, (ii) de réfuter certaines hypothèses concernant le rôle de cette protéine (notamment dans la résistance à certains stress).

### Mots-clé:

*Clostridium cellulolyticum*, chémostat, inhibition de croissance, rapport NADH/NAD<sup>+</sup>, sporulation, carence carbonée, rubrédoxine, stress.