



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
Option : BIOCHIMIE APPLIQUEE



Présentée par Jeannette TCHUNDEN

Sujet : Cellulolyse Anaérobie Mésophile :
Etude de l'amélioration de la production de
cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35 319.

Soutenue publiquement le 8 Mars 1990 devant la Commission d'Examen.

Membres de jury : Président : M. R. GAY, Professeur à l'Université
de Nancy I

Rapporteurs : M. H. PETITDEMANGE, Professeur à
l'Université de Nancy I
M. J.P. VANDECASTEELE, Chef de
Projet à l'Institut Français du
Pétrole (I.F.P.)

Examineurs : M. G. LEFEBVRE, Professeur à
l'I.N.P.L. de Nancy
Mme E. PETITDEMANGE, Maître de
Conférence à l'Université de Nancy

*A Mon Fils Parfait
et à Ma Mère*

en mémoire de mon père

Avant propos

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Biologique 1 de l'Université de Nancy 1

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur R. GAY qui m'a accueillie dans son service et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Je lui exprime ici ma profonde gratitude pour le soutien moral qu'il m'a apporté tout au long de ce travail.

J'exprime mes remerciements à Mme PETITDEMANGE qui a su avec une extrême gentillesse me communiquer son expérience de la recherche et me former en microbiologie.

Mes remerciements vont également à Monsieur le professeur A. FLORS et ses collaborateurs du laboratoire de Bioengineering à l'I.A.T.A. de Valencia (Espagne) qui m'ont réservé un accueil chaleureux dans leur service. Aucun mot n'est assez fort pour remercier toute l'équipe qui s'est mobilisée pour m'aider à réaliser une partie de ce travail,

Je remercie les membres du jury qui ont bien voulu juger ce travail :

- Monsieur H. PETITDEMANGE, Professeur à l'Université de Nancy 1
- Monsieur G. LEFEBVRE, Professeur à l'I.N.P.L.
- Monsieur J.P. VANDECASTEELE, Chef de Projet à l'Institut Français du Pétrole

J'associe à mes remerciements Monsieur G. RAVAL qui a beaucoup contribué au déroulement de ce travail.

Je remercie tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidée à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : Revue Bibliographique	5
1 - Structure de la cellulose	5
2 - Association cellulose et autres constituants	7
3 - La cellulolyse et les microorganismes cellulolytiques	9
3-1 Les Eucaryotes	10
3-1-1 Les protozoaires	10
3-1-2 Les champignons cellulolytiques	11
3-1-2-1 Les champignons imparfaits	11
3-1-2-2 Les Basidiomycetes	11
3-1-2-3 Les Ascomycetes	11
3-2 Les Procaryotes	
3-2-1 Les bactéries cellulolytiques	12
4 - Les Enzymes impliquées dans la cellulolyse	17
4-1 Les endoglucanases	18
4-2 Les β -1-4 exoglucanases	19
4-2-1 Les cellobiohydrolases	19
4-2-2 Les exo-1, 4- β -D-glucosidases	19
4-3 Les β -glucosidases	20
4-4 Les Oxydases	21
4-5 Les cellobioses et cellodextrines phosphorylases	21
4-5-1 La cellobiose phosphorylase	21
4-5-2 La cellobiose dextrine phosphorylase	21
5 - Mécanisme d'action des cellulases	23
6 - Applications Industrielles des cellulases	26
7 - Les Mutations chez les Clostridia	27
7-1 Mutagenèse et agents mutagènes	28

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1 - Microorganisme utilisé	32
2 - Milieux de culture	32
3 - Sources de carbone	32
4 - Techniques de culture	32
4-1 Entretien de la souche	32
4-2 Culture en milieu liquide	34
4-2-1 Culture en tube de Hungate	34
4-2-2 Culture en flacon type "pénicilline"	34

4-2-3 Culture en fermenteur	34
4-3 Culture en milieu solide	35
5 - Estimation de la croissance bactérienne	35
5-1 Croissance sur substrat soluble	35
5-2 Croissance sur substrat insoluble	35
6 - Dosage des produits de fermentation	35
6-1 Chromatographie	
6-2 Méthodes enzymatiques	36
6-3 Dosages des protéines	37
6-4 Dosages des sucres réducteurs	37
7 - Détermination des Activités enzymatiques	38
7-1 Dosage de l'activité endoglucanase	38
7-2 Dosage de l'activité exoglucanase	38
7-3 Dosage de l'activité avicelase	39
7-4 Dosage de l'activité xylanase	40
8 - Détermination de la perte de cellulose	40
9 - Techniques de mutation	40
8-1 Préparation des spores	40
8-2 Méthodes de mutation	41
10 - Electrophorèse Analytique	41
10-1 Technique électrophorétique	41
10-2 Localisation des différentes activités enzymatiques	43

CHAPITRE III : Optimisation de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*

1 - Recherche d'un milieu favorisant la production de cellulases	44
1-1 Influence du milieu de culture sur la croissance bactérienne	44
1-1-1 Croissance sur cellulose MN 300	44
1-1-2 Croissance sur cellobiose	46
1-2 Influence du milieu de culture sur la production de cellulases	46
1-2-1 Dans les conditions de culture en tube de Hungate	46
1-2-1 Dans les conditions de culture en fermenteur	52
1-3 Application	54
1-4 Conclusion	54
2 - Recherche de Mutants de <i>Cl. cellulolyticum</i>	56
2-1 Travail préliminaire	56
2-2 Mutagenèse	60

3 - Recherche du substrat le mieux adapté à la production de cellulases	62
3-1 Influence de la nature du substrat sur la production de cellulases par <i>Cl. cellulolyticum</i>	62
3-1-1 Production de l'activité CMCase	62
3-1-2 Production de l'activité Avicelase	62
3-1-3 Production de l'activité PNPCbase	64
3-2 Influence de la nature du substrat sur la production des activités cellulases par le mutant 42	64
3-2-1 Production de l'activité CMCase	64
3-2-2 Production de l'activité Avicelase	68
3-2-3 Production de l'activité PNPCbase	68
3-3 Conclusion	68
3-4 Influence de la nature du substrat sur la production des métabolites	71

CHAPITRE IV : Etude de la Dégradation comparée de la cellulose microcristalline Avicel par *Cl. cellulolyticum* et le Mutant 42

1 - Etude de la croissance sur cellulose Avicel	73
2 - Production comparée des activités enzymatiques	73
3 - Evolution de l'excrétion des protéines	78
4 - Solubilisation de la cellulose Avicel	83
5 - Conclusion	83

CHAPITRE V : Recherche d'une Synergie d'action entre les cellulases de *Cl. cellulolyticum* et du mutant 42

1 - Croissance de la coculture	85
2 - Production des Activités enzymatiques	85

CHAPITRE VI : Etude du système cellulolytique de *Cl. cellulolyticum*, du mutant 42 et du mutant 121

1 - Analyse de la composition protéique des surnageants de culture après migration électrophorétique	93
2 - Localisation des différentes activités cellulases	94

3 - Discussion	98
3-1 Spectre protéique	98
3-2 Identification et caractérisation des composants cellulolytiques	98
4 - Conclusion	101
5 - Application	101
 CONCLUSION GENERALE	 104
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .	 108
 ANNEXE	 121

ABREVIATIONS

ADP : adénosine diphosphate
Ade- : adénine-
Arg- : arginine-
AT : Adénine Thymine
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : adénosine triphosphate
°C : degré celsius
CBH : cellobiohydrolase
DNase : désoxyribonucléase
DNS : acide dinitro salicylique
DO : densité optique
DTT : dithiotréitol
GC : guanine cytosine
His- : histidine-
kd : kilodalton
Leu- : leucine-
mA : milliampère
M : molaire
Met- : méthionine-
MOPS : acide morpholinopropane sulfonique
N : normale
p : phosphate
PM : poids moléculaire
R : résistant
Tyr- : tyrosine-
UI : unité internationale

INTRODUCTION



Le choc pétrolier de 1973, la diminution des ressources combustibles fossiles et des produits chimiques de base ont suscité un vif intérêt pour les ressources carbonées naturelles renouvelables. A ce titre, la cellulose, constituant majeur de la paroi des cellules végétales, a été au centre des recherches de nature très diverse pour la production d'énergie ou de matières premières nouvelles. Bien que très récemment la diminution du coût des énergies fossiles ait rendu non rentable la valorisation de la biomasse, notre société se trouve actuellement confrontée aux problèmes d'économie d'énergie, de pollution et de prolifération des déchets de tous genres:

- déchets agricoles (bagasse, tiges de canne à sucre, tiges et feuilles de maïs);
- rejets de l'industrie alimentaire;
- résidus forestiers et de l'industrie du bois;
- déchets urbains.

Tous ces déchets constituent des sources potentielles de cellulose.

La cellulose est l'un des constituants majeurs de la paroi des cellules végétales; élément constitutif du bois, elle est pratiquement l'unique constituant du coton et des fibres textiles. Elle constitue 40% des $1,8 \times 10^{12}$ tonnes de substance biodégradable résultant chaque année de la photosynthèse (WITTAKER 1970).

La valorisation de la cellulose est d'un intérêt considérable. Sa dégradation conduit à la production des composés chimiques et énergétiques qui jouent un rôle important dans le cycle de carbone et de l'énergie de la biosphère. Elle peut également permettre de répondre aux besoins d'énergie des pays en voie de développement qui n'ont pas les moyens de se procurer les combustibles dont ils ont besoin.

La valorisation peut se faire suivant plusieurs procédés :

- la combustion directe pour la production d'énergie;
- la pyrolyse qui la transforme en combustibles tels que méthane, hydrogène, mono et dioxyde de carbone, éthylène;
- l'hydrolyse chimique du bois conduisant à des sucres fermentescibles;
- enfin la dégradation biologique ou bioconversion : elle se fait par hydrolyse enzymatique utilisant des cellulases et conduit à des sucres solubles puis, par fermentation, à des produits de métabolisme comme les acides, les alcools et à la production des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.) utilisées dans l'alimentation animale (KRISTENSEN 1978).

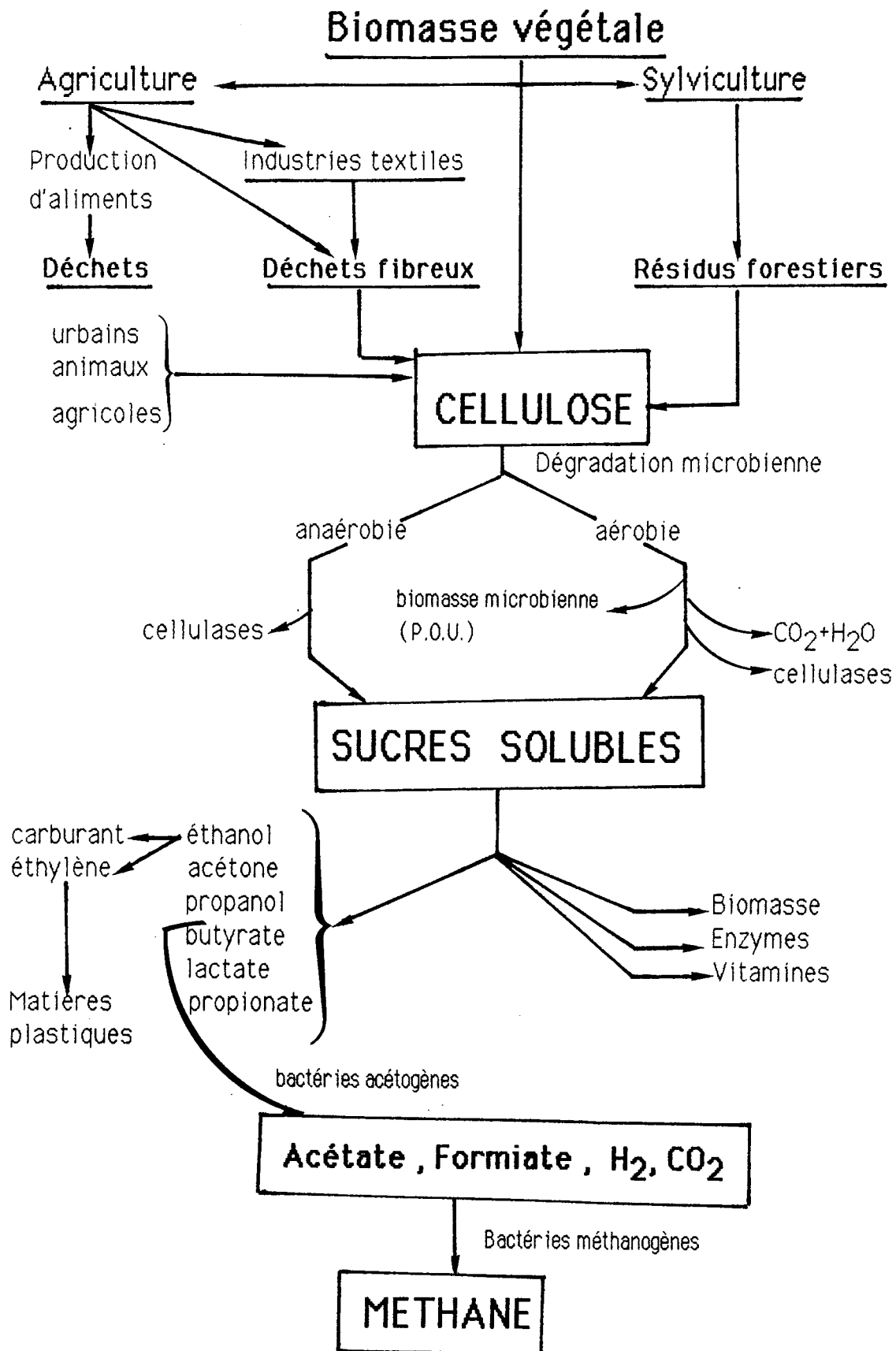


Figure 1 : Différentes sources de cellulose et schéma de sa dégradation.

Les différentes sources de cellulose et le schéma de sa dégradation sont représentés sur la figure 1.

La dégradation microbienne ou cellulolyse peut se faire dans la nature et au laboratoire :

- dans la nature elle est réalisée par une population mixte stable (LYNCH et coll.1981) comprenant des microorganismes cellulolytiques capables de dégrader la cellulose en sucres fermentescibles (cellobiose, glucose) associés à des microorganismes non cellulolytiques dont certains fermentent ces sucres en acides, en alcools et en solvants; d'autres comme les bactéries méthanogènes produisent du méthane à partir de l'hydrogène, du gaz carbonique, de l'acétate et du formiate formés au cours de la fermentation des sucres.

- au laboratoire, la cellulolyse peut se faire soit par l'utilisation des populations mixtes non définies (PLASSE 1980) soit par des cultures pures d'organismes cellulolytiques (Eucaryotes ou Procaryotes).

L'étude de la cellulolyse présente un intérêt fondamental. Elle est réalisée presque exclusivement par les microorganismes cellulolytiques. Parmi ces microorganismes on distingue les cellulolytiques thermophiles et les cellulolytiques mésophiles. Ces derniers sont particulièrement intéressants sur le plan industriel; non seulement ils réalisent une fermentation directe de la cellulose en acides et alcools (HUNGATE 1950), mais cette fermentation se fait à des températures moyennes (30-37°C) ce qui rend les installations industrielles moins onéreuses que celles utilisant les microorganismes thermophiles. Les microorganismes cellulolytiques mésophiles peuvent également être directement associés à des organismes mésophiles tels que *Zymomonas mobilis*, *Clostridium acetobutylicum* ou *Saccharomyces cerevisiae* qui sont des producteurs de solvants les plus performants.

Un microorganisme cellulolytique mésophile, strictement anaérobie a été isolé au laboratoire à partir d'herbes en décomposition (PETITDEMANGE et coll. 1984). Cette bactérie a été identifiée et caractérisée; elle appartient au genre *Clostridium* et est répertoriée sous le nom de *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35 319. L'étude physiologique de cette bactérie a été réalisée (GIALLO 1984). une étude biochimique de son système cellulolytique a été entreprise.

En effet, *Clostridium cellulolyticum* possède un équipement enzymatique capable de dégrader la cellulose en sucres fermentescibles et fermente également ces sucres en acides et en alcools. Mais la dégradation de la cellulose par un grand nombre de bactéries

cellulolytiques anaérobies est parfois incomplète (HUNGATE 1950). Elle comporte une étape limitante qui est la cellulolyse. Cette étape est souvent due, soit à la nature cristalline d'une fraction de substrat qui serait difficilement accessible aux cellulases, soit à l'inhibition des enzymes cellulolytiques par les sucres solubles formés (BACON 1979), soit encore à l'inhibition du métabolisme bactérien par certains produits de fermentation (HUNGATE 1950; CHUNG 1976).

Pour essayer de lever l'inhibition de la cellulolyse par les sucres formés et par là, améliorer la dégradation de la cellulose, la production de cellulases et de solvants, une culture mixte de *Clostridium cellulolyticum* et de *Clostridium acetobutylicum* a été réalisée (FOND et coll. 1983). Cette étude a montré que la dégradation de la cellulose est activée mais que la production de solvants (acétone et butanol) ne s'effectue pas. Cette phase "solvant" est soumise à divers facteurs de régulation dont le flux de sucre fourni à la bactérie. Lors de ce couplage, le flux de sucre (essentiellement cellobiose) provenant de l'hydrolyse de la cellulose par *Cl. cellulolyticum* ne permet pas à *Cl. acetobutylicum* de passer à la phase solvant. Les performances de *Cl. cellulolyticum* doivent donc être améliorées afin que la cellulolyse apporte plus de sucres pour permettre le déclenchement de la solvantogénèse chez *Cl. acetobutylicum*.

Pour tenter d'apporter une solution à ce problème, deux possibilités s'offrent à nous:

- trouver les conditions de culture qui permettent une meilleure production de cellulases,
- essayer de produire des mutants de *Cl. cellulolyticum* hyperproducteurs de cellulases.

Notre travail de thèse s'inscrit dans ce contexte.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I STRUCTURE DE LA CELLULOSE

La cellulose est la molécule organique la plus abondamment synthétisée sur la terre. C'est un polysaccharide de la série des β -D-glucanes. Elle est formée de plusieurs milliers d'unités de D-anhydroglucose dans la configuration chaise type $4C_1$ reliées entre elles par des liaisons β -4. Le maillon élémentaire est le cellobiose. Compte tenu de la taille du motif unitaire, la longueur de la molécule peut être estimée 10 μ m ou plus.

La structure linéaire de la cellulose est représentée sur la figure 2.

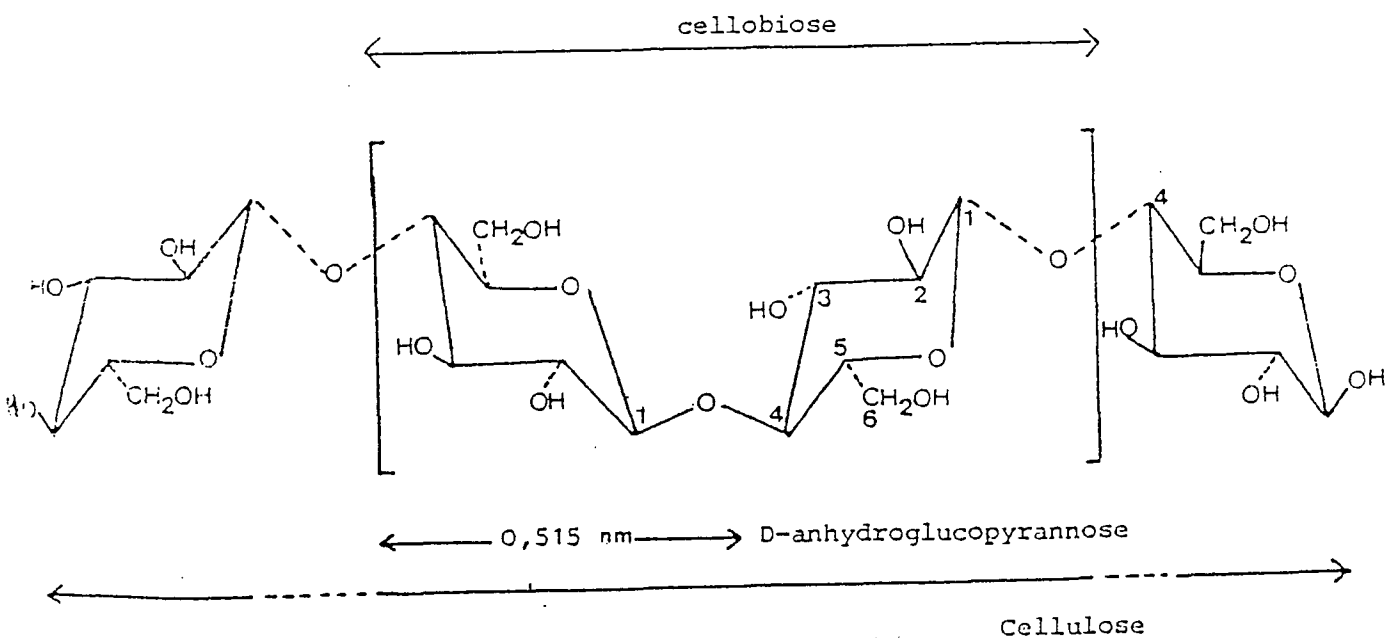


Figure 2 : Structure linéaire de la cellulose

Plusieurs techniques ont été utilisées pour déterminer le degré de polymérisation de la molécule. Suivant le type de matériel cellulosique, le degré de polymérisation de la chaîne varie de 300 à 15 000 unités D-glucose, ce qui correspond à un poids moléculaire compris entre 50 000 et 2 500 000. La microscopie électronique a mis en évidence la nature fibrillaire de la cellulose. Quelle que soit son origine, la cellulose se présente sous forme de fibrilles dont la morphologie et la taille sont différentes. L'organisation fibrillaire est une conséquence des caractéristiques fondamentales de la chaîne unitaire de la cellulose, "fil"

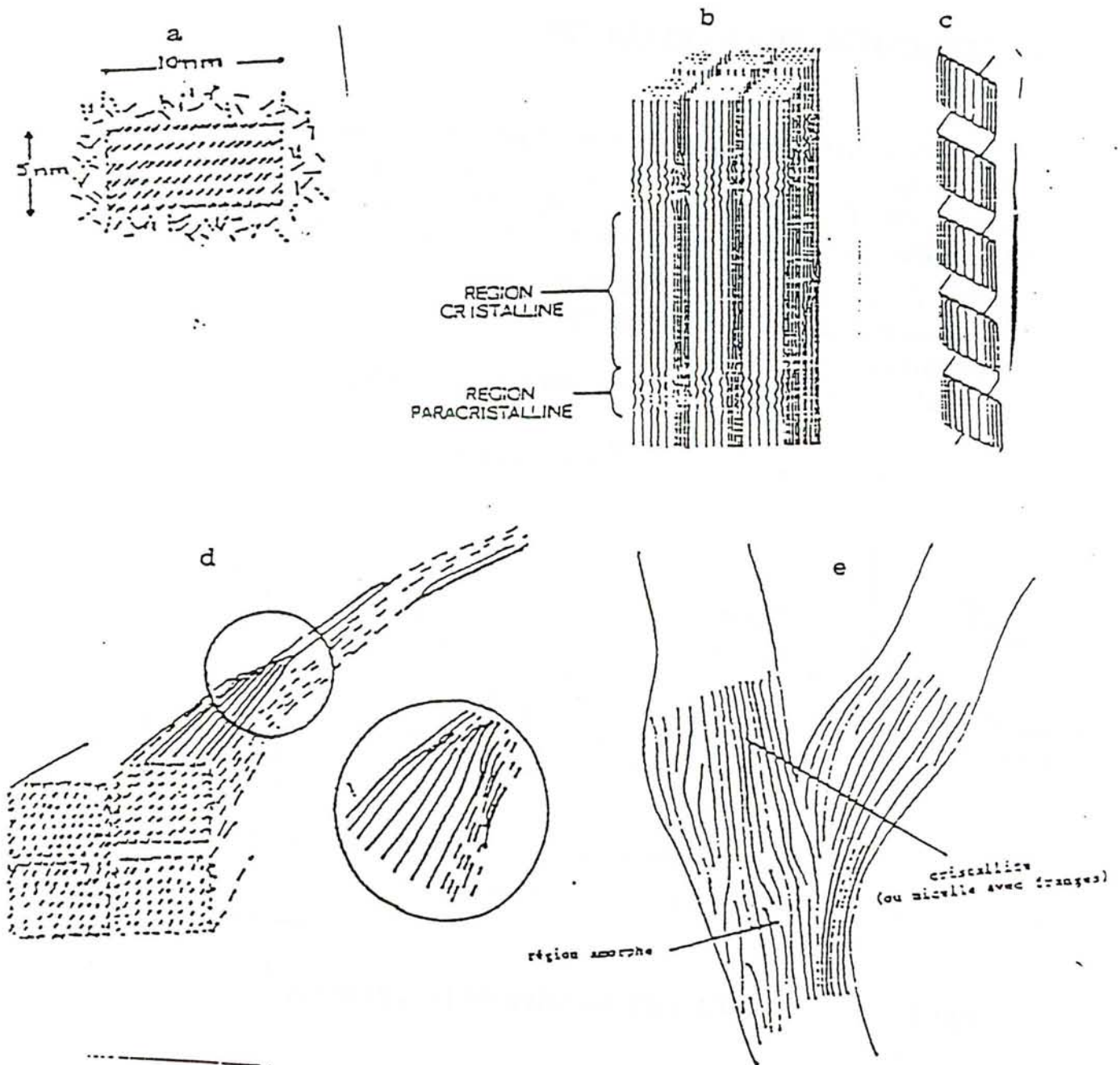


Figure 3 : Différents modèles de structure de microfibrilles de la cellulose

- a) représentation de PRESTON et CRONSHAW (1958)
- b) représentation de HESS et coll. (1957)
- c) représentation de MANLEY (1964)
- d) représentation de ROWLAND et ROBERTS (1972)
- e) structure de 2 microfibrilles de cellulose au niveau d'une zone de coalescence d'après COLVIN (1980).

tendu et rigide de très grande longueur jusqu'à 5 μ dont l'empilement en domaines organisés de grande taille, les cristallites, est une propriété remarquable. Toute fibre cellulosique (ex: poils de coton, fibres de bois...etc), peut être dissociée par divers procédés physiques en fibrilles. Suivant la taille de ces éléments, on parle de microfibrilles ou de fibrilles élémentaires. La nature et les dimensions de l'unité constitutive des parois cellulosiques ont été un sujet de controverses. D'après les premières observations au microscope électronique, la cellulose est constituée par des nappes de fibrilles entrecroisées en forme de rubans aplatis dont la section a une longueur de 20 à 25 nm et une épaisseur de 5 à 10 nm (BARNOUD 1980); HEYN (1966) a trouvé des fibrilles de faible dimension 2 à 3 nm. MUHLTHALER (1969) et FREY WYSSLING (1969) ont considéré que toutes les celluloses sont structurées sur la base de la fibrille élémentaire. Les microfibrilles étant des multiples de l'unité structurale de 3,5 nm.

Différents modèles de structure des microfibrilles ont été proposés (figure 3):

La structure fibrillaire de la cellulose, ses propriétés physicochimiques et mécaniques, s'expliquent par la composition unitaire de la chaîne. Les chaînes sont associées sous forme de microfibrilles liées entre elles par un grand nombre de liaisons hydrogène et par des forces de Van der Waals. La présence de ces liaisons explique le caractère insoluble de la cellulose. Les microfibrilles présentent des régions très ordonnées où les molécules sont fortement liées appelées régions cristallines et des zones où les molécules sont enchevêtrées et en désordre appelées régions amorphes (LADISH et TSAO 1979).

2 - Association Cellulose et autres Constituants

La cellulose pure est exceptionnelle; on la trouve dans les parois de l'algue marine unicellulaire *Valonia ventricosa*, dans la paroi du poil de coton la cellulose pure est synthétisée par *Acetobacter xylinum*. Dans la nature la cellulose est étroitement associée à des constituants d'accompagnement non cellulosiques dont la proportion et la composition varient suivant l'âge et la nature de la plante :

Les hémicelluloses (35 à 50%) sont des hétéropolysaccharides ramifiés constitués en proportions variables de pentoses, d'hexoses et d'acides uroniques. Elles sont présentes dans toutes les couches de la

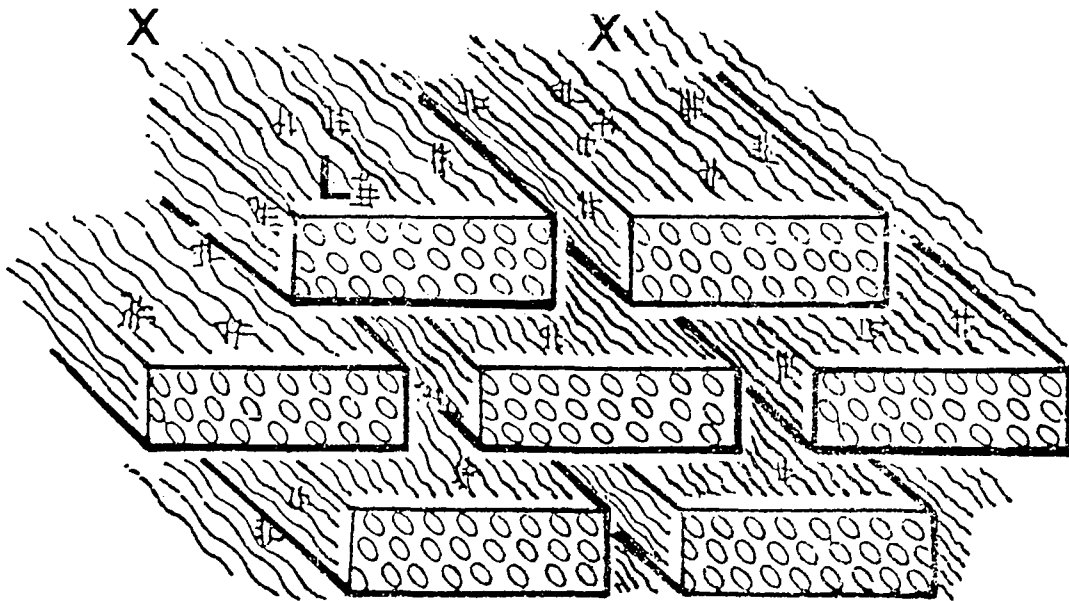


Figure 4 : Schéma de la disposition des fibrilles cellulosiques entourées de chaînes orientées d'hémicelluloses dans une paroi cellulosique.

Ce dessin fait apparaître les inter-relations au niveau supramoléculaire entre le composant organisé et cristallin qu'est la cellulose fibrillaire et la matrice amorphe des hémicelluloses. En plusieurs points, on a représenté le départ de molécules de lignine liées par co-valence aux hémicelluloses. La taille des fibrilles cellulosiques est arbitraire (D'après FREY-WYSSLING, 1959, et MARCHESSAULT, 1974 et 1978).

paroi végétale mais plus particulièrement dans les parois primaire et secondaire où elles apparaissent fortement liées à la cellulose et à la lignine (colloque cellulolyse) . La figure (4) montre la disposition des fibrilles cellulosiques associées entourées de chaînes d'hémicellulose dans une paroi cellulosique. Une des hémicelluloses les plus fréquentes est le D-xylane constitué d'unités D-xylose sur lesquelles viennent se brancher des molécules d'arabinose et des molécules d'acide glucuronique. L'ensemble cellulose-hémicellulose est parfois appelé holocellulose.

La pectine (10 à 20%) : Les substances pectiques sont des polymères glucidiques de l'acide D-galacturonique plus ou moins méthylés associés par des liaisons osidiques α -1 - 4. Les poids moléculaires se situent entre 30 000 et 300 000.

La Lignine (20 à 30%) un polymère complexe de nature phénolique associé aux hémicelluloses. Elle est constituée d'alcools coniférique, synapilique et paracoumarylique. Son caractère phénolique confère à la lignine un rôle biologique protecteur et rend sa structure peu accessible à l'eau et résistant à l'attaque enzymatique.

A côté des hémicelluloses, des pectines et de la lignine, la cellulose est associée:

- à de faibles quantités de lipides (2 à 7%) et de protéines (3 à 10%).
- à un certain nombre de substances dans les végétaux et dérivés non traités de végétaux .
- enfin à d'autres catégories de substances dans les déchets de l'activité humaine (déchets urbains et industriels) qu'il convient de connaître dans un but de recyclage et de valorisation.

3 - La Cellulolyse et les Microorganismes cellulolytiques

La cellulolyse est l'étape fondamentale de la transformation de la cellulose en sucres fermentescibles et en produits économiquement rentables. Elle correspond à l'hydrolyse biologique de la cellulose en molécules de plus petite taille comme les cellodextrines, le cellobiose et le glucose.

La première étape de prétraitement et d'hydrolyse de la matière première

destinée à produire les sucres fermentescibles limite l'application industrielle de transformation de résidus cellulotiques et lignocellulosiques en composés chimiques de base. Pour supprimer cette limitation, trois principales approches ont été envisagées:

- l'hydrolyse acide : cette voie est limitée par le coût élevé des acides et la formation de produits secondaires inhibiteurs pour une fermentation future.

- l'hydrolyse enzymatique par les cellulases de *Trichoderma* limitée elle aussi par le coût des cellulases.

- une troisième voie d'hydrolyse, moins onéreuse et facile à mettre en oeuvre, est la conversion directe par les bactéries cellulolytiques.

En général, les animaux n'ont pas d'activité cellulolytique bien que certaines espèces d'escargot secrètent des quantités importantes de cellulases. En 1970, WILDISH et POOLE ont mis en évidence une activité cellulasique chez un amphipode vivant dans les estuaires: *Orchertia grammarella*. Les microorganismes cellulolytiques sont donc les principaux responsables de la dégradation de la cellulose dans la biosphère.

La flore cellulolytique est très variée; elle se retrouve dans des écosystèmes divers constitués par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis à vis de l'oxygène.

3- 1 Les Eucaryotes

Ce groupe comprend les protozoaires et les champignons.

3-1-1 Les protozoaires

L'étude de la dégradation de la cellulose en sucres par les protozoaires présente des difficultés dues à l'interférence des métabolismes des bactéries symbiotiques hébergées.

3-1-2 Les champignons cellulolytiques

C'est en 1950 que REESE a mis en évidence une activité cellulolytique chez les champignons saprophytes. Ces champignons appartiennent principalement à la classe des champignons imparfaits et à celle des basidiomycètes.

3-1-2-1 Les champignons imparfaits

Sont considérés comme cellulolytiques vrais : *Trichoderma viride* (LI et coll., 1965) et son mutant hyperproducteur *Trichoderma reesei*, *Fusarium solani* (WOOD 1969, 1975); *Penicillium funiculosum* (WOOD et Mc CRAE 1979 1982). De nombreuses espèces mésophiles ont été décrites pour leur activité cellulolytique: *Ventricillium alboatum* (GUPTA et HEALE, 1971); *Penicillium iriensis* (BORETTI et coll., 1973); *Fusarium avenaceum* (ZALEWSKA et coll., 1981); *Aspergillus niger* (PETTERSSON, 1963). Dans le groupe des champignons imparfaits, *Trichoderma reesei* est l'espèce la plus étudiée en raison de ses potentialités commerciales. A l'heure actuelle, les souches de *Trichoderma viride* et d'*Aspergillus niger* sont les plus importantes sources de cellulases à vocation industrielle. Cependant, certains champignons thermophiles sont étudiés pour leurs potentialités cellulases. *Talaromyces emersonii* est capable de produire des quantités importantes de cellulases en 50 heures alors qu'il faut 5 à 8 jours à *Trichoderma viride*. De plus, les enzymes produites par cette souche sont très stables à l'agitation et à la chaleur (MOLEYNEY et coll. 1983).

3-1-2-2 Les Basidiomycetes

Le représentant de ce groupe le plus étudié est l'espèce *Sporotrichum pulverulentum*. Outre ses propriétés cellulolytiques, il possède une activité lignolytique (ANDER et ERIKSON, 1975-1977); STREAMER et coll., 1975).

L'espèce *Sporotrichum pulverulentum* isolée sous le nom de *Chrysosporium lignorum* a été initialement classée dans les champignons imparfaits. Elle est aujourd'hui apparentée à un basidiomycète (ANDER et ERIKSON, 1975).

3-1-2-3 Les Ascomycetes

Dans ce groupe, l'espèce *Talaromyces emersonii* produit de grandes

quantités de cellulases (Mc HALE, COUGLAN ,1980-1981). ORPIN (1975) a mis en évidence dans le rumen, un champignon anaérobie strict, *Neocallimastix frontalis*. BAUCHOP (1979) a montré que les particules végétales du rumen du bovin et du mouton sont colonisées par une population importante de phycomycètes anaérobies qui se développent sur les substrats cellulosiques lentement dégradés dans le rumen.

3-2 Les Procaryotes

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

3-2-1 Les bactéries cellulolytiques

Les bactéries ont été moins étudiées que les champignons. Cependant, certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux.

Les différentes bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques sont répertoriées dans le tableau (1).

Cl. thermocellum est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée. Elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO₂, H₂). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline (JOHNSON et coll., 1982) que les cellulases de *Trichoderma reesei*. *Cl. thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte. Son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haut poids moléculaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (LAMED et coll. 1983; BAYER et coll. 1983). Cet agrégat est résistant à la plupart des agents dénaturants mais un traitement en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS) au dessus de 70 °C permet de dissocier le complexe (LAMED et coll., 1983) . Ainsi l'analyse du complexe par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS a montré que le cellulosome est composé d'au moins 14-18 polypeptides de poids moléculaire compris entre 48 000 et 210 000 daltons. La plupart de ces polypeptides possèdent une activité cellulasique et l'un d'eux appelé le "cellulose-binding factor" a une forte affinité pour le cellulose . De plus en 1983, BAYER et coll.

Tableau 1 : les Bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques

BACTERIES	TYPE RESPIRATION	TEMPERATURE croissance	Type d'enzyme purifié	Références
A) GRAM-				
1-Bâtonnets et Cocci aérobies				
<i>Cytophaga sp</i>	aéro-anaéro facul		1 Endo	CHANG et THAYER, 1977
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	aérobie strict			
2-Bâtonnets aéro-anaérobies				
Famille des entérobactéries				
<i>Erwinia carotovora</i>	aéro facultative	27-30 °C	2 Endo	TSENG, 1974
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile	2 Endo	TARDIF, 1982; BOYER et coll., 1984 a,b; BOYER, 1985
3- Anaérobies				
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	anaéro strict	mésophile		HUNGATE, 1950; BRYANT et SMALL 1956
<i>Bacteroides succinogenes</i>	anaéro strict	30-38 °C	1 ENDO	GROLEAU, FORSBERG, 1981-1983
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	anaéro	mésophile	2 Endo, 1 Exo	KHAN, 1980; PATEL et coll. 1980 SADDLER et KHAN, 1981
<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>	anaéro	mésophile		KHAN et coll., 1984

Tableau 1 : Les Bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques (suite)

B) GRAM+

1) Cocci

<i>Ruminococcus albus</i>	anaéro strict	mésophile		HUNGATE, 1957
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	anaéro strict	mésophile		BRYANT, 1963-1973

2)-Bâtonnets et cocci sporulés

<i>Cl. thermocellum</i>	anaéro strict	thermophile	4 Exo	NG et ZEIKUS, 1981; PETRE et coll., 1981 DUONG et coll., 1983
<i>Cl. stercorarium</i>	anaéro saprophyte	thermophile	1 Endo, 1 Exo	MADDEN, 1983; CREUSET et coll., 1983 a, b.
<i>Cl. cellubioparium</i>	anaéro strict	30-37 °C		HUNGATE, 1944; CHUNG, 1976
<i>Cl. papyrosolvens</i>	anaéro strict	mésophile		MADDEN et coll., 1982
<i>Cl. cellulolyticum</i>	anaéro strict	mésophile		PETITDEMANOE et coll., 1984
<i>Cl. cellulovorans</i>	anaéro	mésophile		SLEAT et coll., 1984
<i>Cl. cellulocrescens</i>				

3-Bâtonnets irréguliers non sporulés

<i>Cellulomonas flavigena</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile		STACKEBRANDT, KANDLER, 1979
-------------------------------	--------------------	-----------	--	-----------------------------

Tableau 1 : Les Bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques (suite)

<i>Cellulomonas uda</i>	aéroanaéro facul;	mésophile	2 Endo, 1 Exo	HAN et SRINIVASAN, 1968
<i>Cellulomonas fimi</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile	2 Endo, 1 Exo	STACKEBRANDT, KANDLER, 1979 LANGSFORD et coll., 1984
<i>Cellulomonas cellasaea</i>	aéro-anaéro facul	mésophile		STACKEBRANDT, KANDLER, 1979
<i>Cellulomonas gelida</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile		STACKEBRANDT, KANDLER, 1979
<i>Cellulomonas biazotea</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile		STACKEBRANDT, KANDLER, 1979
<i>Cellulomonas cartae</i>	aéro anaéro facul	mésophile		STACKEBRANDT, KANDLER, 1979-1980
<i>Cellulomonas turbata</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile		STACKEBRANDT et coll., 1982
<i>Cellulomonas sp souche CB-4</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile	1 CBH	NAKAMURA, KATAMURA, 1982- 1983
<i>Cellulomonas souche 11bc</i>	aéro-anaéro facul	mésophile	3 Endo	BEGUIN et coll., 1977, BEGUIN, EISEN, 1978a,b.
<i>Cellulomonas sp souche CS1-1</i>	aéro-anaéro facul.	mésophile		CHOI et coll., 1978; HAGGETT et coll., 1979

C) LES BACTERIES FILAMENTEUSES

Micromonosporaceae

Abréviations utilisées : Endo: endoglucanase; Exo: exoglucanase; aéro: aérobie; anéro: anaérobie facul : facultative

ont observé que la composition polypeptidique du cellulosome varie avec la source de carbone présente dans le milieu de culture. En 1977, NG et coll. ont signalé l'effet inhibiteur de l'agitation de la culture sur la croissance de *Cl. thermocellum*. D'après NG et coll. 1977, NG et ZEIKUS 1981, les cellulases de *Cl. thermocellum* ne sont pas sensibles à l'oxygène. Mais en 1982, JOHNSON et coll., puis JOHNSON et DEMAIN (1984) ont montré que les cellulases de *Cl. thermocellum* fonctionnent optimalement dans un environnement réducteur et qu'elles ne dégradent la cellulose cristalline qu'en présence du dithiothréitol (DTT) et des ions Ca^{2+} . Les ions Ca^{2+} stimulent les activités cellulolytiques de ce microorganisme. Les produits majeurs de l'hydrolyse de la cellulose (cellobiose et glucose) n'inhibent pas les enzymes cellulolytiques qui semblent être constitutives (SHINMYO et coll., 1979).

A côté de *Cl. thermocellum*, certaines bactéries ont été également étudiées et possèdent des caractéristiques remarquables. C'est le cas de *Bactéroïdes succinogenes* qui est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose. Le système cellulolytique de cet organisme semble particulièrement complexe (GOLEAN et FORSBERG, 1983; SCHELLHORN et FORSBERG, 1984). Elle fermente le cellobiose, le glucose et quelques souches sont capables d'utiliser les pectines et l'amidon mais pas les xylanes (BRYANT, 1963-1973). Les bactéries du genre *Ruminococcus* sont capables d'assimiler de nombreux substrats carbonés. *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* sont capables d'utiliser le xylane et le cellobiose mais ne fermentent pas les oses simples (BRYANT, 1963-1973). De plus, *Ruminococcus albus* stocke les réserves sous la forme de granules intracellulaires de glycogène (CHENG et coll., 1977). *Acetivibrio cellulolyticus*, bactérie anaérobie mésophile ne semble capable de fermenter que la salicine, le cellobiose et la cellulose en produisant principalement de l'acide acétique et des gaz (H_2 , CO_2). Mais il est possible d'adapter cette souche à pousser sur glucose (PATEL et McKENZIE, 1982); de plus cette bactérie présente une forte activité cellulase sur différents types de substrats cellulasiques.

Les bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comprennent les genres *Pseudomonas*, *Cellvibrio* et *Cellulomonas*. Le genre *Cellvibrio* n'est pas reconnu par la neuvième édition du Bergey's manual (1984). Certains auteurs classent cette espèce dans le genre *Pseudomonas* alors que CHOI et coll. (1970) suggèrent de classer *Cellvibrio gilvus* dans le genre *Cellulomonas*. *Cellvibrio fulvus* étudiée par BERG et coll. (1978) pousse bien sur le glucose et le cellobiose mais pas sur les celluloses substituées. Elle n'accumule pas de sucres réducteurs au cours de la

croissance sur cellulose et produit une cellulase liée aux cellules. Les souches de *Cellulomonas* ont été isolées le plus souvent du sol (*Cellulomonas* sp ATCC 21) d'un champ de canne à sucre; *Cellulomonas flavigena* d'une décharge mais aussi du rumen comme *C. fimi* souche R2.

Les bactéries du genre *Cellulomonas* ont été considérées jusqu'à récemment comme toutes cellulolytiques. Dans la huitième édition du Bergey's manual 1974, KIEDDIER ne reconnaissait qu'une seule espèce: *Cellulomonas flavigena*; mais en 1979, STACKEBRANT et KANDLER ont d'après les caractères physiologiques et biochimiques ainsi que les études d'homologie d'ADN, mis en évidence l'existence de sept espèces différentes: *C. blazotea*, *C. cellasea*, *C. fimi*, *C. flavigena*, *C. gelida*, *C. uda* et *C. cartae* auxquelles il faut ajouter *C. turbata*, espèce non cellulolytique (STACKEBRANT et coll., 1982). Les *Cellulomonas* sont des organismes capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone et entre autres les hémicelluloses comme le xylane (RICHARD et LAUGLIN, 1980; RICHARD et PEIRIS 1981). La fermentation de ces sucres conduit à la production d'acétone, de lactate, de formiate, de succinate, d'éthanol et de gaz carbonique. certaines souches très cellulolytiques, compétitives avec les champignons ont été isolées ces dernières années (CHOUDHURY et coll. 1980, NAKAMA et KITONA 1982). Récemment une espèce cellulolytique *C. fermentans* a été isolée à partir d'un échantillon du sol d'une décharge, elle a été identifiée, caractérisée et étudiée par BAGNARA et coll. (1985). Dans le but d'optimiser la production de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.), de nombreuses études ont été réalisées sur *Cellulomonas* (HAN et SRINIVASAM 1980, KRISTENSEN 1978, HITCHNER et LEATHEERWOOD 1980, HAN 1982, ENRIQUEZ et RODRIGUEZ 1983). Les protéines cellulaires de plusieurs souches de *Cellulomonas* sont très riches en lysine et acides aminés essentiels par rapport aux normes de la FAO (*Cellulomonas* sp, HAN et SRINIVASAM, 1968; *Cellulomonas* sp, HITCHNER et LEATHERWOOD 1980; *Cellulomonas* sp, souche IIbc, ENRIQUEZ et RODRIGUEZ 1983). Différents travaux ont été réalisés sur le genre *Cellulomonas*: BEGUIN et ESSEN (1977) ont purifié trois endoglucanases à partir de *C. sp* souche IIbc; NAKAMURA et KITAMURA ont purifié une cellobiohydrolase à partir de *C. uda* souche Cb4. DERMOUN (1986) a mis en évidence la capacité de *C. uda* à dégrader extensivement les celluloses Avicel, Whatman C41, Macherey et Nagel (MN300) par une attaque simultanée des régions amorphes et cristallines de la cellulose. Une coculture de *C. uda* et *Cl. cellulolyticum* réalisée par BAGNARA et coll. (1985) a mis en évidence l'existence d'une synergie d'action au niveau de la dégradation de la cellulose en boîte de Pétri (activité halogène).

4 - Les Enzymes impliquées dans la cellulolyse

La cellulolyse correspond à l'hydrolyse de la cellulose en sucres simples (cellobiose, glucose). Cette solubilisation de substrats cellulosiques se fait par l'action d'un complexe multienzymatique appelé "cellulase". Le mécanisme complet de la dégradation de la cellulose n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant de très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'attaque de la cellulose et à la caractérisation des cellulases. Ce sont surtout les cellulases des champignons qui ont été très étudiées notamment celles de *Trichoderma reesei* et de *Trichoderma viride* alors que les propriétés des cellulases bactériennes sont peu connues.

Les principales enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose sont: les endo β -1-4 glucanases, les exo β -1-4 D-glucanases et les β -glucosidases. Des approches significatives ont été réalisées dans la compréhension du mécanisme d'action des cellulases chez les champignons. Certains auteurs comme WOOD et Mc CRAE (1978) ont proposé un schéma d'attaque de la cellulose : une ou plusieurs endoglucanases fractionnent au hasard les longues chaînes de cellulose produisant ainsi des fibres plus courtes et des cellodextrines. Celles-ci sont attaquées de façon récurrente à partir de l'extrémité non réductrice par une exoglucanase libérant du cellobiose en faible quantité et dans certains cas des cellodextrines de faible PM. Le cellobiose et les cellodextrines sont ensuite transformés en glucose grâce à l'action d'une β -glucosidase, d'une cellobiophosphorylase, ou d'une cellodextrine phosphorylase.

4-1 Les endoglucanases

Elles sont aussi appelées endocellulases ou endo 1-4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (Ec3.2.1.4). Ces enzymes coupent au hasard les liaisons glucosidiques β -1-4 le long de la chaîne de cellulose. Elles sont actives sur les celluloses amorphes et les dérivés substitués de la cellulose comme la carboxyméthylcellulose (CMC). Ce type d'enzyme a une action très limitée sur la cellulose cristalline, il ne devient efficace que lorsque la cellulose est rendue accessible par traitement chimique ou soluble par substitution. Les endocellulases sont largement répandues aussi bien chez les champignons (ERIKSON et PETTERSON 1975a ; HALIWELL 1961; GARG et NEELAKANTAM 1982, SELBY et MAITLAN 1967; KUBICEK 1981) que chez les bactéries (PETRE et LONGIN 1981; NG et

ZEIKUS 1981; YAMANE et coll. 1970); on les rencontre également chez certains organismes non cellulolytiques comme *Cytophaga lytica* (Bergey, 1974) et *Cl. acetobutylicum* (ALLOCK et WOOD, 1981) et enfin chez les plantes supérieures (TRACEY, 1950; REESE et MANDELS, 1963). Plusieurs endoglucanases peuvent se trouver dans le complexe enzymatique d'un même microorganisme. Deux endoglucanases ont été mises en évidence chez *Trichoderma viride* (PETTERSON 1975); cinq chez *Cl. thermocellum* BEGUIN et coll. 1983, PETRE 1985, Millet et coll. 1986). Ces endoglucanases peuvent avoir des spécificités de substrats légèrement différentes et la spécificité d'action de ces enzymes peut varier d'un organisme à un autre.

4-2 Les β -1-4-exoglucanases appelées également **exo-1,4- β -glucanases**

Elles sont de deux types :

4-2-1 les cellobiohydrolases (1,4- β -D-glucane-cellobiohydrolase, Ec3.2.1.91).

Elles libèrent une unité cellobiose à partir de l'extrémité réductrice du polymère. Elles sont actives sur les celluloses insolubles, celluloses microcristallines type Avicel, sur les fibres de coton et sur les cellodextrines.

4-2-2 les exo-1,4- β -D-glucosidases (Ec3.2.1.74),

encore appelées glucohydrolases, libèrent séquentiellement des unités glucose à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Ce type d'enzyme n'a jamais été mis en évidence chez les bactéries.

Les exocellulases n'ont pas d'action détectable sur la CMC, mais les celluloses amorphes partiellement dégradées et les cellooligosaccharides solubles (3 à 6 résidus) sont aisément hydrolysés. L'activité des cellobiohydrolases n'est caractérisée que par leur synergie d'action avec les endocellulases, ce qui n'est pas le cas des glucohydrolases (WOOD et Mc CRAE 1982). Ceci explique la difficulté d'estimation de ces activités dans un mélange. Les cellobiohydrolases ont été mises en évidence et purifiées dans les surnageants de cultures de nombreuses espèces de champignons: *Trichoderma viride* (GUM et BROWN, 1977); *Trichoderma*

koningii HALIWEEL et coll., 1972-1973); *Penicellium funiculosum* (SELBY, 1968); *Fusarium luni* (MISHRA et coll. 1983); *Sclerotium rolfsii* (SCHWALE et SADANA, 1981). Chez ces bactéries, une activité exoglucanase a été mise en évidence dans les surnageants de cultures de quelques microorganismes mésophiles: *Cellvibrio gilvus* (STORVICK et coll., 1963); *Acétivibrio cellulolyticus* (Mc KENZIE et BILOUS, 1982); *Cellulomonas uda* (NAKAMURA et KITAMURA, 1983); *Cellulomonas fimi* (GILKES et coll., 1984c); et purifiée à partir d'une clostridie thermophile, *Cl. stercorarium* (Creuset et coll. 1983).

Il est à noter que ces exocellulases n'ont été purifiées qu'à partir de cultures d'organismes cellulolytiques "vrais". L'absence de ce type d'enzyme explique l'impossibilité des organismes pseudocellulolytiques à effectuer une hydrolyse extensive de la cellulose native.

A ces enzymes cellulolytiques sont associées des enzymes intracellulaires spécifiques de la dégradation du cellobiose et de cellodextrines solubles (degré de polymérisation < 7). Les endo et exoglucanases de quelques bactéries sont présentées dans le tableau (1).

4-3 Les β -glucosidases ou β -D-glucoside glucohydrolases (Ec 3.2.1.21)

Les β -glusidases libèrent des résidus glucose à partir de l'extrémité non réductrice de β -glucosides de petite taille comme le cellobiose et les cellodextrines. Elles sont moins efficaces lorsque les chaînes s'allongent contrairement aux exoglucanases dont l'affinité pour le substrat augmente avec son degré de polymérisation. Des critères de différenciation des deux activités ont été établis par REESE et coll. (1968)

- les β -glucosidases agissent avec rétention de configuration du carbone anomérique.

- les exoglucanases réalisent une hydrolyse du substrat avec inversion de configuration en C₁ du résidu libéré donnant un α -résidu.

- Les β -glucosidases sont très sensibles à l'inhibition par la D-glucono-1,5 lactone et possèdent une activité transférase. Mais en 1975, ERIKSON et PETTERSON ont mis en évidence une exoglucanase dont l'activité sur la cellulose Avicel est inhibée à 83% par la D-glucono-1-5 lactone à une concentration micromolaire. WOOD et Mc CRAE (1982) ont purifié une glucohydrolase sensible au D-glucono-1-5 lactone et possédant une activité transférase.

Les exoglucanases sont caractérisées par la spécificité du substrat

hydrolysé alors que les β -glucosidases sont capables d'hydrolyser différents types de liaisons β -glucosidiques. Lorsque le cellobiose est le substrat, la β -glucosidase est appelée cellobiase. Les β -glucosidases sont largement répandues chez les champignons cellulolytiques. Les quelques glucohydrolases purifiées sont fongiques. Chez les bactéries, les β -glucosidases sont souvent liées à la paroi cellulaire. En 1979 AIT et coll. ont caractérisé et purifié une β -glucosidase chez *Cl. thermocellum*.

Endoglucanases, exoglucanases et β -glucosidases constituent le système hydrolytique présent chez la plupart des microorganismes cellulolytiques.

NG et ZEIKUS (1981) ont montré que l'importance des différentes activités de ces enzymes peut varier d'un organisme à un autre.

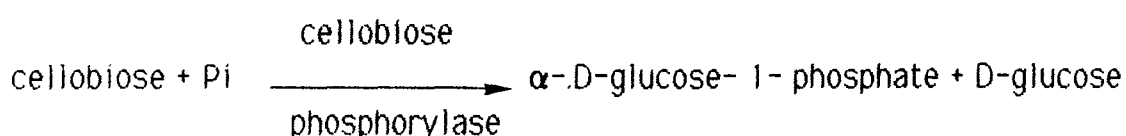
4-4 Les Oxydases

Des mécanismes enzymatiques différents peuvent intervenir dans le métabolisme de la cellulose mettant en jeu des enzymes oxydatives. Chez certains champignons, la β -glucosidase est la seule enzyme capable d'hydrolyser le cellobiose en glucose pour réduire l'inhibition par les produits finaux; chez d'autres, cette hydrolyse est réalisée par les enzymes cellobiose oxydases qui oxydent le cellobiose et les cellodextrines à plus longues chaînes en acides cellobioniques. La cellobiose quinone oxydoréductase oxyde le cellobiose en cellobionolactone. AYERS et coll., (1978) ont décrit une cellobiose oxydase chez *Sporotrichum pulverulentum*, d'après ces auteurs, cette enzyme pourrait oxyder la cellulose à une extrémité réductrice après l'action de l'endo- β -1-4-glucanase.

4-5 Les cellobioses et cellodextrines phosphorylases

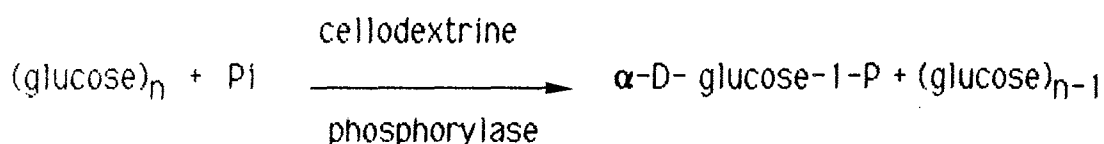
La présence d'une cellodextrine phosphorylase a été mise en évidence par SIH et Mc BEE (1955) chez *Cl. thermocellum* et chez d'autres bactéries comme *Ruminococcus flavefaciens* (AYERS, 1958-1959); *Cellvibrio gilvus* (HULCHER et KING, 1958a, 1958b) et *Cellulomonas flavigena* (SAIDANI, 1983)

4-5-1 La cellobiose phosphorylase ou cellobiose orthophosphate α -D-glucosyltransférase (Ec.2.4.1.20) catalyse la phosphorolyse réversible du cellobiose selon la réaction



4-5-2 La cellodextrine phosphorylase

SHETH et ALEXANDER (1969) ont mis en évidence une cellodextrine phosphorylase chez *Cl. thermocellum*. Elle catalyse la phosphorolyse du cellotriose, cellotétraose, cellopentaose et cellohexaose suivant la réaction



Ces phosphorylases fournissent directement des sucres phosphorylés et constituent une voie intéressante du point de vue énergétique pour la cellule. La voie phosphorolytique permet aux bactéries d'épargner une molécule d'ATP par mole de cellobiose par rapport à la voie hydrolytique.

L'utilisation phosphorolytique et hydrolytique du cellobiose est représentée sur la figure (5). Le clivage phosphorolytique du cellobiose semble être très répandu chez les bactéries (SATO et TAKAHASHI, 1967; SCHIMZ, 1981).

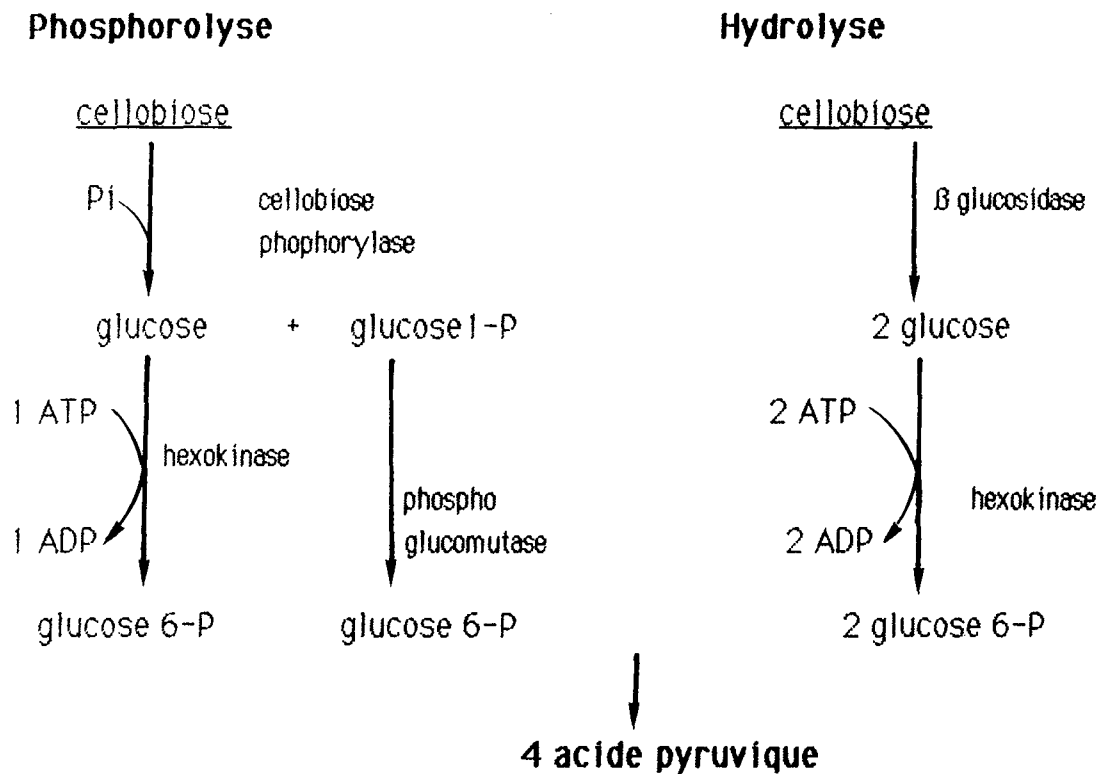


Figure 5 : Utilisation phosphorolytique et hydrolytique du cellobiose

5 - Mécanisme d'action des cellulases

Toutes ces enzymes décrites précédemment interviennent de façon complémentaire dans la dégradation de la cellulose. Il a été souvent observé que l'activité cellulasique du complexe est plus importante que la somme des activités de chacun de ses constituants.

Le mécanisme d'action des cellulases n'est pas encore bien connu. Plusieurs modèles ont été proposés:

A partir de la constatation que certains organismes capables de pousser sur des dérivés solubles de la cellulose comme la CMC sont incapables de pousser sur la cellulose native, REESE et coll. 1950, ont

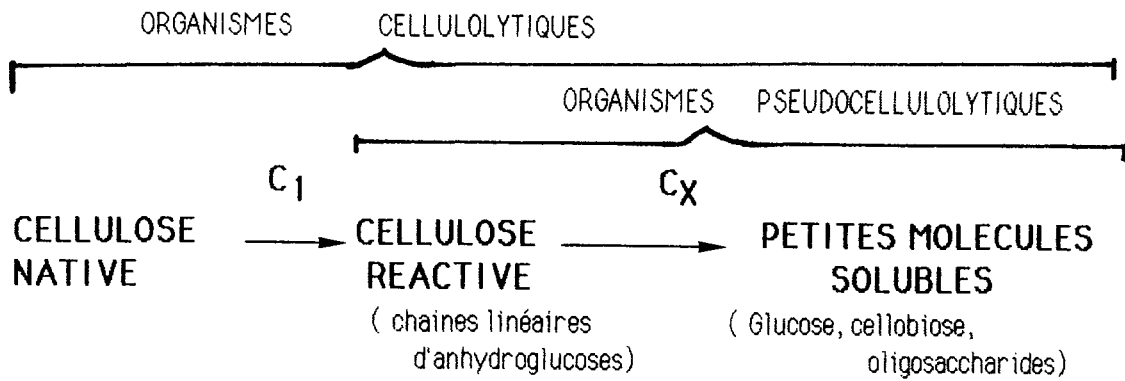


Figure 6 : Hypothèse de REESE et coll., 1950.



Figure 8 : Hypothèse de HALLIWELL et RIAZ, 1970-1971

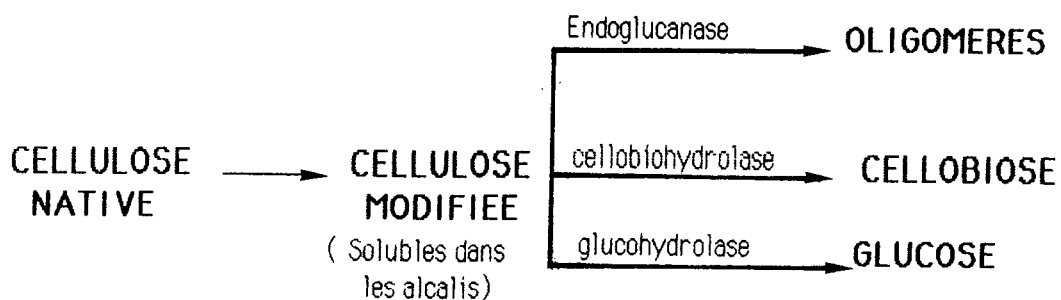


Figure 7 : Hypothèse de REESE, 1977.

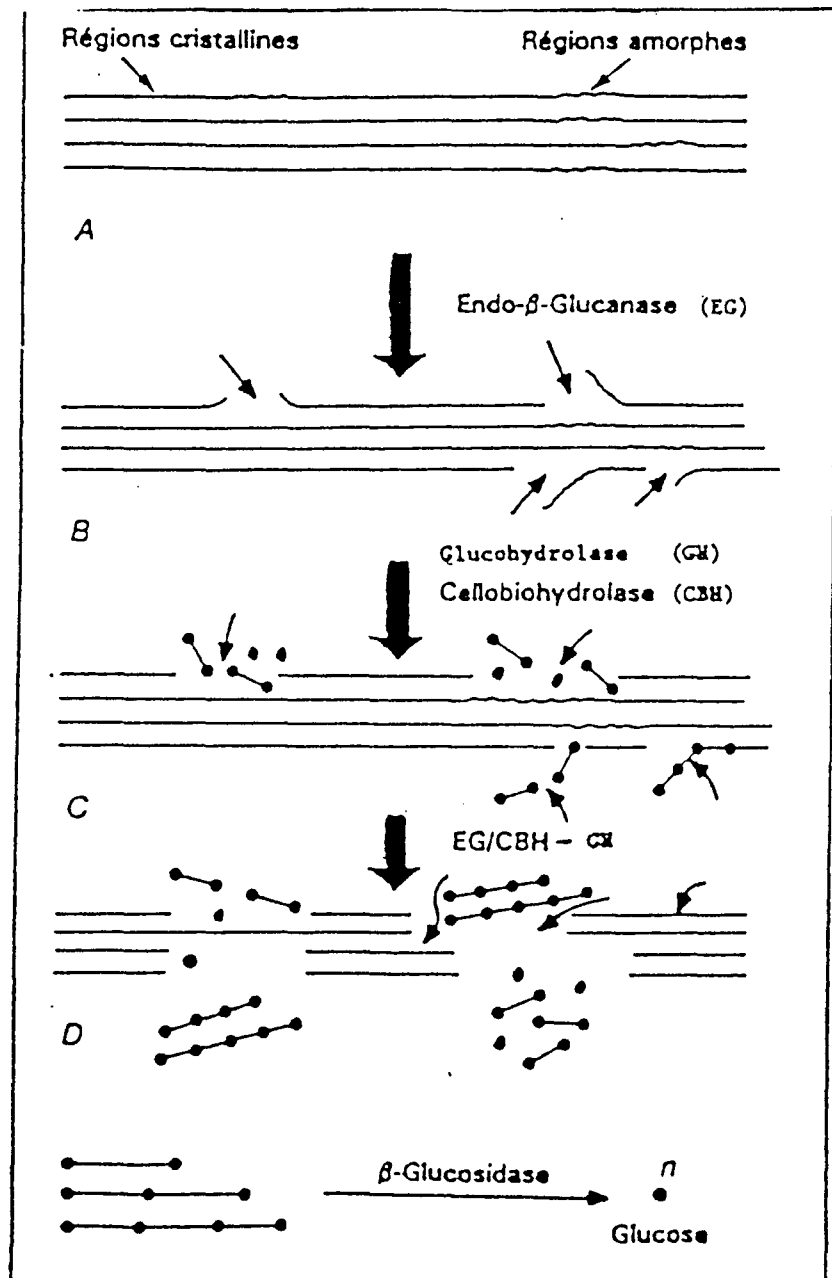


Figure 9 : Représentation schématique des étapes séquentielles de la cellulolyse.
(d'après MONTENECOURT , 1979)

émis l'hypothèse que l'hydrolyse de la cellulose cristalline hautement organisée est un mécanisme en deux étapes : une cellulase C_1 modifie la cellulose native par un processus encore mal connu en une forme réactive qui est ensuite hydrolysée en sucres solubles.

Les modèles de REESE sont représentés sur les figures (6 et 7).

Partant de la constatation que la formation de fibres courtes est associée à la fraction C_x du filtrat de culture de *Trichoderma koningii* et que ces fibres courtes ne sont saccharifiées que si le composant C_1 est présent, HAWELL et RIAZ (1970-1971) proposent un modèle dans lequel le composant C_x , comprenant les deux activités CMCase et de formation de fibres courtes, appelées C_2 , agissent dans une première étape, conduisant à la formation de fibres courtes, lesquelles sont ensuite hydrolysées par l'action des composants C_1 et cellobiase (figure 8).

Le mécanisme séquentiel du système C_1 - C_x est très discuté. WOOD et Mc CRAE (1977) ont démontré que l'action de l'endoglucanase suivie de la cellobiohydrolase libère plus de sucres réducteurs que si l'ordre de l'attaque de ces enzymes était inversé.

A partir des cellulases fongiques, MONTENECOURT et EVERTLEICH (1979) ont établi un schéma de la cellulolyse, figure (9) :

Les endoglucanases C_x initient l'attaque des régions peu cristallines de la cellulose scindant ainsi les chaînes glycosidiques et créant des extrémités non réductrices tout en dépolymérisant la cellulose. Les cellobiohydrolases C_1 détachent le cellobiose à partir des extrémités non réductrices des chaînes néoformées de façon récurrente exposant ainsi de nouvelles chaînes de la microfibrille à l'action des endoglucanases. Les interactions entre les différentes composantes du système cellulase sont encore très mal connues.

6 – Applications Industrielles des Cellulases

Malgré de nombreuses recherches effectuées dans le domaine de l'application industrielle des cellulases, elles restent encore essentiellement utilisées expérimentalement. Cependant, des souches mutantes produisant de grandes quantités de cellulases sont disponibles.

Au niveau industriel, les applications des cellulases peuvent intervenir :

- au niveau de l'extraction de la cellulose de certaines structures;
- au niveau de la production de sucres solubles à partir de la cellulose comme le glucose.

Les différentes applications industrielles sont répertoriées dans le tableau (2).

Mais pour arriver à des procédés industriellement utilisables et rentables, les problèmes d'inhibition des activités enzymatiques par les produits d'hydrolyse doivent être résolus.

Tableau 2 - Applications des cellulases

(d'après Mandels, 1985).

1 - Extraction des parois végétales :

- a) Extraction des contenus cellulaires (arômes, enzymes, polysaccharides (agar), protéines).
- b) Amélioration de la réhydratation de végétaux séchés .
- c) Augmentation de la digestibilité d'aliments très fibreux (tourteaux de graines, paille, orge)
- d) Production de protoplastes de cellules végétales (recherche scientifique).

2 - Production de glucose et de sucres solubles.

- a) Alimentation animale :
produits directs ou secondaires de la mélasse, accroissement de la valeur nutritive des aliments fibreux, protéines d'organismes unicellulaires.
- b) Produits industriels :
(colles, produits chimiques: éthanol, butanol, etc...) :
- c) Matière première de l'industrie des fermentations :
(antibiotiques, acide citrique, etc...).

3 - Production de lignine

(matière première de l'industrie chimique)

4 - Applications Alimentaires diverses

- a) Production de protéines
- b) Aliments fermentés/organismes cellulolytiques

(addition de protéines myceliennes et extracellulaires, extraction des fibres, conversion des fibres en sucres, extraction d'autres composés indésirés).

c) Protéases fongiques.

(protéases acides de *Trichoderma* pour le traitement de la viande).

7 Les mutations chez les Clostridia

La dégradation complète de la cellulose en sucres simples se heurte à une étape limitante qui est l'hydrolyse. Cette étape limitante est souvent attribuée à l'inhibition par les produits d'hydrolyse.

En général, les bactéries ont une activité cellulasique très faible comparée à celle des champignons comme *Trichoderma viride* et son mutant *Trichoderma reesei*. Ainsi la sélection des souches mutantes pouvant posséder une meilleure activité cellulasique et résistant à l'inhibition par les produits finaux permettra d'améliorer l'hydrolyse de la cellulose, la production des cellulases et de développer des procédés d'application des cellulases utilisables. En plus de l'intérêt industriel de l'amélioration de l'activité cellulasique, la mutation d'une fonction spécifique permet l'identification des gènes et la localisation du gène sur le chromosome. Les études génétiques chez les Clostridia sont très peu développées et peu de travaux ont été réalisés sur l'obtention de nouvelles souches par mutation. Mais ce problème a suscité un regain d'intérêt (JONES et WOODS, 1986b; ROGERS 1986) et des travaux ont été réalisés dans le domaine de la mutagenèse, de l'isolement des plasmides, des transferts génétiques, du clonage et de l'expression des gènes des Clostridia. A cet effet un gène codant pour l'endoglucanase de *C. cellulolyticum* a été cloné chez *Escherichia coli* par PEREZ-MARTINEZ et coll. (1988).

7-1 Mutagenèse et agents mutagènes

Selon ROWLANDS (1984), les mutagènes peuvent être divisés en deux classes : les mutagènes chimiques et les mutagènes physiques.

Dans les mutagènes chimiques, on distingue les agents alkylants tels que l'éthylméthyl sulfonate (EMS) et le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (N.T.G.); les analogues de bases, l'hydroxylamine et l'acide nitreux.

Tableau 3 : Propriétés de quelques agents mutagènes.

MUTAGENE	MECANISME de MUTAGENE	TYPE DE MUTATION INDUITE	EFFET RELATIF
1) Radiation			
rayon X, neutrons	cassure de chromosomes	délétion, inversion	élevé
U.V.	dimérisation de la pyrimidine	GC → AT, transition transversion, délétion	moyen
2) Chimiques :			
analogues de bases: 2-aminopurine 2-bromo-Uracile 5-bromodexyluridine	erreur dans la réplique- tion de l'ADN	AT → GC, transition	faible
Hydroxylamine	désamination de cytosine	GC → AT, transition	faible
Acide nitreux	désamination de cytosine ne et d'adénine	transition, délétion	moyen
NTG	alkylation des bases au niveau de la fourche de réplication	GC → AT, transition transversion, frameshift	très élevé
EMS	alkylation de guanine	GC → AT, transition	moyen

U.V. : rayon ultraviolet

N.T.G. N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

EMS : ethylmethane sulfonate

Les mutagènes physiques comprennent les rayonnements ultraviolets (UV) les rayons X.

Cette division est très artificielle sur le plan génétique. Ainsi BOWRING et MORRIS (1985) classent les mutagènes selon le type de mutation induite :

- la mutation directe qui met en jeu des mutagènes agissant au niveau de l'ADN en provoquant des erreurs d'appariement, des bases ou des erreurs dans l'ADN endommagé;

- la mutation indirecte qui opère par l'intermédiaire d'un système de réparation post répllicative qui est erroné.

Les propriétés de certains agents mutagènes sont représentées dans le tableau (3).

Des agents mutagènes comme l'EMS, le N.T.G. et les UV ont été utilisés par certains auteurs pour étudier la mutagenèse chez les Clostridia. Ainsi Bowring et Morris ont utilisé l'EMS et le N.T.G. pour obtenir des mutants de *Cl. acetobutylicum* ATCC 824.

LEMMEL et coll. (1985) ont utilisé avec efficacité l'EMS pour induire des mutants de *Cl. acetobutylicum* ATCC32-236 résistant à l'ampicilline, à l'erythromycine et au butanol 15 g/l.

DURRE et al. (1986), en utilisant l'alcool allylique ont pu obtenir des mutants défectifs dans la production de butanol chez *Cl. acetobutylicum*.

JANATI-IDRISSI et coll. (1987), en utilisant le 2-bromo butyrate ont obtenu des mutants de *Cl. acetobutylicum* défectifs dans la production de l'acétone.

Avec *Cl. thermocellum*, GOMEZ et coll. (1981) ont montré que les U.V étaient très efficaces pour induire des mutants de cette souche résistants au 5 fluoro-uracile et à la rifampicine alors que Walked (1983) a montré que les U.V et l'EMS étaient peu efficaces pour induire les mutants de *Cl. thermocellum*.

Certains auteurs ont élaboré des milieux synthétiques permettant d'obtenir des mutants d'auxotrophie: MONOT et al., (1982); LONG et al. (1983) pour *Cl. acetobutylicum*; LUNDIE et DRAVE (1984) pour *Cl. thermoaceticum* et JOHNSON et al. (1981) pour *Cl. thermocellum*

Les quelques mutants obtenus chez les Clostridia sont représentés dans le tableau (4).

Tableau 4 : Mutants obtenus chez les Clostridia .

ESPECES	METHODE de MUTATION	CARACTERISTIQUES des MUTANTS	REFERENCES
<i>C. thermocellum</i>	UV	5-fluoroUracil R rifampicine R	GOMEZ et al. 1980
<i>C. thermocellum</i>	UV ,Spon	Leu- , Ade-	MENDEZ et GOMEZ 1980
<i>C. thermocellum</i>	rayon gamma	production faible d'acide	DUONG et al. 1980
<i>C. thermocellum</i>	Spon	tolérance à l'acide	HERRERO et GOMEZ 1980
<i>C. thermoaceticum</i>	EMS	tolérance à l'acide	SCHWARIZ et KELLER 1982
<i>C. acetobutylicum</i>	EMS	rifampicine R, sporulation-	JONES et al. 1982
<i>C. acetobutylicum</i>	EMS	Arg- , Tyr- , His- , Met-	JONES et al. 1985
<i>C. acetobutylicum</i>	N.T.G.	forte production de butanol et d'acetone	HERMANN et al. 1983
<i>C. acetobutylicum</i>	N.T.G.	résistant au butanol	HERMANN et al. 1985
<i>C. acetobutylicum</i>	Spon	alcool allylique R butanol-	DURRE et al. 1986
<i>C. acetobutylicum</i>	N.T.G.	défectif dans la pro- duction d'acetone	JANATI-IDRISSI et al. 1987
<i>saccharolyticum</i>	Spon	DNase-	BLASCHEK et KLACIK 1984
<i>C. perfringens</i>	N.T.G.	DNase-	BLASCHEK et KLACIK 1984

UV : rayon ultraviolet

Spon : mutation spontanée

EMS: ethylmethane sulfonate

N.T.G. : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

MATERIEL et METHODES

1 - Microorganisme utilisé

Nos expériences ont été réalisées avec la souche de *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319 isolée au laboratoire à partir d'herbes en décomposition provenant d'un jardin de Chavigny près de Nancy (PETITDEMANGE et coll. 1984).

C'est une bactérie cellulolytique mésophile, anaérobie stricte à spore terminale déformante. Les cellules se présentent sous la forme de bâtonnets mobiles droits ou flexueux de 3 à 6 μ de long sur 0,5 à 0,7 μ de large. Sa température optimale de croissance se situe aux alentours de 35°C.

2 - MILIEUX de CULTURE

Le milieu de culture de base est celui décrit par WEIMER et ZEIKUS (1977) légèrement modifié. Les modifications portent sur l'augmentation de la concentration en extrait de levure (de 2 g/l à 5 g/l), la suppression de Na_2S compensée par une augmentation de la quantité de chlorhydrate de cystéine (1 g/l).

Deux autres milieux dérivant du milieu de base ont été utilisés. Ces deux milieux contiennent en plus des éléments du milieu de base, de l'urée (Prolabo) à 2,1 g/l, ou de l'urée (2,1g/l) plus du MOPS (MOPS, calbiochem-BEHRING Corp) à 10 g/l. Le pH de ces milieux est ajusté à 8.

En plus de ces trois milieux de même composition de base, les cultures ont été également réalisées sur le milieu DMS1 décrit dans le catalogue "Deutsche Sammlung Von Microorganism (DMS, la collection allemande de microorganismes). Le pH de ce milieu est ajusté à 7,7.

La composition de ces différents milieux de culture est décrite dans le tableau (5). Les proportions sont indiquées en g/l d'eau distillée.

3 - SOURCES DE CARBONE

Différents substrats carbonés ont été utilisés

- le cellobiose (LABOSI)
- le xylose (MERCK)
- la cellulose MN 300 (MACHEREY et NAGEL, Serva Feinbiochemica, Heidelberg R.F.A.). C'est une cellulose chimique faiblement cristalline

Tableau 5 : Différents milieux de culture utilisés pour la croissance de *Cl. cellulolyticum*.

MILIEUX (g/l)	WZ	CM3	CM3+Urée	CM3+Urée+ MOPS	DMS1
KH ₂ PO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5	0,143
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	2,9	2,1	2,1	2,1	0,55
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
MgCl ₂ ,6H ₂ O	1	1	1	1	1
CaCl ₂	0,15	0,15	0,15	0,15	0,13
FeSO ₄ ,7H ₂ O ^a	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	0,44 ml
Extrait de levure	2	5	5	5	4,5
Resazurine ^b	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
Urée	-	-	2,1	2,1	-
MOPS	-	-	-	10	-
NaHCO ₃	-	-	-	-	2
Na β-glycero-P	-	-	-	-	6
Chlorhydrate de cystéine	-	1	1	1	0,4
Na ₂ S + chlor. ^c	0,4 ml	-	-	-	-

WZ : milieu WEIMER - ZEIKUS

a) solution de Fe₂SO₄,7H₂O à 5 % dans l'eau distillée pour les différents milieux CM3 et à 0,23 % pour le milieu DMS1.

b) solution de résazurine à 0,2 % dans l'eau distillée. Cette solution n'est pas ajoutée dans les cultures en fermenteur.

c) solution de chlorhydrate de cystéine 1,25 % et Na₂S,9 H₂O 1,25 %

ayant des fibres de 2 à 20 μ de long.

- la cellulose microcristalline Avicel PH 101 (Fluka chemie AG);
 - la cellulose Solka floc (Brown Compagny , fournie par la société Graham à Montrouge) qui est une cellulose provenant du bois.
 - la carboxymethylcellulose (CMC, Fluka AG, Buchs SG) qui est une cellulose substituée.
 - le xylane (SIGMA)

Les substrats carbonés sont ajoutés directement au milieu de culture avant stérilisation.

4 – TECHNIQUES DE CULTURE

4-1- Entretien de la souche

Les souches sont entretenues régulièrement par repliquages successifs sur milieu CM3 contenant de la cellulose MN 300 comme substrat carboné à une concentration de 7,5 g/l.

4-2 Culture en milieu liquide

4-2-1 Culture en tube de Hungate

Elle se fait suivant la technique décrite par HUNGATE (1969) modifiée par BRYANT (1972) , sous atmosphère d' azote, dans des tubes de Hungate de 18 x 142 mm (Bellco). L'inoculum représente 1/10e du volume final de culture. Cette culture sert à ensemer les flacons de pénicilline.

4-2-2 Culture en Flacon type" pénicilline"

Les cultures de 50 ml sont réalisées dans des flacons type" pénicilline" et servent de préculture pour ensemer les fermenteurs.

4-2-3 Culture en Fermenteur

Elles sont réalisées dans des fermenteurs " Biolafitte" de volume 2 l. Le volume de culture final est de 1,5 l.

Pour les cultures sur substrats insolubles (cellulose) ,le fermenteur contenant le milieu de culture et la source carbonée est stérilisé à l'autoclave pendant 45 minutes à 118°C . La concentration en cellulose

dans le fermenteur est généralement de 7,5 g/l.

Pour les cultures sur substrats solubles la stérilisation se fait pendant 30 minutes à 115°C. La concentration en substrat est de 5 g/l.

Après stérilisation, l'anaérobiose est réalisée pendant la période de refroidissement par barbotage d'azote filtré stérilement. Après refroidissement, l'ensemencement se fait au 1/10e sous courant d'azote et l'incubation dans un bain-marie thermostaté à 34 °C. La culture est agitée en permanence à 50 rpm pour permettre un meilleur contact entre les enzymes et le substrat. Le pH est régulé à 7,2 avec du NH_4OH 4N.

Des prélèvements réguliers sont effectués stérilement et servent pour différentes analyses.

4-3 Culture en milieu solide

Les cultures en milieu solide sont effectuées en boîtes de Pétri. Le milieu de culture de base est alors additionné de 15 g/l d'agar. Les manipulations sont réalisées en chambre anaérobie " Forma Scientific" et les boîtes sont incubées dans des jarres BBL munies de Gaspak ($\text{H}_2 + \text{CO}_2$) pour réaliser l'anaérobiose.

5 - MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

5-1 Croissance sur substrat soluble

La croissance bactérienne est mesurée par lecture de la densité optique à 600 nm au spectrophotomètre Beckman (modèle 25).

5-2 Croissance sur substrat insoluble

Elle est estimée selon la méthode semiquantitative décrite par WEIMER et ZEIKUS (1977): une partie aliquote de la culture est agitée sur Vortex pendant 1 minute , puis on laisse décanter pendant 2 heures; la cellulose sédimente et les bactéries restent en suspension. 2 ml de surnageant de culture sont prélevés et servent à mesurer la densité optique comme pour le substrat soluble.

6- DOSAGE DES PRODUITS DE FERMENTATION

Des prélèvements de 10 ml sont effectués régulièrement au cours de la croissance bactérienne et centrifugés pendant 20 minutes à 10 000 tours/min (rotor 40); les produits de fermentation sont déterminés dans le surnageant de culture par chromatographie en phase gazeuse pour les produits volatils et par la méthode enzymatique de kits de dosage (BOEHRINGER,MANNHEIM RFA) pour le lactate.

6-1 Chromatographie

Les concentrations d'éthanol et d'acétate sont dosées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse à Fid Intersmat IGC 121F L équipé d'une colonne en verre pyrex, remplie de Porapak Q, 80-100 mesh , de diamètre intérieur égal à 2 mm et d'une longueur de 2 m . La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme . Un intégrateur Intersmat ICR IB enregistre les impulsions produites.

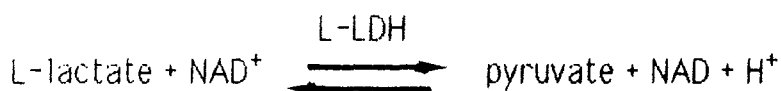
La température est de 230 °C pour l'injecteur ; celle de la colonne est de 175 °C pendant 1 minute ,puis 30 secondes à 180 °C et monte jusqu'à 225 °C et maintenue 11 minutes à cette température. Le gaz vecteur est de l'azote.

L'appareil est préalablement étalonné par une solution contenant les produits à doser à des concentrations bien définies : éthanol 2 g/l; 2 g/l; acide acétique 3 g/l; 6 g/l ; acide butyrique 4 g/l et un étalon interne le butanol-2 , 2,8 g/l.

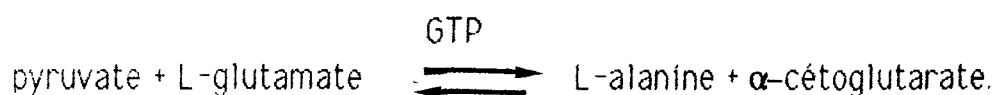
Les surnageants de culture sont acidifiés à raison de 100 µl d'HCl 6N contenant l'étalon interne pour 2 ml d'échantillon . Le volume injecté est de 2 µl. Les concentrations des produits sont calculées à partir d'un pic d'étalon interne . L'étalonnage est vérifié chaque jour avant l'injection des échantillons.

6-2 Méthodes enzymatiques

Cette méthode est utilisée pour le dosage de l'acide lactique . L'acide lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH). L'équilibre de la réaction est dirigé vers la production de lactate



La réaction est orientée vers la formation du pyruvate, en le piégeant par la glutamate pyruvate transaminase (GPT), en présence de L-glutamate.



La quantité de L-lactate est calculée par l'intermédiaire de la quantité de NADH + H⁺ formé évaluée au spectrophotomètre Beckman (modèle 25) en mesurant l'augmentation de la densité optique à 340 nm.

6-3 DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées selon la méthode de BRADFORD (1966) au bleu de Coomassie.

Réactifs.	pour 250 ml
- Bleu de Coomassie	25 mg
- éthanol 95 %	12,5 ml
- acide phosphorique	25 ml
QSP : eau distillée	250 ml

Principe de la méthode : à 100 µl d'échantillon convenablement dilué sont ajoutés 5 ml de réactif fraîchement préparé. Le mélange est agité puis laissé à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorption à 595 nm est lue contre un blanc réalisé avec de l'eau distillée et la concentration en protéines est estimée par rapport à une courbe étalon établie avec l'albumine de sérum de boeuf (Sigma) entre 0 et 100 µg/l.

6-4 DOSAGES DES SUCRES REDUCTEURS

Les sucres réducteurs sont dosés dans le surnageant de culture par la méthode de MILLER (1959).

Dosage de Miller :

Le réactif de Miller au D.N.S est préparé comme suit :

- 40 g de D.N.S.
- 8 g de phénol

- 2 g de sulfite de sodium
- 800 g de tartrate double de sodium et de potassium pour 2 l de NaOH 2%.

Le tout est complété à 4 l avec de l'eau distillée.

La réaction s'effectue en ajoutant 3 ml de réactif de Miller à 2 ml de chaque échantillon à doser. Le mélange réactionnel est placé dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Après refroidissement à la température ambiante, la densité optique est lue à 640 nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions avec 2 ml d'eau distillée. La quantité de sucres est estimée par rapport à une courbe étalon réalisée avec du glucose standard (Sigma).

Ce dosage convient pour des concentrations en sucres comprises entre 0,1 et 1 g/l.

7- DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les activités endocellulase ou CMCase, exocellulase ou paranitrophényl cellobiohydrolase (PNPCbase), xylanase sont dosées dans le surnageant de culture. L'activité cellulase totale ou avicelase est dosée dans la culture entière.

7-1 Dosage de l'activité endocellulase ou endo- β -1-4-glucanase

Elle est mise en évidence sur la carboxyméthyl cellulose (CMC), dérivé soluble de la cellulose. Cette activité, encore appelée activité CMCase; est déterminée colorimétriquement par le dosage des sucres réducteurs libérés à partir de la cellulose CMC.

Test enzymatique :

0,5 ml de surnageant de culture sont mis en contact avec 1,5 ml de solution de CMC 1% dans du tampon succinate (acide succinique NaOH) 0,05 M, PH 6,2. Après agitation sur vortex, ce mélange est incubé pendant 1 heure à 35°C au bain-marie. Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de Miller. La quantité de sucres réducteurs libérés est estimée après déduction faite de la quantité de sucres présents au temps 0 de la réaction.

L'activité enzymatique, exprimée en unité internationale, est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent

glucose par minute.

7-2 Dosage de l'activité exoglucanase ou PNP-cellobiohydrolase

L'activité exoglucanase est mise en évidence sur le para-nitrophényl- β -D-cellobioside (PNPC). Elle est déterminée par le dosage du paranitrophénol de coloration jaune libéré à partir du PNPC incolore. Sous l'action du complexe exoglucanasique, le PNPC est scindé et le PNP libéré est mesuré au spectrophotomètre suivant la méthode décrite par DESPHANDE et coll. (1984) légèrement modifiée au laboratoire. La libération de ce produit se traduit par une augmentation de la densité optique à 400 nm.

L'essai enzymatique contient :

- 1,8 ml de solution de PNPCb 1,125 % ,N₃Na 0,003 % dans du tampon phosphate 25 mM pH 7.
- 0,2 ml d'échantillon convenablement dilué.

Les densités optiques sont mesurées au temps 0 heure et après 30 minutes d'incubation à 34 °C contre un blanc réalisé avec de l'eau distillée dans les mêmes conditions. La concentration en PNP libéré est déterminée à partir d'une courbe étalon réalisée avec des concentrations connues de paranitrophénol.

L'unité internationale enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une micromole de PNP par minute.

7-3 Dosage de l'activité Avicelase ou cellulase totale

L'activité Avicelase est mise en évidence sur la cellulose Avicel PH 101 (Fluka) qui est une cellulose microcristalline. La technique de dosage utilisée est celle décrite par JOHNSON et coll. (1982) légèrement modifiée ;

Essai enzymatique : - à 3 ml d'une solution d'Avicel 10 g/l dans du tampon phosphate 25 mM pH 7,0 dans lequel est additionné 0,3 g/l d'azoture de sodium, on ajoute 1 ml d'extrait cellulaire;

- 0,5 ml de DTT 0,1 M
- 0,5 ml de CaCl₂ 1 %.

Le mélange réactionnel est agité puis incubé pendant 24 heures à 34 °C et centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes ; les sucres réducteurs sont ensuite dosés sur 2 ml de surnageant par la méthode de Miller.

L'activité enzymatique est déterminée après déduction de la quantité de sucres présents au temps 0.

L'activité avicelase, exprimée en unité internationale, est définie de la même façon que l'activité CMCase.

7 - 4 Dosage de l'activité xylanase

Elle est mesurée par la libération des sucres réducteurs à partir du xylane. L'essai enzymatique se fait de la même façon que l'activité CMCase. La quantité de sucres réducteurs libérés est déterminée à partir d'une courbe étalon réalisée avec du xylose.

L'unité internationale enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent xylose par minute.

8 - DETERMINATION DE LA PERTE DE CELLULOSE

Une partie aliquote de culture sur cellulose prélevée au début de la réaction et recueillie en fin de fermentation (environ 10 ml) est filtrée sous vide sur filtre Millipore (diamètre des pores : 0,45 μ) préalablement pesé. Une solution d'acide formique à 8% est ensuite passée sur le filtre pour lyser les cellules et les entraîner. La membrane est récupérée et séchée pendant toute une nuit à 70 °C jusqu'à poids constant. La quantité de cellulose restante est déterminée par différence entre les deux poids. Cette quantité de cellulose restante, déduite de celle présente au départ, permet de déterminer la quantité de cellulose dégradée.

9 - TECHNIQUE DE MUTATION

Nous avons utilisé la technique de mutation en milieu liquide sur une suspension de spores. L'agent mutagène est le rayonnement ultraviolet (UV).

9 - 1 Préparation des spores

Une culture de 10 ml est réalisée sur cellobiose 2 g/l en tube de Hungate. Après 15 jours d'incubation à 37°C, la culture est centrifugée à

15 000 g pendant 20 minutes . Le culot contenant des spores est lavé deux fois avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) stérile , puis remis en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. La suspension de spore ainsi obtenue est versée stérilement dans une boîte de Pétri en verre stérile munie d'un barreau aimanté.

9 – 2 Méthode de mutation et Sélection en milieu solide

La suspension de spores est ensuite exposée sous une lampe UV (254 nm) "type germicide" de 15 watts à une distance de 25 cm de la source sous agitation permanente . Après 5 minutes d'exposition aux UV , 100 µl de suspension de spores irradiées sont prélevés et étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu gélosé et de la cellulose Avicel 5 g/l comme substrat carboné. Une autre série d'étalements se fait sur le même milieu mais contenant en plus de la source carbonée , le crible de sélection .Pour notre travail le crible de sélection utilisé est le cellobiose (produit de la dégradation de la cellulose) à différentes concentrations. Les boîtes ainsi ensemencées sont ensuite incubées comme décrit précédemment. Après 8 jours d'incubation à 37 °C, les colonies de mutants présentant de larges zones de lyse apparaissent sur les boîtes. Ces colonies sont repiquées sur milieu liquide et réisolées deux fois sur leur milieu de sélection. Après le deuxième réisolement, les souches mutantes sont cultivées sur cellulose et les activités enzymatiques sont déterminées dans le surnageant de culture. Les mutants présentant une ou plusieurs activités enzymatiques améliorées par rapport à celles de la souche mère sont retenus pour les cultures en fermenteur.

10 – ELECTROPHORESE ANALYTIQUE

10-1 Technique électrophorétique

Nous avons réalisé une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS) . Cette méthode permet de mettre en évidence les différentes sous-unités d'une protéine oligomérique .

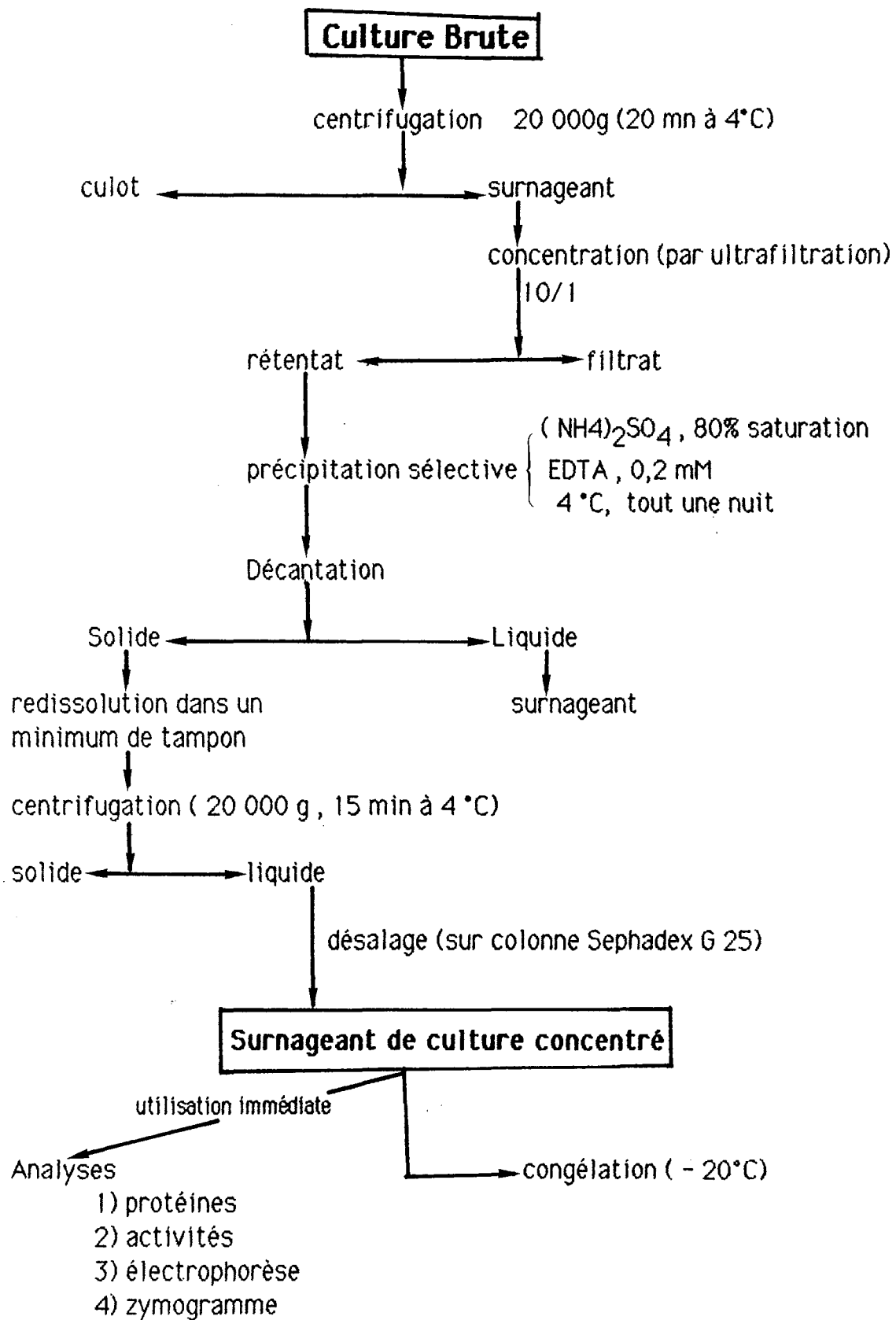


Figure 10 : schéma de préparation de l'extrait protéique.

La technique utilisée est celle décrite par LAEMLI (1960) avec une modification pour réaliser un gel en plaque verticale LKB (Pharmacia) . L'échantillon protéique provient de surnageant de culture et est préparé comme décrit comme sur la figure (10).

L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide à 10% dans du tampon tris-glycine pH 8,8 pour le gel de séparation et à 4,5 % dans du tampon tris-glycine pH 6,8 pour le stacking gel. L'intensité du courant appliqué est de 20 mA. Après migration électrophorétique, le gel est lavé avec du Triton à 2,5 % pendant 1 heure pour enlever le SDS. Les protéines sont colorées avec du bleu de Coomassie G-250 (SERVA) 0,1 % dissout dans un mélange méthanol/acide acétique/eau dans les proportions en volume suivantes 5 / 1 / 2. Après coloration, la décoloration se fait dans le même mélange dans un rapport 1 / 1/8 .

Le poids moléculaire est déterminé en se rapportant à une courbe de référence établie avec les protéines du kit de calibration (SIGMA) ; la gamme de poids va de 14 000 à 180 000).

10 - 2 Localisation des différentes activités enzymatiques

Pour la localisation des activités CMCCase et xylanase , nous avons utilisé la méthode décrite par BEGUIN et coll. (1984) légèrement modifiée. Pour la localisation de l'activité exocellulase , nous avons utilisé la méthode de WOLFANG et coll. (1987) ; un overlay est ensuite réalisée avec une solution d'agarose 0,7 % contenant 1,5 mM de Methylumbellyferyl Cellobioside (MUC) et incubé pendant 1 heure à 45 °C.

Les bandes positives sont détectées par fluorescence sous illumination UV

**OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE
CELLULASES PAR *Cl. cellulolyticum***

Chez *Cl. cellulolyticum*, la biosynthèse des cellulases est couplée à la croissance du microorganisme. Toutes les conditions de culture qui permettent d'obtenir une meilleure croissance conduisent à une plus forte production de cellulases. Pour améliorer la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*; il convient de rechercher les conditions de culture qui permettent une meilleure croissance du microorganisme.

1 - Recherche d'un milieu favorisant la production de cellulases

Certains auteurs ont préconisé que le MOPS présentait un pouvoir tampon plus important que le phosphate et favoriserait la production de cellulases (GARCIA-MARTINEZ , 1980). Ces mêmes auteurs ont montré que l'urée améliore la production de cellulases.

Dans le but d'améliorer la production de cellulases chez *Cl. cellulolyticum*, nous nous sommes proposés de rechercher un milieu de culture qui favorise la croissance de ce microorganisme et par là la production de cellulases. Ainsi deux milieux de culture ont été développés à partir du milieu de culture de base par addition de l'urée ou de l'urée et du MOPS au milieu de base. En plus de ces deux milieux nous avons également testé le milieu DMS1. Ces trois milieux ont été utilisés, en comparaison avec le milieu CM3 de WEIMER et ZEIKUS légèrement modifié pour l'étude de la croissance et de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*. Ces essais ont été réalisés en tube de Hungate. Les substrats utilisés sont : la cellulose MN 300 à 7,5 g/l et le cellobiose à 5 g/l.

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique (D.O.) et les activités enzymatiques sont mesurées au cours du temps.

1-1 Influence du milieu de culture sur la croissance bactérienne

1-1-1 Croissance sur cellulose MN 300

L'évolution de la biomasse au cours de la croissance sur cellulose MN 300 est représentée sur la figure (11). Les valeurs de la D.O. atteignent

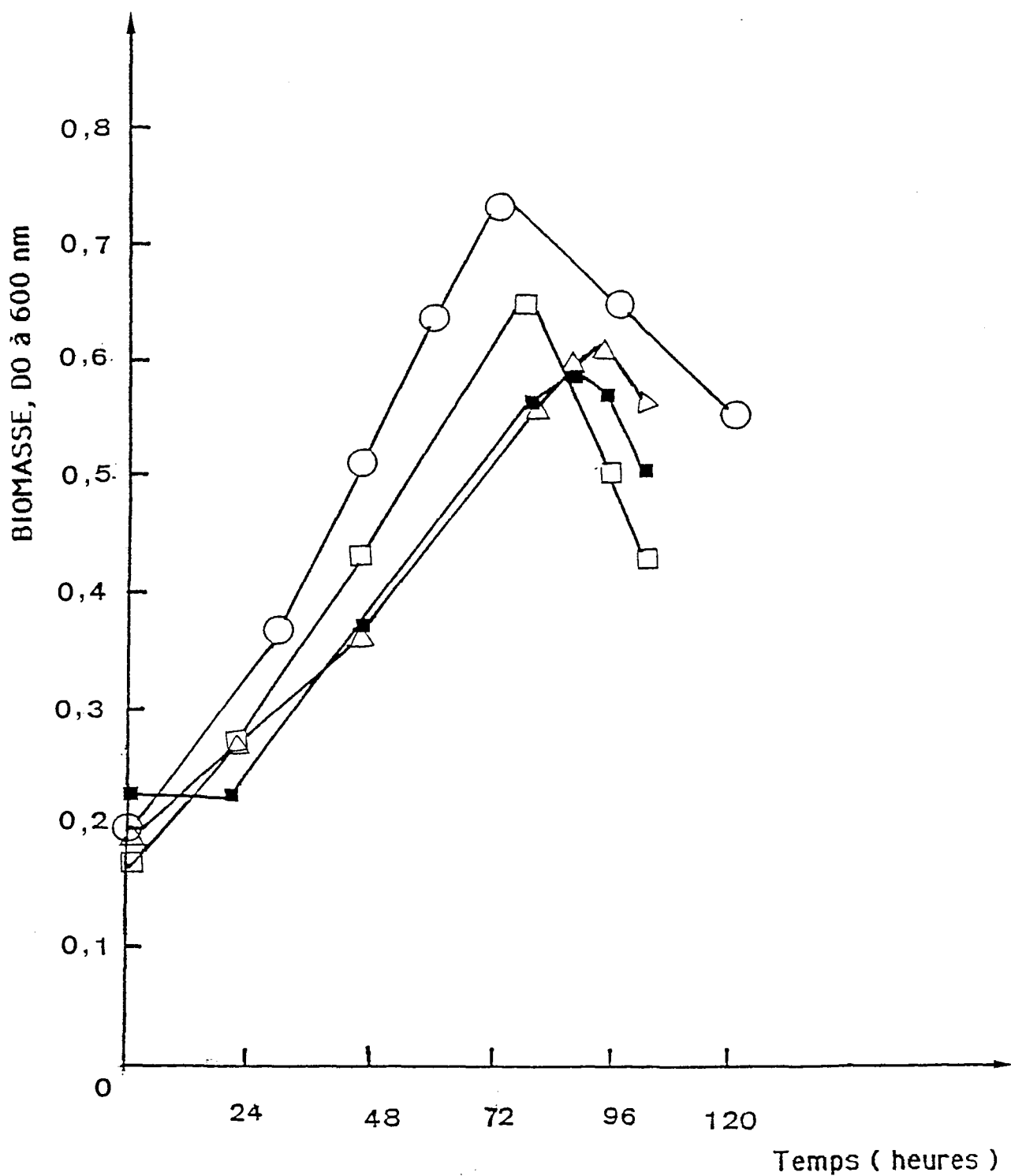


Figure 11 : Cinétique de croissance de *Cl. cellulolyticum* sur différents milieux de culture en présence de la cellulose MN 300 7,5 g/l ;
 (■) milieu CM3 ; (△) milieu CM3 + Urée ;
 (□) milieu CM3 + Urée + MOPS ; (○) milieu DMS 1 .
 Les cultures ont été effectuées en tubes de Hungate.
 Les valeurs portées sur la courbe représentent la moyenne de trois essais.

0,65 et 0,75 après 72 heures de culture pour les milieux CM3 + urée et DMS1.

On constate que la croissance bactérienne est améliorée en présence de l'urée (2,1 g/l), elle l'est davantage sur le milieu DMS1.

Nous avons observé que la baisse du pH au cours de la croissance sur cellulose MN 300 est progressive en présence du MOPS; il se maintient au dessus de pH 6 pour les quatre milieux.

1-1- 2 Croissance sur cellobiose

Les résultats obtenus avec le cellobiose sont représentés sur la figure (12).

Lors de la croissance de *Cl. cellulolyticum* sur cellobiose ,le pH chute rapidement et tombe en dessous de pH 5 pour les milieux CM3 et CM3+ urée. Cette chute bloque la croissance qui n'atteint que des valeurs de DO de 0,31 et 0,34.

L'addition du MOPS au milieu CM3 + Urée entraîne une diminution progressive du pH et la croissance se poursuit pour atteindre une D.O. de 0,91.

On constate que la croissance sur cellobiose est améliorée en présence du MOPS ; elle est multipliée par 3 (la D.O. passe de 0,31 à 0,91).

Le milieu DMS1 contient du bicarbonate de soude qui exerce un effet tampon ce qui entraîne une diminution progressive du pH et une meilleure croissance . La DO maximale obtenue sur le milieu DMS1 est de 0,95 après 78 heures de culture alors qu'elle n'est que de 0,59 sur milieu CM3 après 66 heures de culture.

1-2 Influence du milieu de culture sur la production de cellulases

1-2-1 Culture en tube de Hungate

Dans les conditions de culture en tube de Hungate contenant différents milieux décrits précédemment , nous avons suivi l'évolution de la production des activités cellulases en fonction du temps sur cellulose MN 300 et sur cellobiose :

- avec la cellulose MN 300 les résultats obtenus sont rassemblés

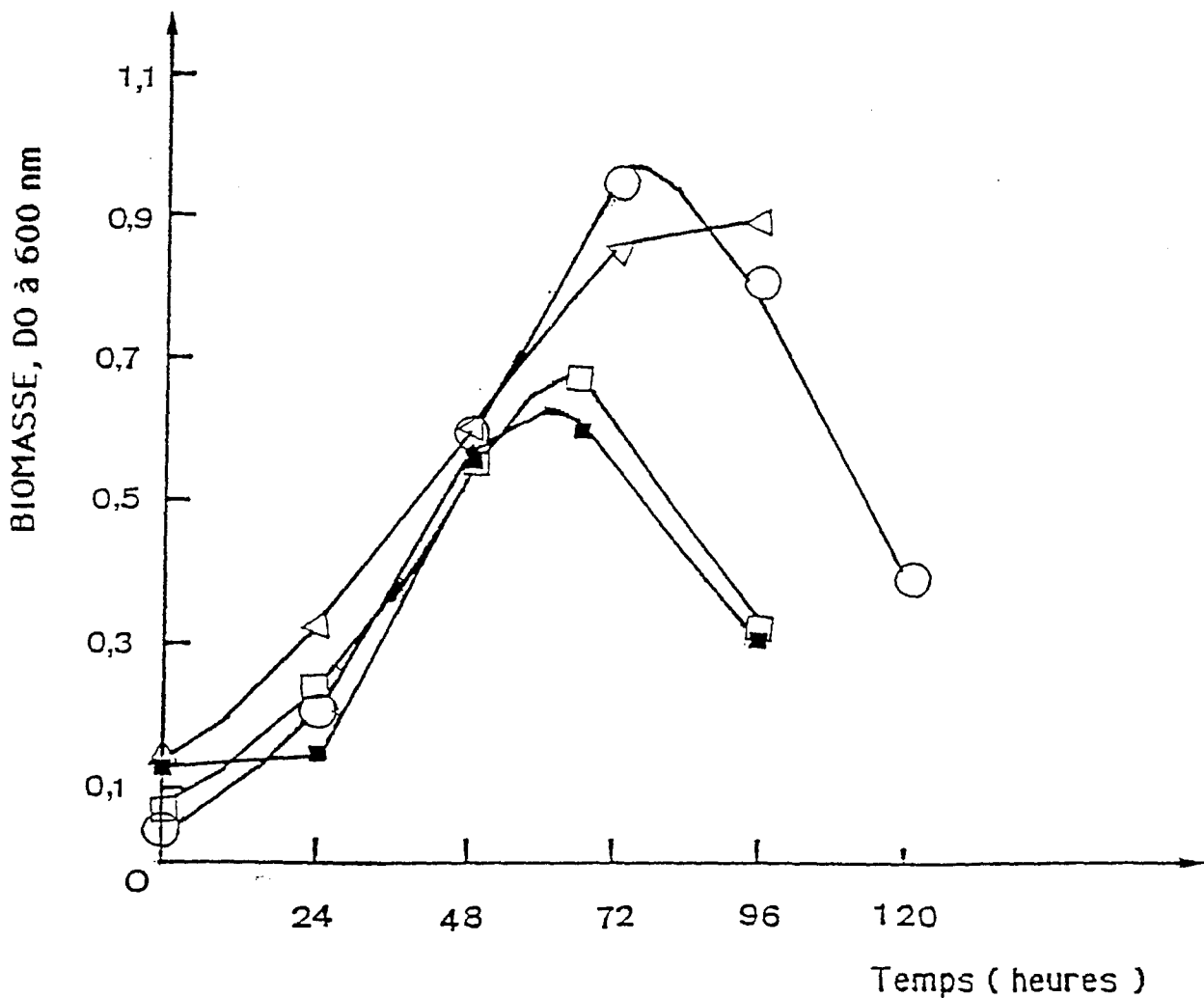


Figure 12 : Cinétique de croissance de *Cl. cellulolyticum* sur différents milieux de culture en présence de cellobiose 5 g/l;

(■) milieu CM3 ; (□) milieu CM3 + Urée

(△) milieu CM3 + Urée + MOPS ; (○) milieu DMS1.

Les cultures ont été réalisées en tubes de Hungate.

Les valeurs portées sur la courbe représentent la moyenne de trois essais

dans les tableaux (6_A) pour l'activité CMCase et (6_B) pour l'activité exoglucanase. Il ressort de l'étude de ces tableaux que sur le milieu CM3 + urée, on obtient des activités CMCase et exoglucanasiques supérieures à celles observées sur le milieu CM3 notamment à 72 heures de culture. L'addition de MOPS au milieu CM3 + urée n'améliore pas les deux activités.

Sur le milieu DMS1, la production des activités cellulases est considérablement plus élevée par rapport à celle produite sur le milieu de référence CM3 notamment à 96 heures de culture. L'activité endoglucanase est multipliée par 2, elle atteint des valeurs de 0,064 UI/ml sur milieu CM3 et 0,114 UI/ml sur milieu DMS1 ; l'activité exoglucanase passe de 1,312 mUI/ml à 4,44 mUI/ml soit une augmentation d'un facteur de 3.

Avec le cellobiose comme substrat, les résultats sont rassemblés dans le tableau (7_A) et (7_B).

L'étude de ce tableau montre que l'activité exoglucanase est nettement plus élevée après addition de MOPS au milieu CM3 + urée. Elle passe de 0,05 mUI/ml sur milieu CM3 + urée à 1,70 mUI/ml sur milieu CM3 + urée + MOPS.

Sur le milieu DMS1, la production de l'activité CMCase est nettement améliorée, passant de 0,035 UI/ml sur milieu CM3 à 0,110 UI/ml sur milieu DMS1. Par contre, l'activité exoglucanasique reste voisine de la valeur obtenue sur milieu CM3 + urée + MOPS.

Les résultats obtenus laissent à penser que le milieu CM3 serait pauvre en azote.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'effet de différentes sources d'azote sur la formation de cellulases par *Cl. cellulolyticum*. Ainsi, l'urée et le chlorure d'ammonium ont été testés en comparaison avec le sulfate d'ammonium contenu dans le milieu CM3. Les résultats sont rassemblés dans le tableau (8). Il ressort de l'étude de ce tableau que l'addition du chlorure d'ammonium améliore la production de l'activité exoglucanase.

Conclusion :

L'étude de l'influence des différents milieux de culture sur la formation de cellulases par *Cl. cellulolyticum* montre que :

a) lorsque la cellulose MN 300 est utilisée comme substrat, le meilleur milieu pour la production de cellulases est le milieu DMS1, vient ensuite le milieu CM3 + urée.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par GARCIA-

Tableau 6 : Culture sur cellulose MN 300. Influence du milieu de culture sur l'évolution de la production des activités endo (A) et exoglucanasiques (B) au cours du temps.

A

Temps (h)	CM3	CM3 + Urée	CM3 + Urée + MOPS	DMS1
	UI/ml	UI/ml	UI/ml	UI/ml
0	-	0,033	0,035	0,02
72	0,04	0,066	0,056	0,096
96	0,064	0,086	0,071	0,114

B

Temps (h)	CM3	CM3 + Urée	CM3 + Urée + MOPS	DMS 1
	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml
0	0,095	0,074	0,08	-
72	1,371	2,045	1,862	2,975
96	1,312	1,715	1,316	4,441

Tableau 7 : Culture sur cellobiose .Influence du milieu de culture sur l'évolution de la production des activités endo - (A) et exo-glucanasiques (B) au cours du temps.

A

Temps (h)	CM3	CM3 + Urée	DMS 1
	UI/ml	UI/ml	UI/ml
0	0,025	0,031	0,021
66	0,026	0,024	0,062
96	0,035	0,022	0,11

B

Temps (h)	CM3	CM3 + Urée	CM3 + Urée +MOPS	DMS 1
	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml
0	0,03	0,046	0,034	-
66	0,159	0,051	0,175	0,248
96	0,044	0,059	1,7	1,674

Tableau 8 : Influence de la source azotée sur la production de cellulases par *C. cellulolyticum*.

Source azotée	CMCase UI/ml	exoglucanase mUI/ml
témoin : sulfate d'ammonium 1,3 g/l	0,028	1,02
Urée 2,1 g/l	0,044	1,68
NH ₄ Cl 1 g/l	0,053	1,44
NH ₄ Cl 0,5 g/l	0,053	1,44
NH ₄ Cl 0,25 g/l	0,034	1,06

Les activités ont été déterminées après 96 heures de culture en flacon "type pénicilline " sur cellulose MN 300 à 7,5 g/l. Tous les flacons contiennent 5 g/l d'extrait de levure.

MARTINEZ et coll. (1980) qui ont obtenu une amélioration de la production de cellulases en présence d'urée chez *Cl. thermocellum*.

b) avec le cellobiose comme substrat, le meilleur milieu pour la production de cellulases est le milieu DMS1 suivi du milieu CM3 + urée + MOPS.

Ainsi, dans les conditions de culture en tube de Hungate, la production d'enzymes cellulolytiques est nettement améliorée sur le milieu DMS1. Une des raisons peut être le fait que le milieu DMS1 contient du NaHCO_3 (2 g/l) qui exerce un pouvoir tampon supérieur à celui du MOPS, donc freine la diminution du pH, ce qui conduit à une meilleure croissance d'où une meilleure production de cellulases. Il est à noter que les travaux antérieurs ont démontré que la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* était croissance dépendante (PIERSON, 1984).

L'amélioration de la croissance et de la formation de cellulases sur le milieu DMS1 peut être due aussi à l'utilisation directe par *Cl. cellulolyticum* du Na- β -glycérophosphate inclus dans le milieu DMS1.

De plus nous avons également observé qu'une supplémentation du milieu CM3 en azote (addition d'urée) entraîne une augmentation de la production de cellulases. Ce résultat montre que le milieu CM3 est pauvre en azote. D'autre part on a pu constater qu'une concentration de 2,1 g/l d'urée n'est pas toxique pour *Cl. cellulolyticum* malgré la présence de 5 g/l d'extrait de levure dans le milieu de culture. Cette observation est à rapprocher de celle faite par GARCIA-MARTINEZ (1980). Ces auteurs ont montré que l'urée (2,1 g/l) est tolérée par *Cl. thermocellum* en présence d'une forte concentration d'extrait de levure (6 g/l).

A la suite de ces observations, nous avons défini un milieu CM3 "amélioré" qui est le milieu de culture de base supplémenté en azote par addition d'une solution de NH_4OH 4 N. Cette solution servira à la régulation de pH lors des cultures en fermenteur.

1-2-2 Culture en fermenteur

Le milieu DMS1 s'est révélé très prometteur pour la production de cellulases lors de culture de *Cl. cellulolyticum* sur cellulose MN 300 en tube de Hungate. Afin de déterminer un milieu qui favorise la production de cellulases par cette souche, une fermentation en batch de la cellulose Avicel 7,5 g/l a été réalisée sur le milieu CM3 "amélioré" et le milieu

DMS1. Au cours de cette fermentation, nous avons suivi la production des activités cellulases. Seule une faible activité CMCase est décelée dans le milieu DMS1. Les résultats sont illustrés par la figure (13). L'activité exocellulasique n'a pu être décelée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que sur milieu DMS1, en présence de cellulose Avicel, le complexe "Bactérie-Enzymes-cellulose ne se dissocie pas en bactéries et cellulases. Le milieu CM3 " amélioré" est donc le meilleur milieu pour la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*.

1-3 Application :

A la suite de ces résultats, le milieu DMS1 a été utilisé à l'I.A.T.A. de Valencia avec *Cl. cellulolyticum* dans une fermentation préparative du complexe cellulasique (14 litres) sur papier filtre à 5 g/l.

Comparativement aux activités observées à 8 jours pour *Cl. cellulolyticum* mise en culture sur cellulose Avicel à 7,5 g/l sur milieu CM3 amélioré, la culture en milieu DMS1 en présence de la cellulose papier filtre comme source carboné conduit à des résultats importants en ce qui concerne les activités CMCase et avicelase; par contre ces mêmes activités sont faibles le substrat utilisé est la cellulose Avicel ainsi que le montre le tableau (9). De plus, une quantité suffisante des protéines du complexe enzymatique a été obtenue ; elle a permis de mener à bien les essais de purification , de concentration ainsi que la séparation électrophorétique et l'identification des éléments du complexe enzymatique.

1-4 Conclusion

L'influence du milieu de culture sur la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* dépend de la nature du substrat carboné utilisé. Ainsi le milieu DMS1 convient aux fermentations réalisées sur cellulose papier filtre voire même cellulose MN 300 ; le milieu CM3 amélioré convient à celles réalisées sur cellulose Avicel.

Nos expériences seront poursuivies avec le milieu CM3 "amélioré " .

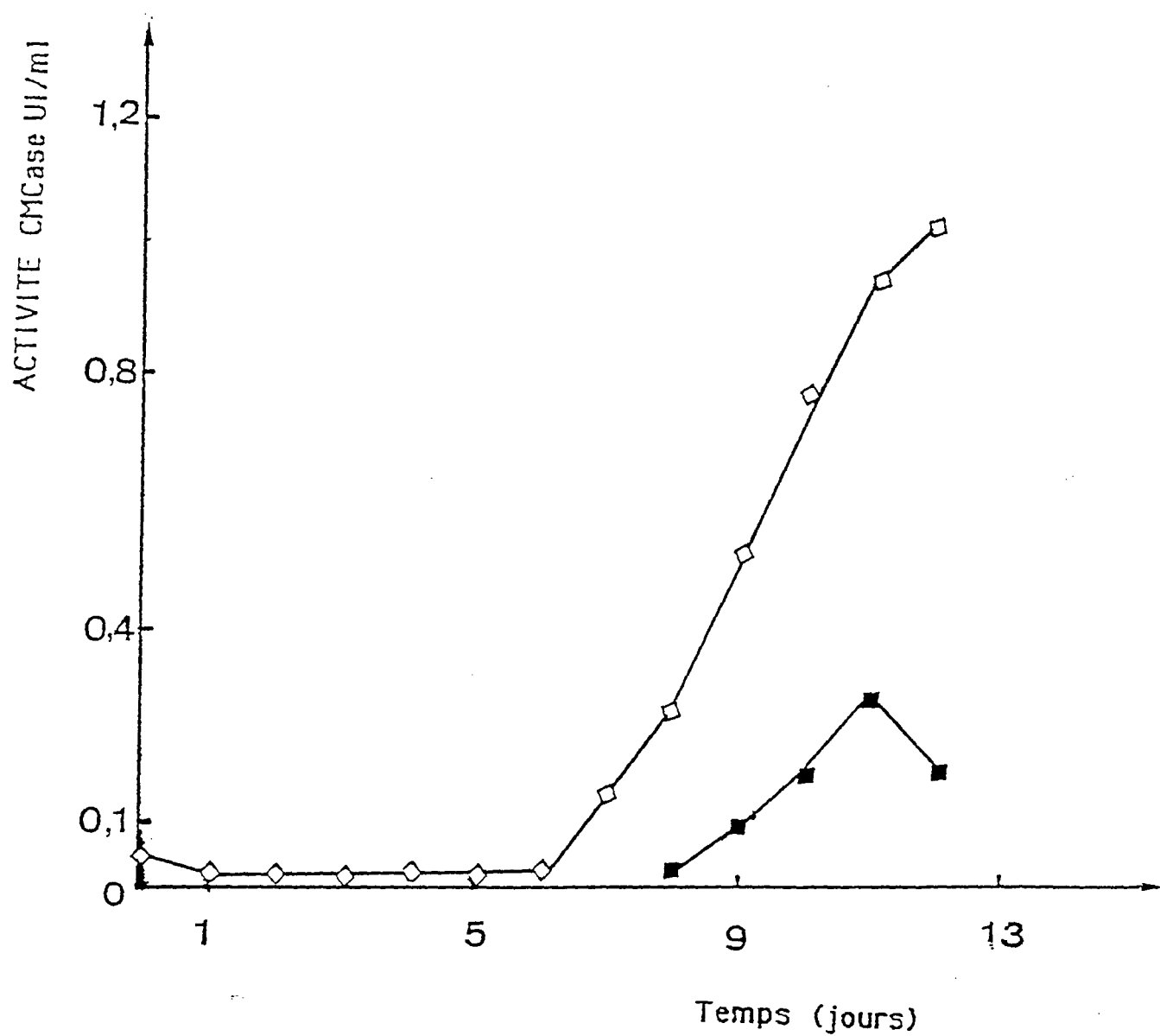


Figure 13 : Culture de *Cl. cellulolyticum* sur cellulose Avicel 7,5 g/l : Production comparée de l'activité CMCase sur milieu CM3 amélioré (◇) et sur milieu DMS1 (■).

Tableau 9 : Production comparée des activités cellulases sur milieu CM3 et milieu DMS 1.

Activités	Milieu CM3 sur Avicel	Milieu DMS1 sur Avicel	Milieu DMS1 sur papier filtre
CMCase UI/ml	0,37	0,015	0,015
Avicelase mUI/ml	1,5	0,2	3,03
Xylanase UI/ml	0,29	N.D	0,43

Les activités ont été déterminées après 8 jours de fermentation de la cellulose Avicel à 7,5 g/l et de la cellulose papier filtre à 5 g/l.

N.D. : non déterminée.

2 - Recherche de mutants de *Cl. cellulolyticum*

2 - 1 Travail préliminaire

Une première étude a consisté en la recherche de cribles de sélection. Ces cribles introduits dans le milieu de culture pouvant soit inhiber les activités cellulases, soit réprimer la biosynthèse des cellulases. PIERSON (1984) a démontré que le système "cellulase" de *Cl. cellulolyticum* est constitutif mais qu'il est soumis à des régulations.

Dans un premier temps, l'étude a porté sur les sucres issus de la cellulolyse : glucose et cellobiose. Les résultats sont rassemblés dans le tableau (10).

Tableau 10 - Action des sucres : glucose et cellobiose sur la cellulolyse en boîtes de Pétri.

Substrat	"Avicel" 7,5 g/l Témoïn	Avicel 7,5 g/l + glucose g/l			Avicel 7,5 g/l + cellobiose g/l									
		5	10	15	1	2	3	4	5	6	8	10	15	
Formation de colonies	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lyse de la cellulose autour des colonies	+	+	+	+	+	+	+	+	W (w)	-	-	-	-	

Les incubations ont été effectuées à 35°C pendant 3 à 5 jours.

+: positif

w : faible

Ce tableau montre que le cellobiose exerce une action négative sur la cellulolyse. Mais au-delà de 6 jours d'incubation, le cellobiose est métabolisé et des zones de lyses apparaissent autour des colonies.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché des sucres non métabolisables, les produits finaux de la fermentation ainsi que des substances toxiques (tunicamycine) exerçant une action négative sur la cellulolyse. Les résultats sont rassemblés dans le tableau (11).

Il ressort de l'étude de ce tableau que le désoxyglucose et le lactose correspondent à cette définition pour des concentrations supérieures à 1 g/l ; de même, la tunicamycine, à très faible concentration, exerce une action négative sur la cellulolyse.

Comme l'un de nos objectifs est d'obtenir des mutants désensibilisés aux sucres qui pourront accumuler des sucres réducteurs dans le milieu de culture et hyperproduire des cellulases, le cellobiose et la tunicamycine ont été choisis comme cribles de sélection. Les concentrations en tunicamycine empêchant l'apparition de la cellulolyse en boîtes de Pétri ont été précisées (tableau 12) : pour 0,05 $\mu\text{g/ml}$, une lyse légère apparaît dès 0,1 $\mu\text{g/ml}$ et au delà, on n'observe plus rien. On retiendra donc 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pour les essais de mutagenèse.

Tableau 11 - Recherche de composés non métabolisables exerçant une action négative sur la cellulolyse.

Composés	Croissance	Lyse de cellulose sur substrat AVICEL 5 g/l + le sucre aux concentrations en g/l				
		0,3	0,5	1	5	10
Témoin cellobiose	+	+	+	+	W	-
Butanol	+	+	+	+	+	-
2-Desoxyglucose	+	+	W	-	-	-
gentiobiose	-	+	+	+	++	N.D.
glycérol	-	+	+	-	-	-
Lactose	-	W	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	N.D.	N.D.
Acide acétique	+	+	+	+	W	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+

Les cultures sont effectuées en boîtes de Pétri. L'incubation est réalisée à 35°C pendant 3 à 5 jours. Une deuxième lecture est effectuée au bout de 7 jours

N.D. : non déterminé.

+ : positif ; - : négatif

++ : très positif ; W : faible

Tableau 11 : Action de la tunicamycine sur la cellulolyse en boîte de Petri

concentration en tunicamycine $\mu\text{g/ml}$	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1
croissance	++	+	-	-	-	-	-
lyse de la cellulose autour des colonies	+	w	-	-	-	-	-

+ : positive

++ : très positive

- : négative

w : faible

Les cultures sont réalisées sur cellulose Avicel 7,5 g/l . Différentes concentrations en tunicamycine sont ajoutées au milieu de culture . Les incubations ont été effectuées à 35 °C pendant 6 jours.

Nous nous sommes ensuite posés la question de savoir si le cellobiose est inhibiteur des activités cellulases. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé l'étude suivante :

à une culture témoin réalisée sur cellulose MN 300 on ajoute le cellobiose à 4-5 et 6 g/l et on compare leurs activités. L'activité CMCase n'est pas affectée, mais l'activité avicelase l'est fortement. A 4 g/l le cellobiose inhibe 70 % de l'activité avicelase; à 5 g/l, 80 % et à 6 g/l, 83 %.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux indiqués dans la littérature pour *Cl. thermocellum* chez qui le cellobiose à 2 g/l inhibe 50 % de l'activité exocellulase (SHINMYO et coll. (1979) ; JOHNSON et coll. (1982).

2 - 2 MUTAGENESE

Par l'emploi du rayonnement ultraviolet comme agent mutagène, près de 200 colonies mutantes ont été isolées. Après repiquages successifs indispensables à l'entretien des souches, près de la moitié d'entre elles se sont révélées instables. Parmi les colonies mutantes restantes, 30 ont fait l'objet d'une étude de la croissance et de la production de cellulases. Des souches améliorées par rapport à la souche mère ont été obtenues. Ces souches mutantes présentent des meilleures activités soit exocellulases, soit endocellulases, soit encore les deux ou sont moins inhibées par le cellobiose que la souche mère.

La production comparée des activités enzymatiques par la souche mère et les souches mutantes est représentée dans le tableau (13).

Un de ces mutants le mutant n° 42 est particulièrement intéressant. Il présente en culture une biomasse deux fois supérieure à celle de la souche mère ainsi que des activités endo et exoglucanase deux fois supérieures à celle de la souche mère.

Pour la suite de notre travail, nous avons retenu le mutant n° 42 pour les études comparées de la dégradation des substrats celluloses et de la production de cellulases avec la souche mère de *Cl. cellulolyticum*. Ce mutant a été isolé sur cellulose Avicel 7,5 g/l en présence du cellobiose 5 g/l comme crible de sélection .

Tableau 13 : Production comparée des activités endo et exoglucanasiques par les souches mutantes isolées et la souche mère *C. cellulolyticum* ATCC 35 319.

Souches	Endoglucanase UI/ml	Exoglucanase mUI/ml
Souche mère	0,034 (100 %)	2,190 (100 %)
mutants : n° 42	0,084 (242)	4,854 (222)
n° 49	0,037 (109)	4,432 (202)
n° 71	0,034 (100)	3,748 (171)
n° 84	0,072 (212)	1,645 (75)
n° 85	0,030 (88)	4,892 (223)
n° 93	N.D.	4,050 (185)
n° 98	0,058 (170)	2,10 (96)
n° 103	0,064 (188)	- -
n° 106	0,063 (185)	- -
n° 121	0,057 (168)	- -
n° 126	0,066 (194)	- -

N.D. : non déterminé

La souche mère et les souches mutantes ont été cultivées en tubes de Hungate sur milieu CM3 contenant 7,5 g/l de cellulose MN 300 pendant 5 jours à 37°C.

Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent l'amélioration et sont exprimées en comparaison avec celle de la souche sauvage comme ayant 100 % d'activité.

3 – Recherche du substrat le mieux adapté à la production de cellulases.

Dans le but de trouver le substrat le mieux adapté à la formation de cellulases, nous avons étudié l'influence de différents substrats cellulosiques sur la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42 : cellulose MN 300, Avicel et Solka Floc utilisés comme source de carbone à une concentration de 7,5 g/l et déterminé les produits de fermentation.

Des fermentations en batch de ces trois substrats cellulosiques ont été réalisées sur milieu CM3 avec régulation de pH à 7,2 par une solution de NH_4OH 4N. Au cours de ces fermentations nous avons suivi la production des différentes activités enzymatiques par les deux souches.

3 – 1 Influence de la nature du substrat sur la production des activités cellulasiqes par *Cl cellulolyticum*

3 – 1 – 1 Production de l'activité CMCase

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure (14 A).

- Sur cellulose MN 300, l'activité endoglucanase libérée dans le milieu de culture augmente progressivement à partir du 5^e jour jusqu'au 12^e jour où elle atteint son maximum et se stabilise. La valeur maximale obtenue est de 0,5 UI/ ml.

- Sur cellulose Avicel, la libération de cette enzyme dans le milieu de culture est lente. A partir du 7^e jour, elle augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 0,625 UI/ ml au 14^e jour de fermentation.

- Sur cellulose Solka Floc, cette enzyme est détectée dans le milieu de culture à partir du 3^e jour ; elle augmente progressivement et atteint une valeur maximale de 0,18 UI/ ml au 9^e jour de fermentation.

Conclusion : les résultats obtenus montrent que le meilleur inducteur de l'activité endoglucanasique pour *Cl. cellulolyticum* est la cellulose Avicel.

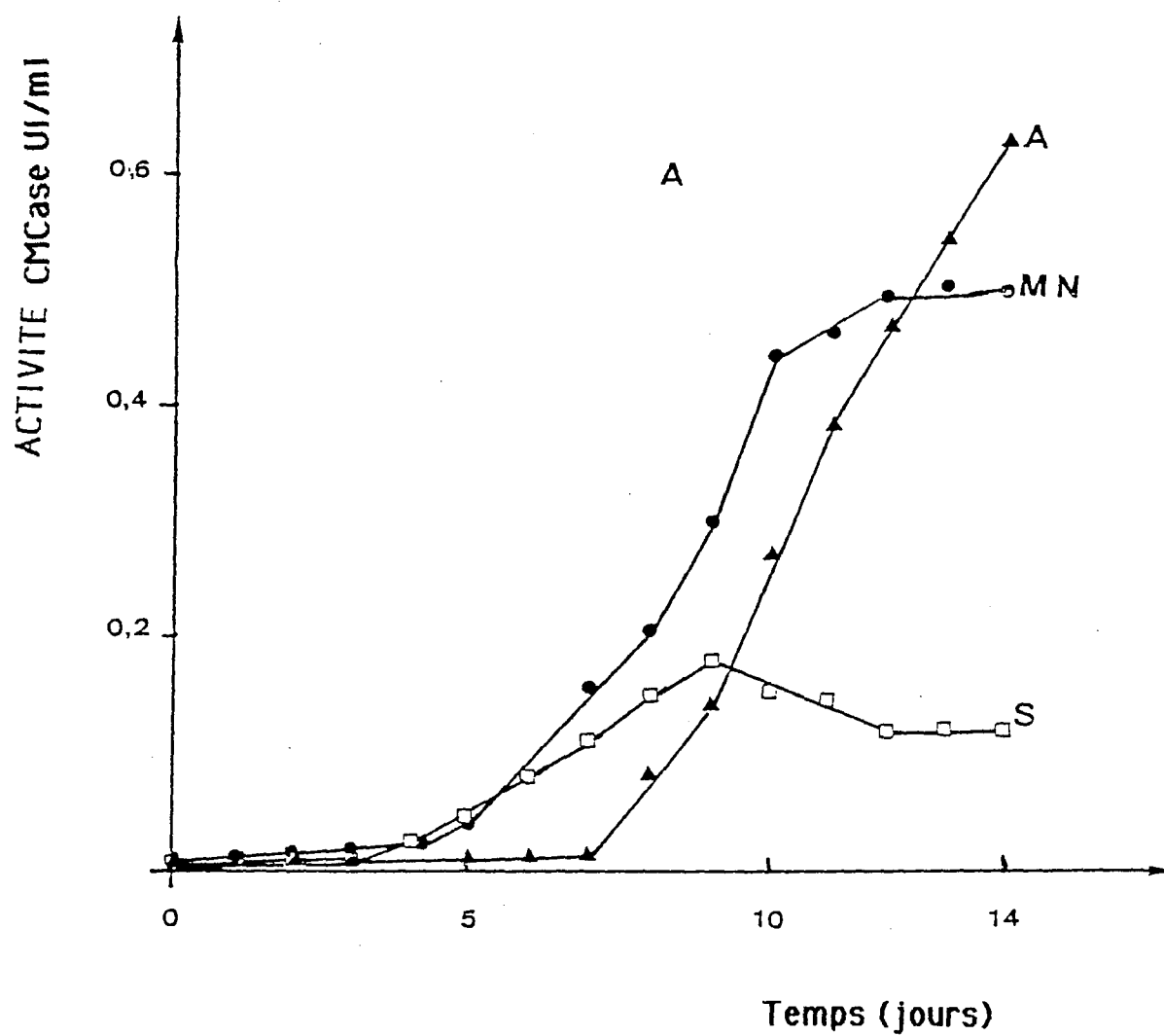


Figure 14 A - Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité CMCase par *Cl. cellulolyticum*.

- (●) cellulose MN 300 ,
- (▲) cellulose Avicel ,
- (□) cellulose Solka Floc.

3 - 1 - 2 Production de l'activité Avicelase

Pour l'ensemble des trois substrats , on observe une très faible production de cette enzyme . Les résultats sont représentés sur la figure (14 B) .

On constate que la production de cette enzyme se fait de façon similaire pour les substrats cellulosiques MN 300 et Avicel . Les valeurs maximales obtenues sont voisines de 2 mUI / ml .

Sur la cellulose Solka Floc , la production de cette enzyme est plus élevée que sur les deux autres substrats ; la valeur maximale obtenue est de 3 mUI/ ml.

Pour cette activité le meilleur inducteur est la cellulose Solka Floc.

3 - 1 - 3 Production de l'activité PNPCbase

La production de l'exoglucanase est dans l'ensemble faible sur les trois substrats . Les résultats sont représentés sur la figure (14 C) .

- sur cellulose MN 300 , la valeur maximale obtenue est de 2,7 mUI / ml et elle est atteinte au 10e jour de fermentation.

- sur cellulose Avicel , elle apparaît beaucoup plus précocement , augmente ensuite de façon linéaire et atteint un maximum de 4,2 mUI/ ml au bout de 7 jours de fermentation. Une baisse de l'activité de cette enzyme est observée du 7e au 10e jour .

- sur cellulose Solka Floc , la production de l'activité PNPCbase varie dans le même sens que sur la cellulose Avicel. La valeur maximale obtenue est de 4,1 mUI/ ml . Elle est obtenue après 6 jours de fermentation.

Pour l'activité exoglucanase, le meilleur inducteur est la cellulose Avicel.

3 - 2 Influence de la nature du substrat sur la production des activités cellulases par le mutant n° 42 .

3 - 2 - 1 Production de l'activité CMCCase

La production de l'activité CMCCase est similaire pour les substrats cellulosiques MN 300 et Solka Floc . Les valeurs maximales obtenues sont de 0,25 UI/ ml et sont atteintes au 9e jour de fermentation. Cette activité diminue ensuite entre le 9e et le 11e jour de fermentation.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (15 A) .

B

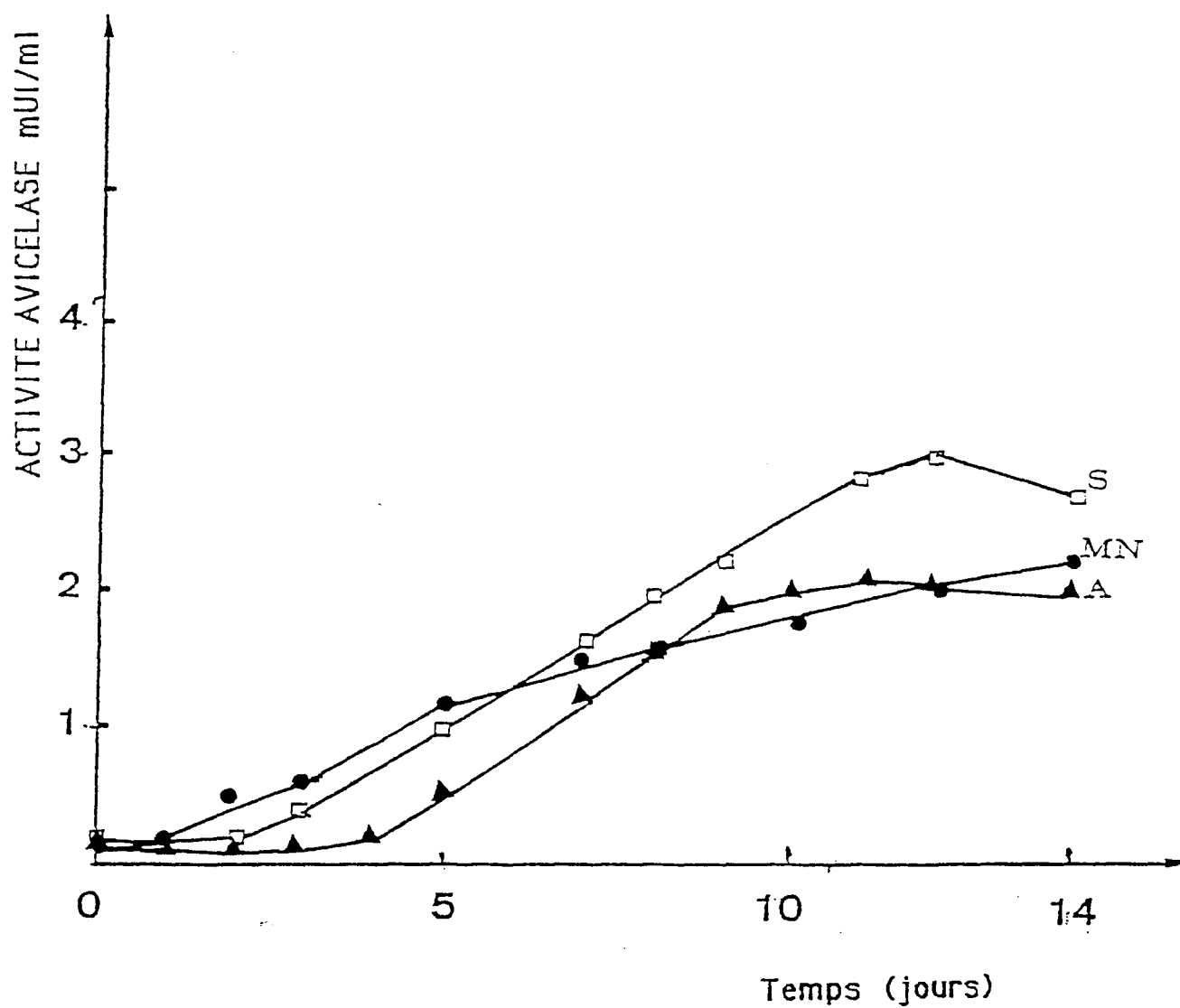


Figure 14 B : Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité cellulase totale (Avicelase) par *C. cellulolyticum* ;
 (●) cellulose MN 300,
 (▲) cellulose Avicel,
 (□) cellulose Solka Floc.

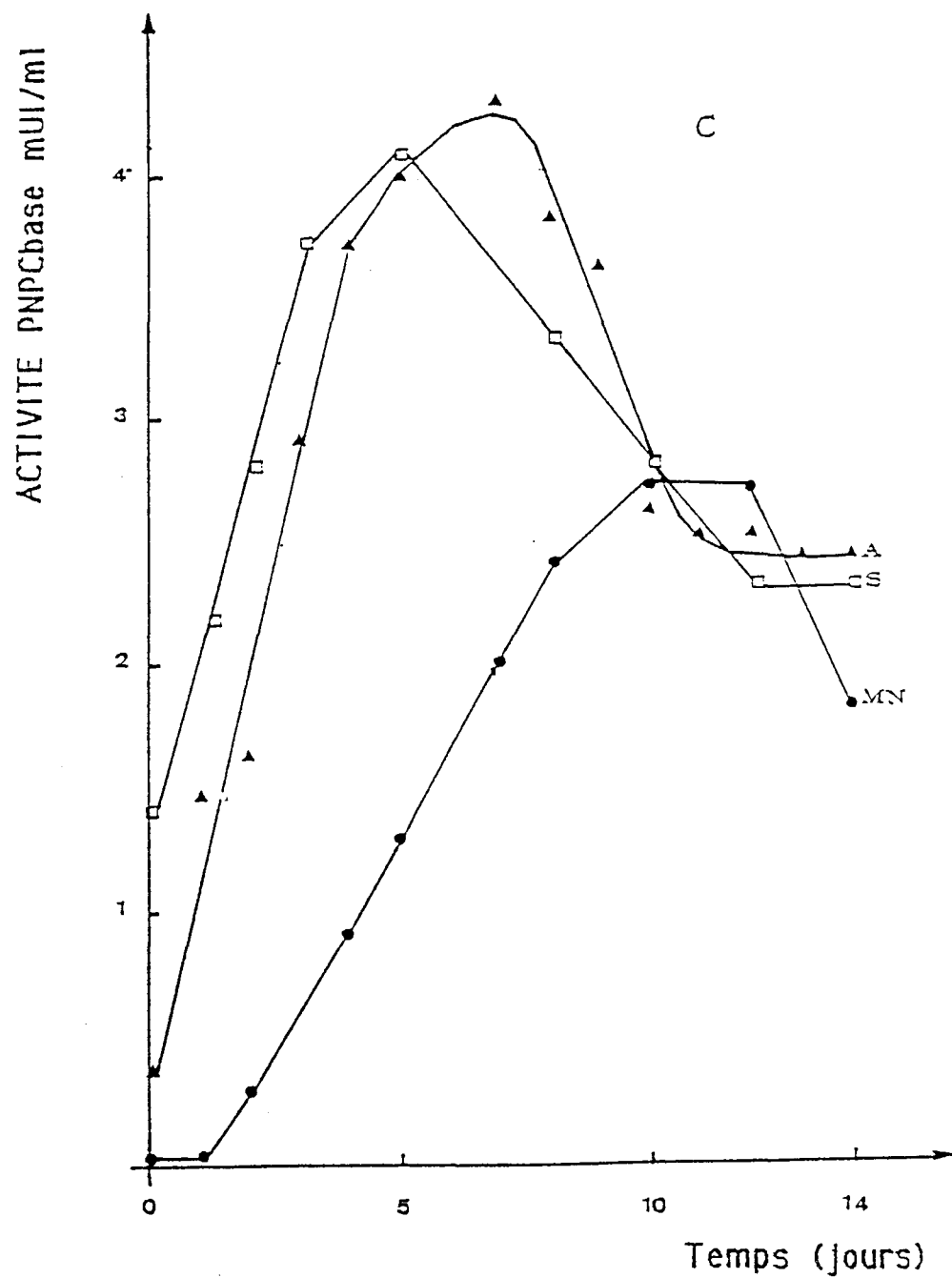


Figure 14 C : Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité PNPCbase par *Cl. cellulolyticum* ;
 (●) cellulose MN 300,
 (▲) cellulose Avicel,
 (□) cellulose Solka Floc.

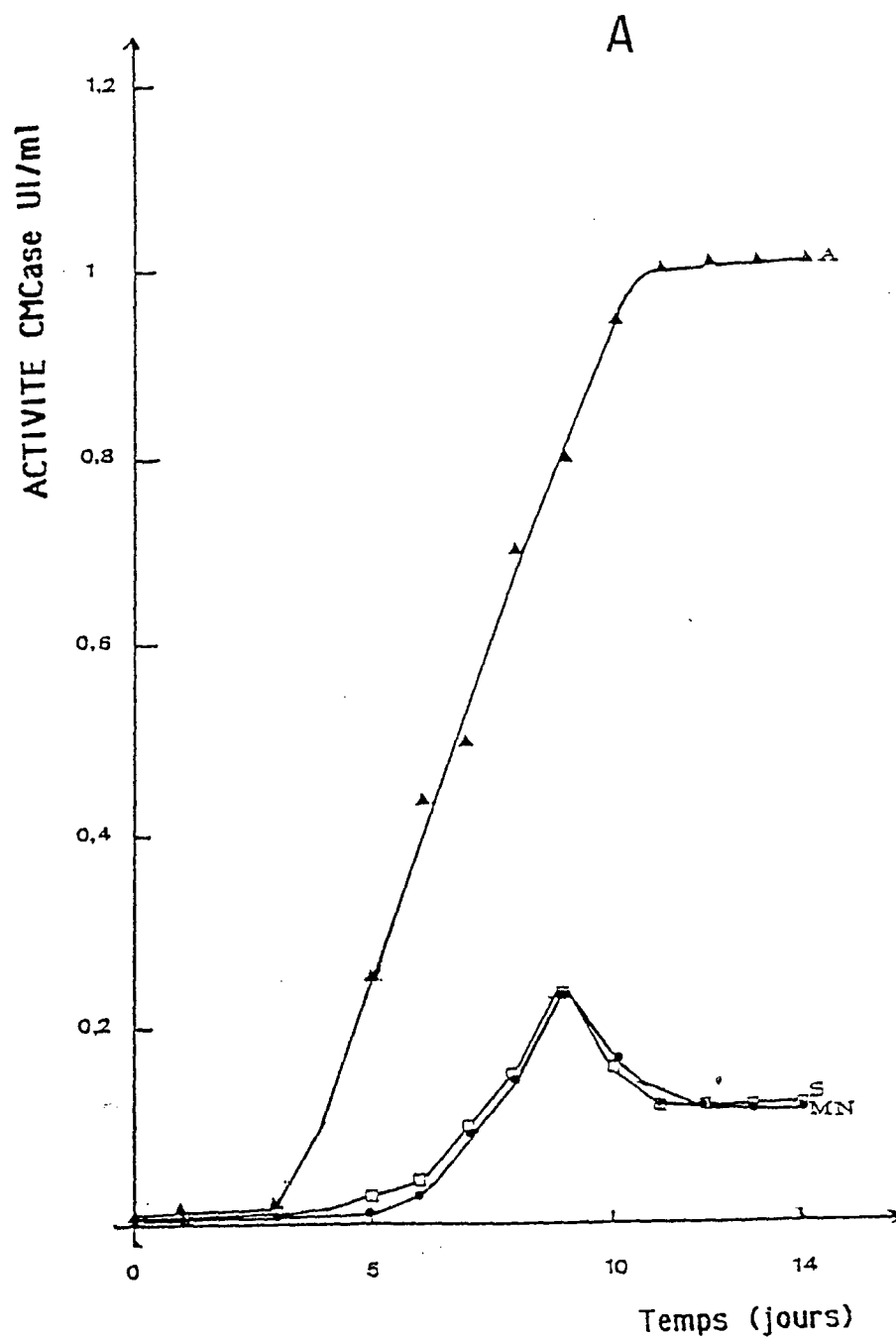


Figure 15 A : Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité CMCase par le mutant 42 ;
 (●) cellulose MN 300,
 (▲) cellulose Avicel,
 (□) cellulose Solka Floc .

Sur la cellulose Avicel, l'apparition de cette enzyme dans le milieu de culture est plus rapide que sur les autres substrats ; l'activité enzymatique augmente de façon exponentielle à partir du 3^e jour de fermentation , atteint une valeur maximale de 1 UI/ ml au 11^e jour et se stabilise .

3 - 2 - 2 Production de l'activité Avicelase

On observe en générale une faible production de cette enzyme . Les résultats sont rassemblés sur la figure (15 B) .

- Sur cellulose MN 300 , la valeur maximale observée est de 3 mUI/ ml à 9 jours de fermentation ; une légère baisse de la production de cette enzyme est observée .

- Sur cellulose Avicel , la production de l'activité avicelase est plus rapide ; elle est libérée dans le milieu de culture à partir du 2^e jour , atteint une valeur maximale de 4 mUI/ ml au 7^e jour de fermentation . Ensuite on observe une diminution brutale de l'activité enzymatique entre le 9^e et le 11^e jour.

pour le mutant 42 , le meilleur inducteur de l'activité Avicelase est la cellulose Avicel.

3 -2 - 3 Production de l'activité PNPCbase

La production de l'activité exoglucanase est similaire pour les substrats cellulose Avicel et cellulose Solka Floc ; les valeurs maxima obtenues ne dépassent pas 2,8 mUI / ml . Elles sont atteintes au 3^e jour de fermentation .

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (15 C).

- sur la cellulose solka Floc la production de l'enzyme reste constante du 2^e au 11 jour ; elle diminue ensuite de façon brutale alors que sur la cellulose Avicel la diminution est progressive.

- L'apparition de cette enzyme est beaucoup plus lente sur la cellulose MN 300 ; elle est libérée dans le milieu de culture à partir du 5^e jour de fermentation , puis augmente rapidement et atteint une valeur maximale de 1,9 mUI/ ml au 9^e jour de fermentation.

Pour l'activité exoglucanase , la cellulose Avicel est le meilleur inducteur.

3-3 Discussion

Si on compare la production des différentes activités enzymatiques sur

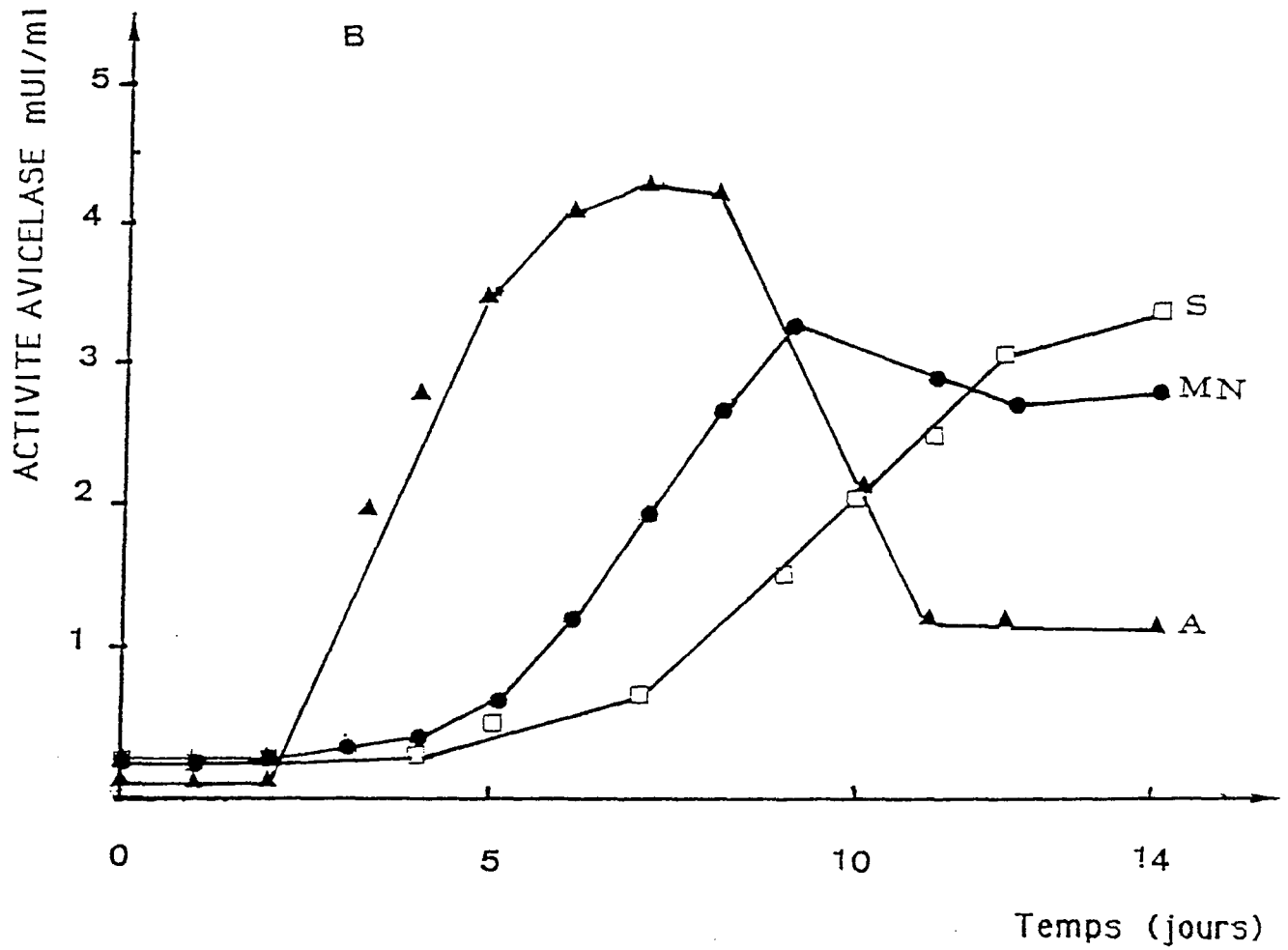


Figure 15 B : Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité Avicelase par le mutant 42 ;
 (●) cellulose MN 300 ,
 (▲) cellulose Avicel ,
 (□) cellulose Solka Floc .

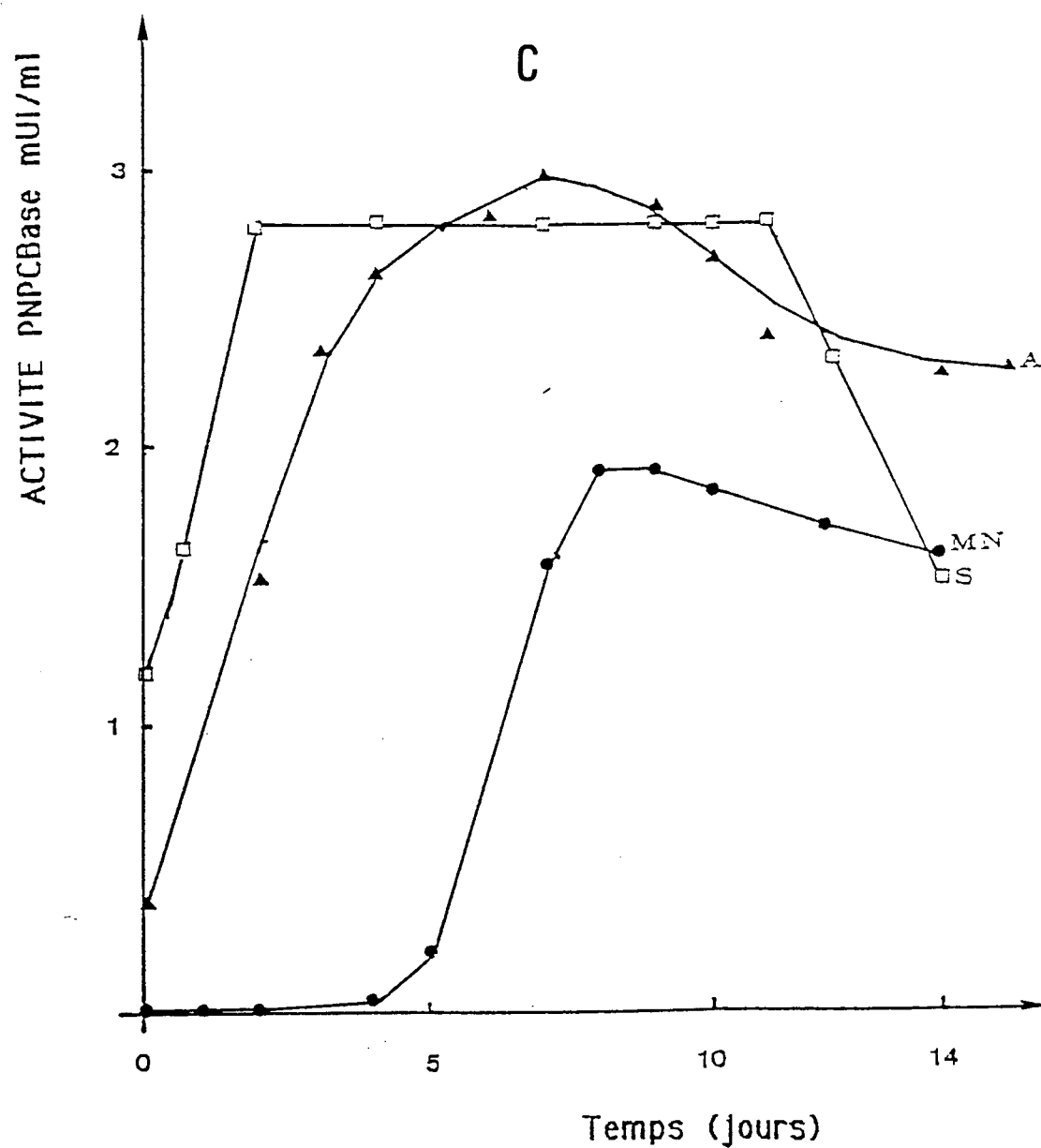


Figure 15 C : Influence de la nature du substrat sur la production de l'activité PNPCbase par le mutant 42 ;
 (●) cellulose MN 300 ,
 (▲) cellulose Avicel ,
 (□) cellulose Solka Floc .

les trois substrats celluloses par *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42 on constate que :

- sur cellulose MN 300, le mutant n° 42 possède comparativement à la souche mère, une activité maximale :
- endoglucanasique plus faible (0,5 UI/ml à 12 jours pour la souche mère et 0,25 UI/ml à 9 jours pour le mutant
- exoglucanasique supérieure : 1,9 mUI/ml à 9 jours pour la souche mère et 2,7 mUI/ml à 11 jours pour le mutant
- avicelase supérieure 2,3 mUI/ml à 14 jours pour la souche mère et 3,3 mUI/ml à 9 jours pour le mutant.

Sur cellulose Avicel, le mutant n° 42 possède comparativement à la souche sauvage, une activité maximale.

- endoglucanasique supérieure 0,625 à 15 jours pour la souche mère et 1,02 UI/ml à 10 jours pour le mutant
- exoglucanasique plus faible 4,3 mUI/ml à 7 jours pour la souche mère et 3,0 mUI/ml à 7 jours pour le mutant.
- avicelase supérieure 2,0 mUI/ml à 11 jours pour la souche mère et 4,25 mUI/ml à 7 jours pour le mutant.

Sur cellulose Solka Floc le mutant possède comparativement à la souche sauvage une activité maximale endoglucanasique supérieure 0,175 UI/ml pour la souche mère à 9 jours et 0,29 UI/ml à 9 jours pour le mutant

- exoglucanasique plus faible 4,1 à 6 jours pour la souche mère et à 2,8 mUI/ml à 2 jours pour le mutant.
- avicelase semblable 3 mUI/ml à 12 jours.

En conclusion

les résultats obtenus montrent que le niveau de production des enzymes cellulolytiques par *Cl. cellulolyticum* et son mutant 42 dépend de la nature de la source principale de carbone utilisé et de la forme de la cellulose. Ainsi la cellulose microcristalline Avicel s'est révélée être le meilleur substrat pour la formation de cellulases par *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42. De plus, nous avons également constaté que dans l'ensemble l'apparition des activités cellulases dans le milieu de culture se fait beaucoup plus précocement chez le mutant que chez la souche mère.

3 - 3 Influence de la nature du substrat sur la production des métabolites:

Chez les Clostridia, la fermentation de la cellulose conduit principalement à la production d'acétate, de lactate, d'éthanol, de gaz carbonique et d'hydrogène. Les produits de la fermentation des différents substrats celluloses MN 300, Avicel et Solka Floc par *Cl. cellulolyticum* et le mutant n° 42 ont été déterminés sur les surnageants de culture essentiellement les acides acétique, lactique et l'éthanol. Les valeurs maximales obtenues sont rassemblées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Influence de la nature du substrat sur la production des principaux métabolites par *Cl. cellulolyticum* et le mutant n° 42 sur différents substrats celluloses.

Substrats	<i>Cl. cellulolyticum</i> (souche mère) en g/l			Mutant n° 42 en g/l		
	Acétate	Lactate	Ethanol	Acétate	Lactate	Ethanol
MN 300	3,9	1,3	0,5	5,0	0,8	0,6
Avicel	5,7	1,0	0,7	6,2	1,0	0,5
Solka Floc	3	0,6	0,5	3	0,3	0,4

Ce tableau montre que :

les deux souches produisent essentiellement des acides organiques. L'acide acétique est le produit majeur de la fermentation. C'est sur la cellulose Avicel qu'on obtient les valeurs les plus fortes.

**DEGRADATION COMPAREE DE LA CELLULOSE
MICROCRISTALLINE AVICEL PAR *C/*
cellulolyticum ET LE MUTANT 42**

Comme nous l'avons observé dans le chapitre précédent la cellulose microcristalline Avicel s'est révélée être le meilleur substrat pour la production des enzymes cellulolytiques aussi bien pour *Cl. cellulolyticum* que pour le mutant n° 42.

Afin de mieux caractériser le mutant n° 42, une fermentation en batch avec régulation de pH, de la cellulose Avicel 7,5 g/l par le mutant en comparaison avec celle de la souche mère a été réalisée. Au cours de cette fermentation, plusieurs fonctions ont été suivies : la croissance cellulaire, la formation de cellulases, l'évolution de l'excrétion des protéines extracellulaires et la production de métabolites.

1 - Etude de la croissance sur cellulose Avicel

Les courbes de croissance sont représentées sur la figure (16). On constate que la croissance du mutant n° 42 démarre sans phase de latence; on observe une phase exponentielle de croissance au cours de laquelle le temps de génération est de 20 heures. La croissance de la souche mère démarre lentement sans phase de latence ; le temps de génération au cours de la phase exponentielle de croissance est de 24 heures. Signalons qu'un temps de génération de 24 heures avait été obtenu par GIALLO (1984) lors de la croissance de *Cl. cellulolyticum* sur cellulose MN 300.

La croissance maximale est atteinte après 5 jours de culture pour le mutant n° 42 et après 10 jours de fermentation pour la souche mère. Cette croissance chute brutalement après avoir atteint son maximum. Pour les deux souches, on n'observe pas de phase stationnaire de croissance.

2 - Production comparée des activités enzymatiques

La production des différentes enzymes cellulolytiques ainsi que l'activité xylanase ont été suivies au cours de la fermentation. Les évolutions comparées des activités CMCase, avicelase, PNPCbase au cours du temps sont représentées sur les figures 17, 18 et 19.

On constate que la production des activités avicelase (B) et PNPCbase (C) est dépendante de la croissance. Ces deux activités diminuent quand la croissance décroît alors que l'activité CMCase (A) reste constante

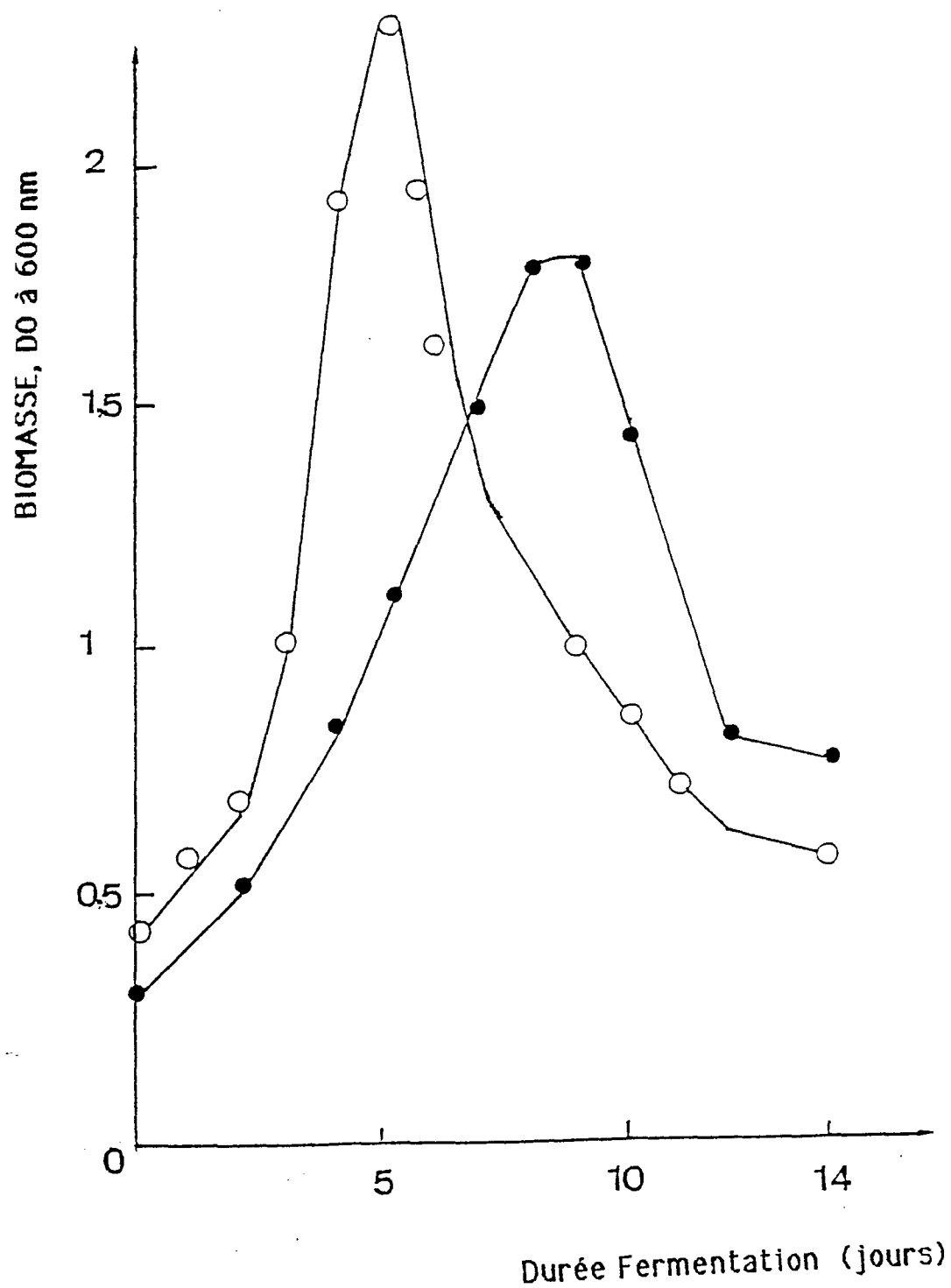


Figure 16 : Croissance comparée de *Cl. cellulolyticum* (●) et du mutant 42 (○) sur cellulose microcristalline Avicel 7,5 g/l.
Evolution de la biomasse en fonction du temps.

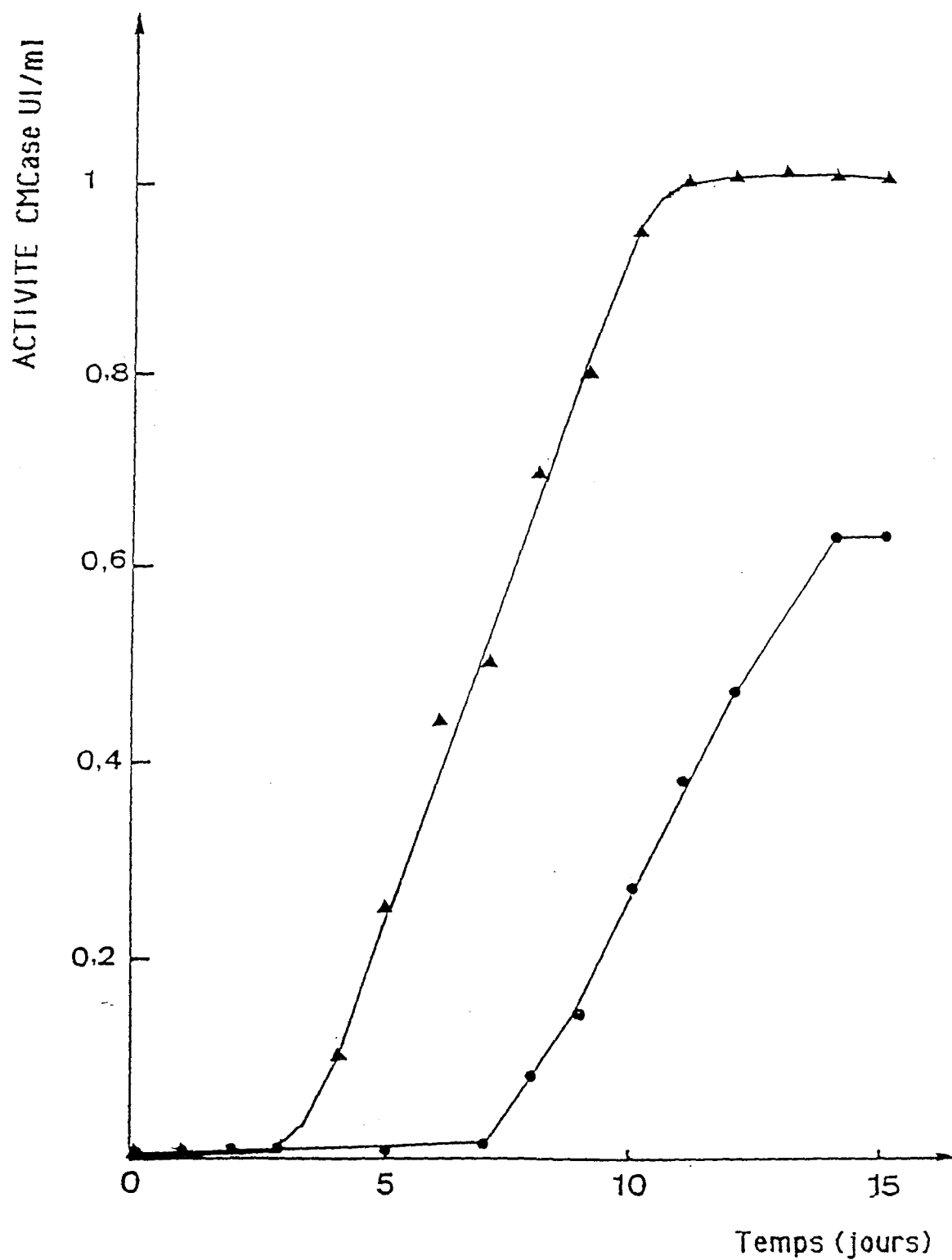


Figure 17: Evolution comparée de l'activité CMCase de *C. cellulolyticum* (●) et du mutant 42 (▲) au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps.

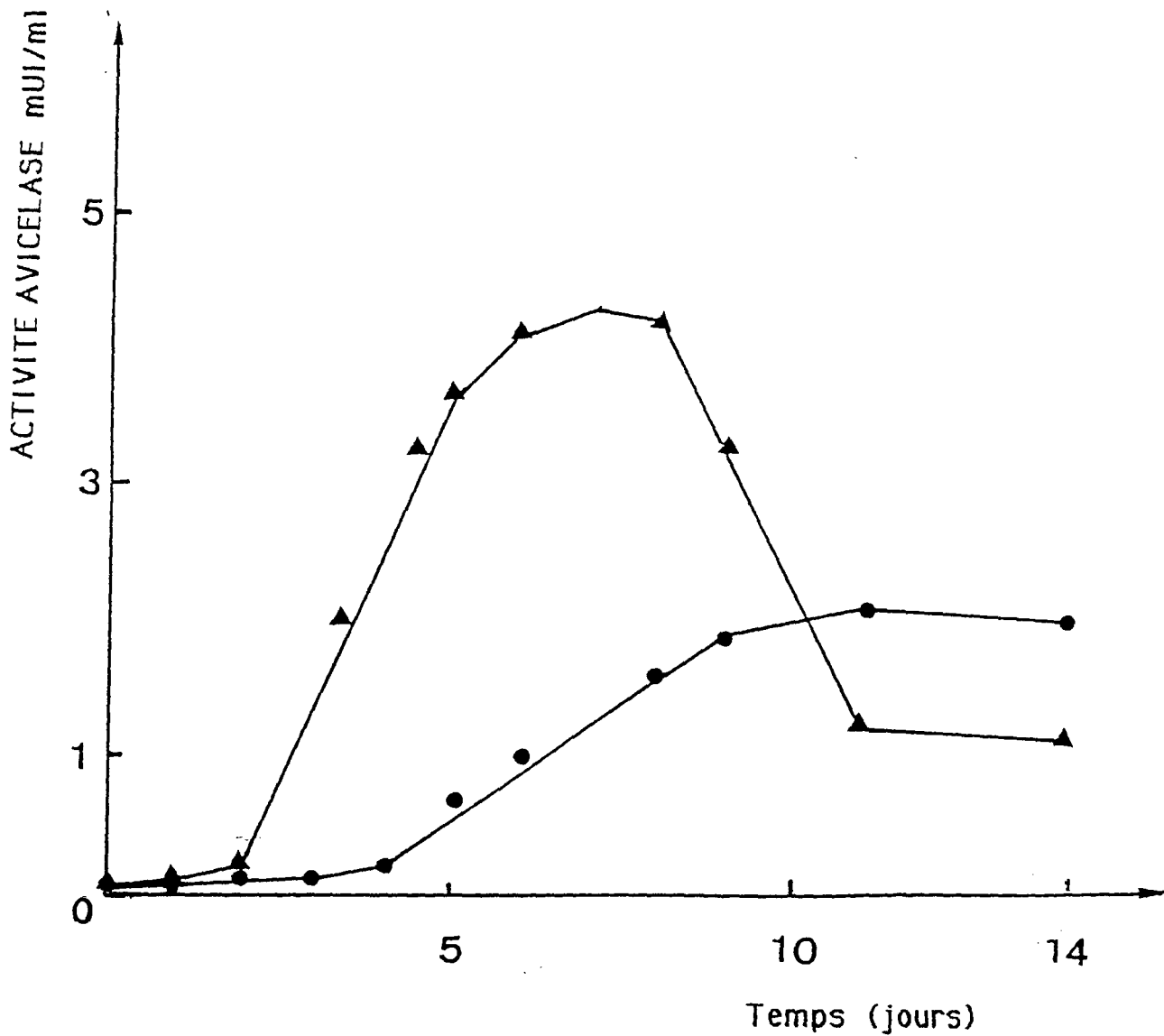


Figure 18 : Evolution comparée de l'activité avicelase de *C. cellulolyticum* (●) et du mutant 42 (▲) au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps.

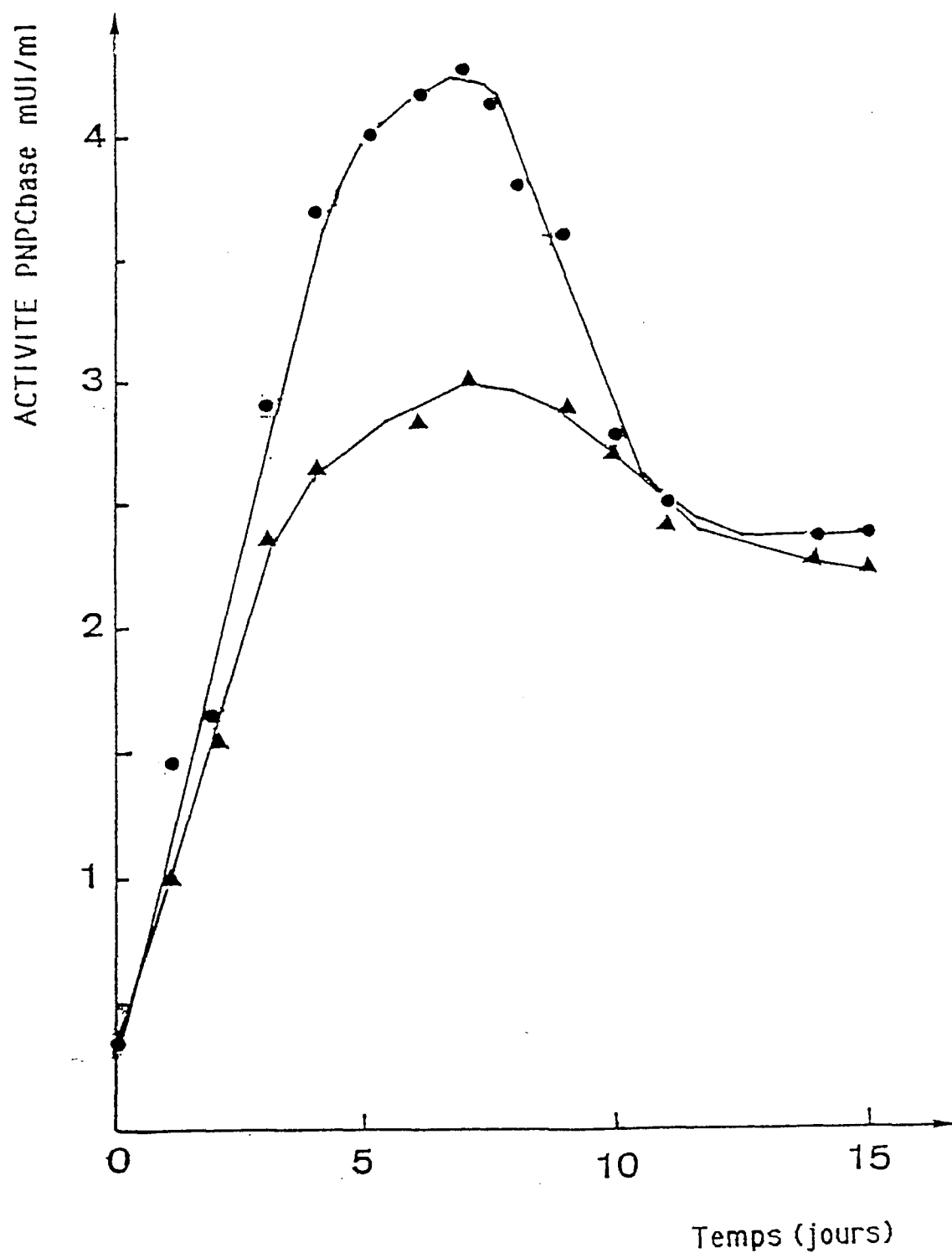


Figure 19 : Evolution comparée de l'activité PNPChase de *C. cellulolyticum* (●) et du mutant 42 (▲) au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps.

après arrêt de la croissance. Le mutant n° 42 produit plus d'activité CMCCase et avicelase que la souche mère. Ces deux activités atteignent chez le mutant 42 des valeurs doubles de celles obtenues chez la souche mère *Cl. cellulolyticum*. Par contre, l'activité PNPCbase est plus élevée chez la souche mère que chez le mutant 42.

La production de l'activité xylanase a été également suivie lors de la fermentation de la cellulose Avicel par les deux souches.

Les résultats sont présentés sur la figure 22.

Le mutant n° 42 produit 1,2 fois plus d'activité xylanase que *Cl. cellulolyticum*. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si la xylanase est une enzyme séparée du complexe cellulasique ou liée au complexe.

3 - Evolution de l'excrétion des protéines

Au cours de la fermentation de la cellulose Avicel, nous avons dosé les protéines extracellulaires dans les surnageants de culture. L'évolution de l'excrétion des protéines au cours du temps est illustrée sur la figure (21) pour *Cl. cellulolyticum* et sur la figure (22) pour le mutant 42.

On remarque que les courbes obtenues recouvrent les différentes courbes observées lors de l'étude de la production des activités CMCCase, Avicelase et PNPCbase.

Sur ces deux figures sont indiqués les jours caractéristiques correspondant à la croissance maximale (DO max.) et au début d'apparition de chacune des activités cellulasiques dans le milieu de culture. On observe une augmentation de l'excrétion des protéines après la croissance maximale; on peut penser qu'à ce niveau, il y a eu une lyse cellulaire et libération des protéines intracellulaires dans le milieu de culture. On peut aussi remarquer que les débuts d'apparition des activités enzymatiques sont plus précoces pour le mutant n° 42 que pour la souche mère. Il est remarquable de constater qu'entre le 8e et le 14e jour de fermentation de la cellulose Avicel, les rapports des concentrations varient de 2 à 1,3.

Nous avons déterminé l'activité spécifique des différentes enzymes cellulasiques sécrétées par *Cl. cellulolyticum* et le mutant n° 42. Les résultats sont rassemblés sur le tableau 15.

Il ressort de l'étude de ce tableau que l'activité spécifique CMCCase du mutant n° 42 est 3 fois plus élevée et l'avicelase 6 fois plus élevée que celle de la souche mère *Cl. cellulolyticum*.

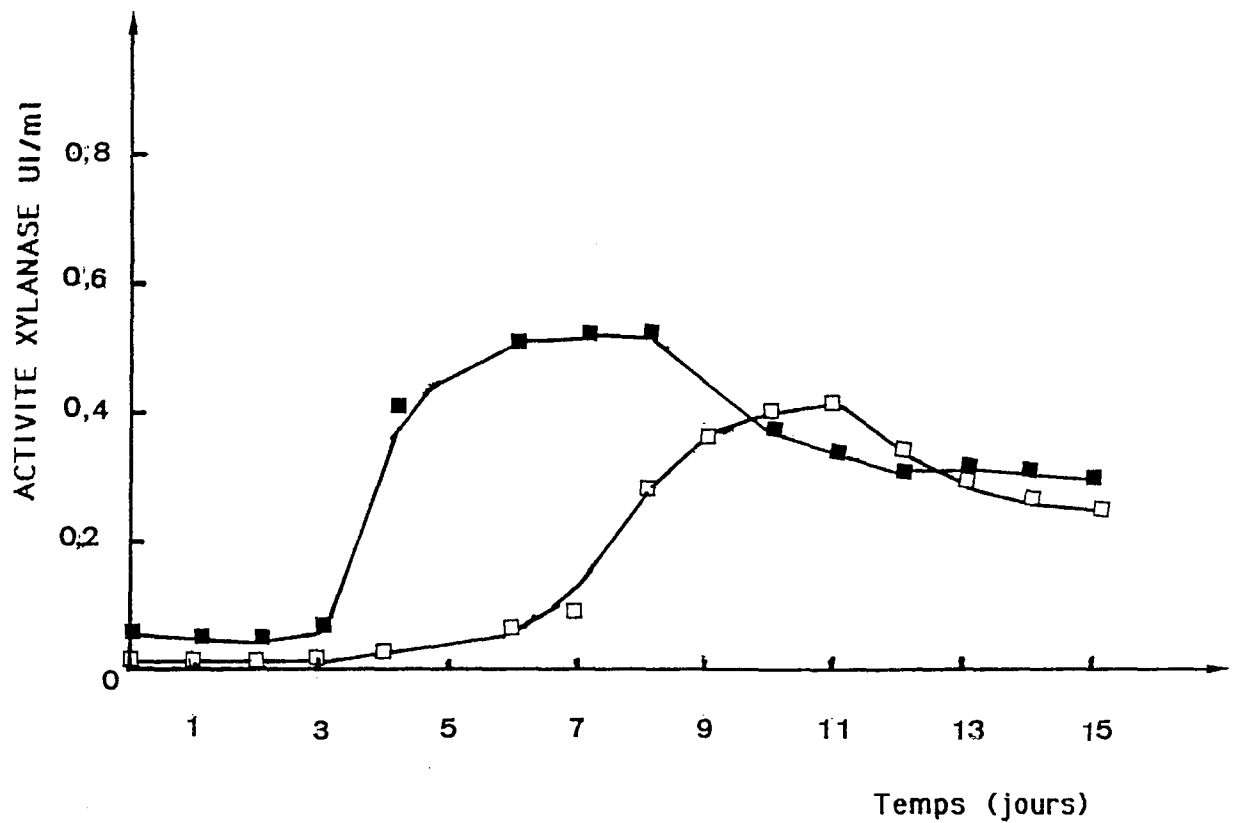


Figure 20 : Evolution comparée de l'activité xylanase de *C. cellulolyticum* (□) et du mutant 42 (■) au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps.

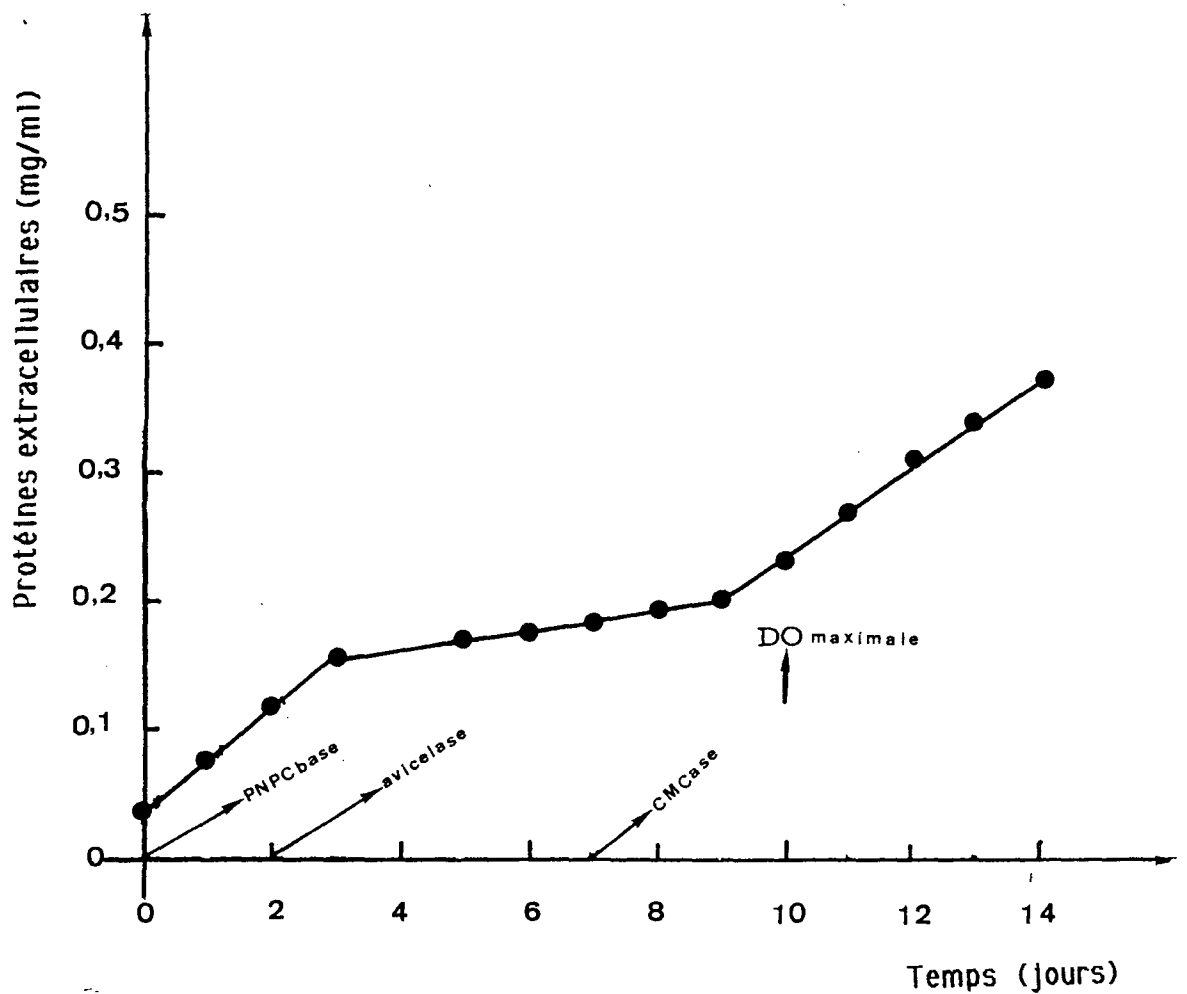


Figure 21 : Evolution de l'excrétion des protéines extracellulaires de *Cl. cellulolyticum* au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps. Sur cette figure sont indiqués la DO maximale obtenue et les débuts d'apparition des différentes activités cellulases.

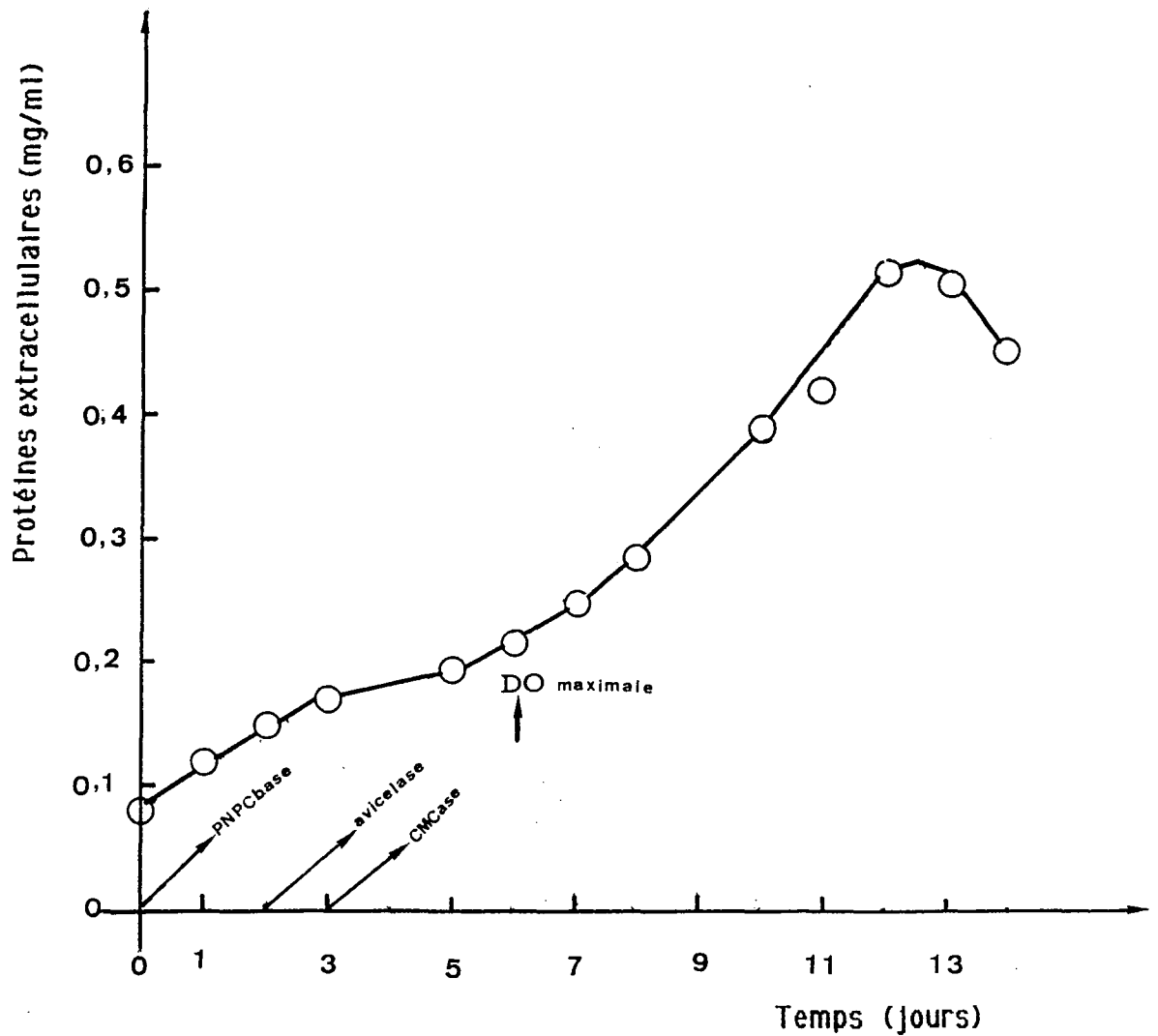


Figure 22 : Evolution de l'excrétion des protéines extracellulaires du mutant 42 au cours de la fermentation de la cellulose Avicel en fonction du temps .
 Sur cette figure sont indiqués la DO maximale obtenue et les débuts d'apparition des différentes activités cellulases.

Tableau 15 : Comparaison des activités spécifiques des enzymes cellulasiques et xylanasiques de *Cl. cellulolyticum* et du mutant n° 42

Activité UI/mg de protéines extracellulaires	<i>Cl. cellulolyticum</i>	Mutant n° 42
CMCase	1,59	5,13
Avicelase	0,003	0,020
Xylanase	1,41	1,76

Les valeurs ont été obtenues après 8 jours de fermentation de la cellulose microcristalline Avicel par *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42. Il n'y a pas de différence significative quant à l'activité spécifique xylanase.

Nous avons comparé l'activité spécifique CMCase du mutant n° 42, de *Cl. cellulolyticum* aux activités spécifiques de *T. reesei* et *Cl. thermocellum* citées dans la littérature. Les valeurs sont rassemblées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Activité spécifique CMCase du mutant n° 42 comparée à celle de *T. reesei* et de *Cl. thermocellum* et *Cl. cellulolyticum*.

ORGANISMES	<i>T. reesei</i>	<i>Cl. thermocellum</i>	<i>Cl. cellulolyticum</i>	Mutant n° 42
CMCase UI/ml	7,86	4,63	1,9	5,13

L'activité CMCase spécifique de *Cl. cellulolyticum* a été rapportée par GIALLO. (1984).

Quant à celle du mutant n° 42, elle se situe entre l'activité spécifique de *Cl. thermocellum* et celle de *T. reesei*, ce qui montre une amélioration d'un facteur de 2,7 par rapport à celle de la souche mère.

4 - Solubilisation de la cellulose Avicel

Comme nous l'avons dit précédemment, *Cl. cellulolyticum* et son mutant dégradent la cellulose en produisant principalement des acides organiques (acétate et lactate) et de l'éthanol. Les valeurs obtenues ont déjà été rapportées dans le chapitre précédent (tableau 14).

Nous avons observé que *Cl. cellulolyticum* et son mutant accumulent très peu de sucres réducteurs. Les valeurs maximales obtenues sont inférieures à 1 g/l. Cette valeur est très faible si on la compare à celle de *Cl. thermocellum* ATCC 27405 qui accumule jusqu'à 5,5 g/l de sucres réducteurs lorsqu'il est cultivé sur cellulose (GORDON J. et al., 1978).

Après 8 jours de fermentation, *Cl. cellulolyticum* dégrade 35 % de cellulose Avicel et le mutant n° 42, 79 % ; ce qui correspond à une vitesse d'hydrolyse de 14,5 g de cellulose/m³ milieu/h pour *Cl. cellulolyticum* et de 32,8 g de cellulose/m³ milieu/h pour le mutant n° 42, soit une vitesse d'hydrolyse améliorée d'un facteur de 2,26.

Selon SMITH et al. (1988), il s'agit d'une vitesse d'hydrolyse très élevée. Ces auteurs ont rapporté les résultats obtenus chez *Cl.*

cellulovorans et *Cl. populeti*. Ces deux bactéries cellulolytiques mésophiles possèdent des vitesses d'hydrolyse de la cellulose atteignant 25 g de cellulose/m³ milieu/heure. Cette vitesse qualifiée de très élevée, égale ou dépasse les vitesses rapportées pour les Clostridies thermophiles (WEIMER et ZEIKUS, 1977) ou mésophiles (LESHINE et CANALE-PAROLA, 1983).

5 - Conclusion :

L'étude de la dégradation comparée de la cellulose Avicel par *Cl. cellulolyticum* souche mère et son mutant n° 42 fait apparaître de grandes différences au niveau de leur croissance, de la production des activités enzymatiques et de l'hydrolyse de la cellulose.

Le mutant n° 42 dégrade plus rapidement et plus efficacement la cellulose Avicel que la souche mère. Il produit deux fois plus d'activité CMCase et Avicelase que *Cl. cellulolyticum*. Cette différence au niveau de la production des activités enzymatiques expliquerait le fort pourcentage de cellulose dégradée observé chez le mutant n° 42. Mais comme nous l'avons observé précédemment, cette différence dépend de la nature et de l'état du substrat cellulosique utilisé (amorphe ou cristallin).

Nous avons également observé que *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42 accumulent très peu de sucres réducteurs. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par GIALLO sur l'étude de la fermentation de la cellulose MN 300 par *Cl. cellulolyticum*.

L'hypothèse selon laquelle la conversion des substrats cellulosiques en sucres réducteurs est limitée semble vérifiée. En effet, MANDEL et coll. (1978) ont rapporté que l'inhibition des activités cellulases par le cellobiose constitue une importante limitation de l'hydrolyse de la cellulose, spécialement quand le substrat cellulosique est hautement cristallin et le complexe enzymatique faible en β -glucosidase. Or, *Cl. cellulolyticum* produit 5 fois moins de β -glucosidase extracellulaire que *Cl. thermocellum* (GIALLO, 1984). On peut donc penser que la chute brutale de la biomasse observée après arrêt de la croissance des deux souches n'est pas due uniquement à une inhibition des activités enzymatiques par les sucres réducteurs produits dans le milieu de culture. Certains facteurs autres que les sucres réducteurs seraient responsables de ce phénomène. Certaines de ces possibilités pouvant être :

- la structure du substrat : on peut imaginer qu'à ce stade, la plus grande partie de la cellulose amorphe a disparu et que seule, une structure

cristalline difficilement accessible aux enzymes cellulases soit présente ;

- ou l'accumulation dans le milieu de certains produits inhibiteurs tels que certains ions ou encore des polysaccharides

En effet, GIALLO (1984) a signalé l'accumulation dans le milieu lors d'une culture de *Cl. cellulolyticum* sur la cellulose MN 300 après la phase exponentielle de croissance, des polysaccharides extracellulaires qui pourraient être en relation avec le pouvoir cellulolytique de la bactérie. Chez des bactéries cellulolytiques, les polysaccharides extracellulaires joueraient un rôle important dans l'attaque même de la cellulose. Par exemple, dans le rumen, la plupart des bactéries cellulolytiques sont fixées aux particules végétales (AKIN 1976 AKIN et AMOS, 1975 ; CHENG et al., 1977 ; CHENG et COTERTON, 1979). Cette fixation qui semble nécessaire à la dégradation des glucides insolubles s'opère par l'intermédiaire d'une structure d'attachement extracellulaire de nature polysaccharidique (glycocalyx) dans laquelle sont localisées les cellulases qui sont ainsi stabilisées par cette association qui évite également leur diffusion dans le milieu (CHENG et COSTERTON, 1979).

**SYNERGIE D'ACTION ENTRE LES CELLULASES
DE *Cl. cellulolyticum* et du Mutant 42**

L'objectif de cette étude est de savoir si l'association des deux souches *Cl. cellulolyticum* et son mutant n° 42 pourrait produire plus de cellulases que les cultures pures respectives des deux microorganismes. Lors de cette étude, nous nous sommes surtout intéressés à rechercher une synergie d'action au niveau des activités cellulases.

Une coculture de *Cl. cellulolyticum* et du mutant n° 42 a été réalisée sur cellulose Avicel 7,5 g/l à partir des cultures pures des deux micro-organismes effectuées séparément. Cette coculture a été réalisée en fermenteur dans les mêmes conditions que les cultures pures décrites aux chapitres précédents. Chaque souche estensemencée au 1/5e du volume total.

Au cours de la coculture, nous avons suivi la croissance et l'évolution de la production des enzymes cellulolytiques.

1- Croissance de la coculture

La croissance est représentée sur la figure (23). On constate qu'en culture mixte, la croissance démarre comme celle du mutant n° 42 mais la DO maximale atteinte reste faible comparativement à celle de *Cl. cellulolyticum* et du mutant n° 42 obtenue en culture pure.

2 - Production des activités enzymatiques

L'évolution des activités enzymatiques CMCase, avicelase et PNPCbase produites sont représentées sur les figures (24, 25 et 26). Elles atteignent des valeurs plus faibles que celles obtenues en culture pure.

Nous n'avons observé aucune synergie d'action entre les activités CMCase des deux souches. Il en est de même des activités avicelases. Seule, l'activité xylanase présente une synergie d'action. La figure (27) montre l'évolution des activités xylanases de *Cl. cellulolyticum* souche mère, du mutant n° 42 et de la coculture des deux souches.

Après 12 jours de fermentation en coculture, les activités xylanases sont multipliées par un facteur 4,7. On obtient des valeurs de 1,6 UI/ml pour la coculture alors que les cultures pures n'atteignent que des valeurs de 0,34 UI/ml.

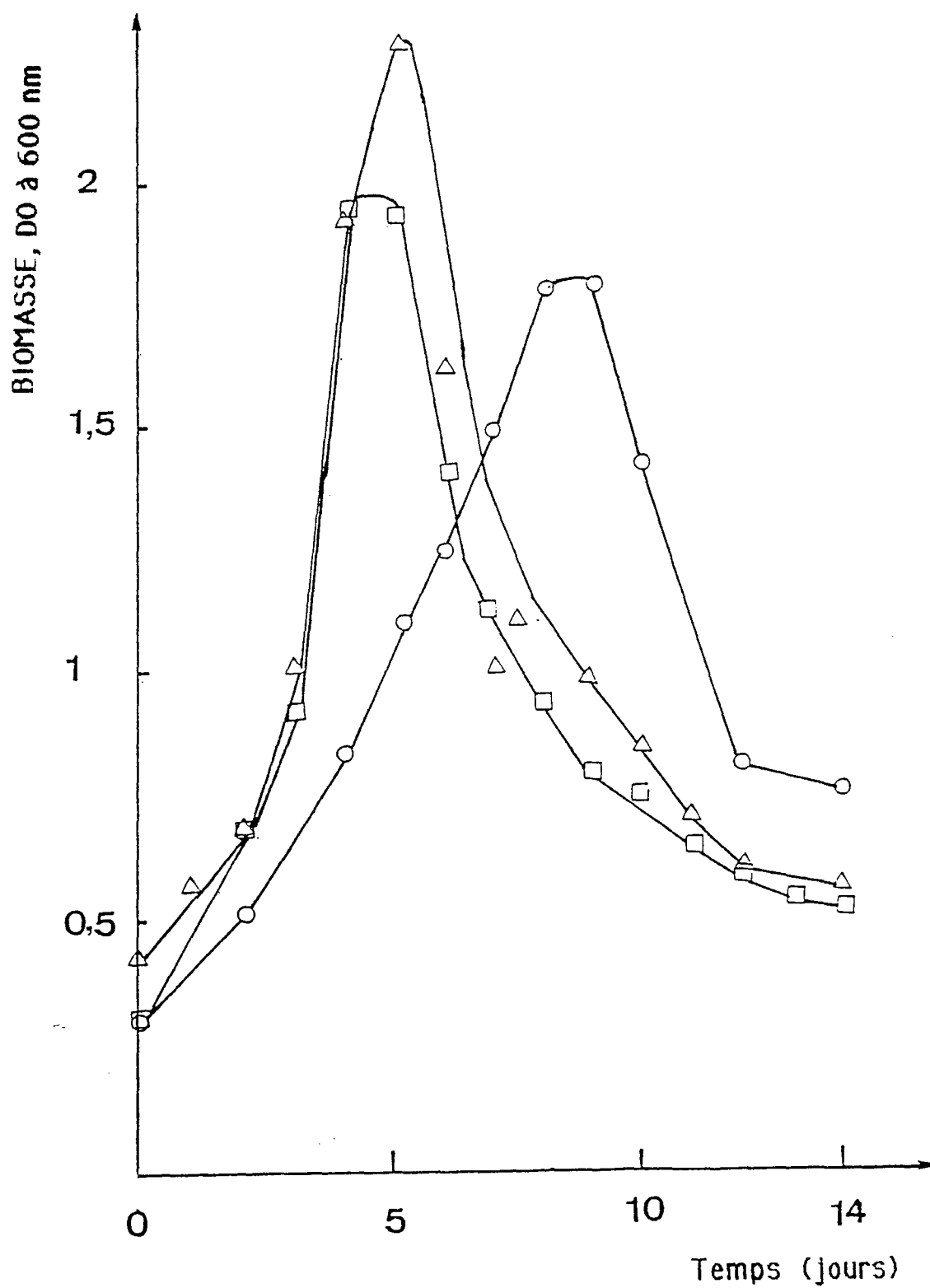


Figure 23 : Coculture sur cellulose Avicel : cinétiques de croissance de *Cl. cellulolyticum* (○), du mutant 42 (△) et de la coculture (□) des deux souches en fonction du temps.

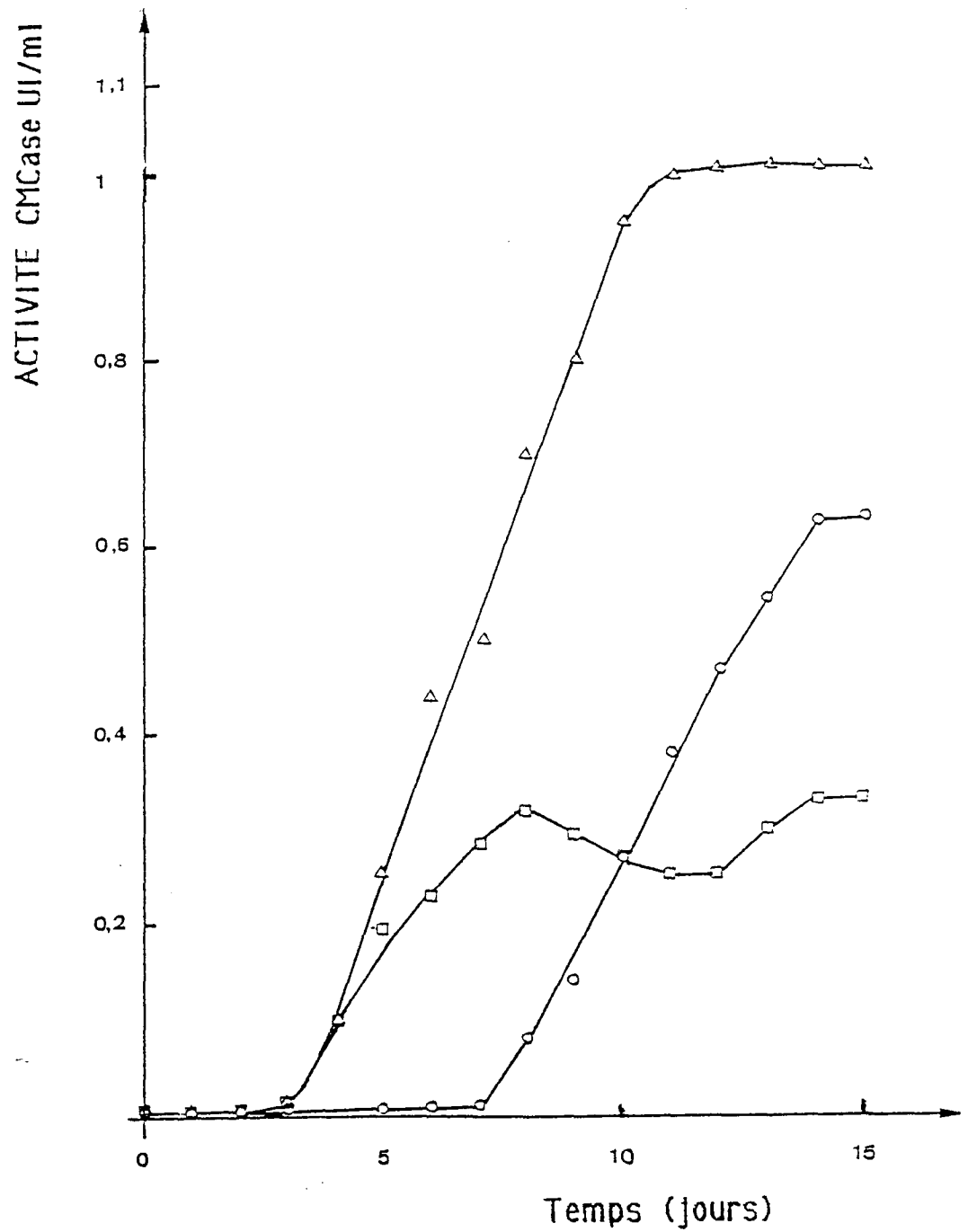


Figure 24 : Coculture sur cellulose Avicel: Activité CMCase de *C. cellulolyticum* (O), du mutant 42 (Δ) et de la coculture (□) en fonction du temps.

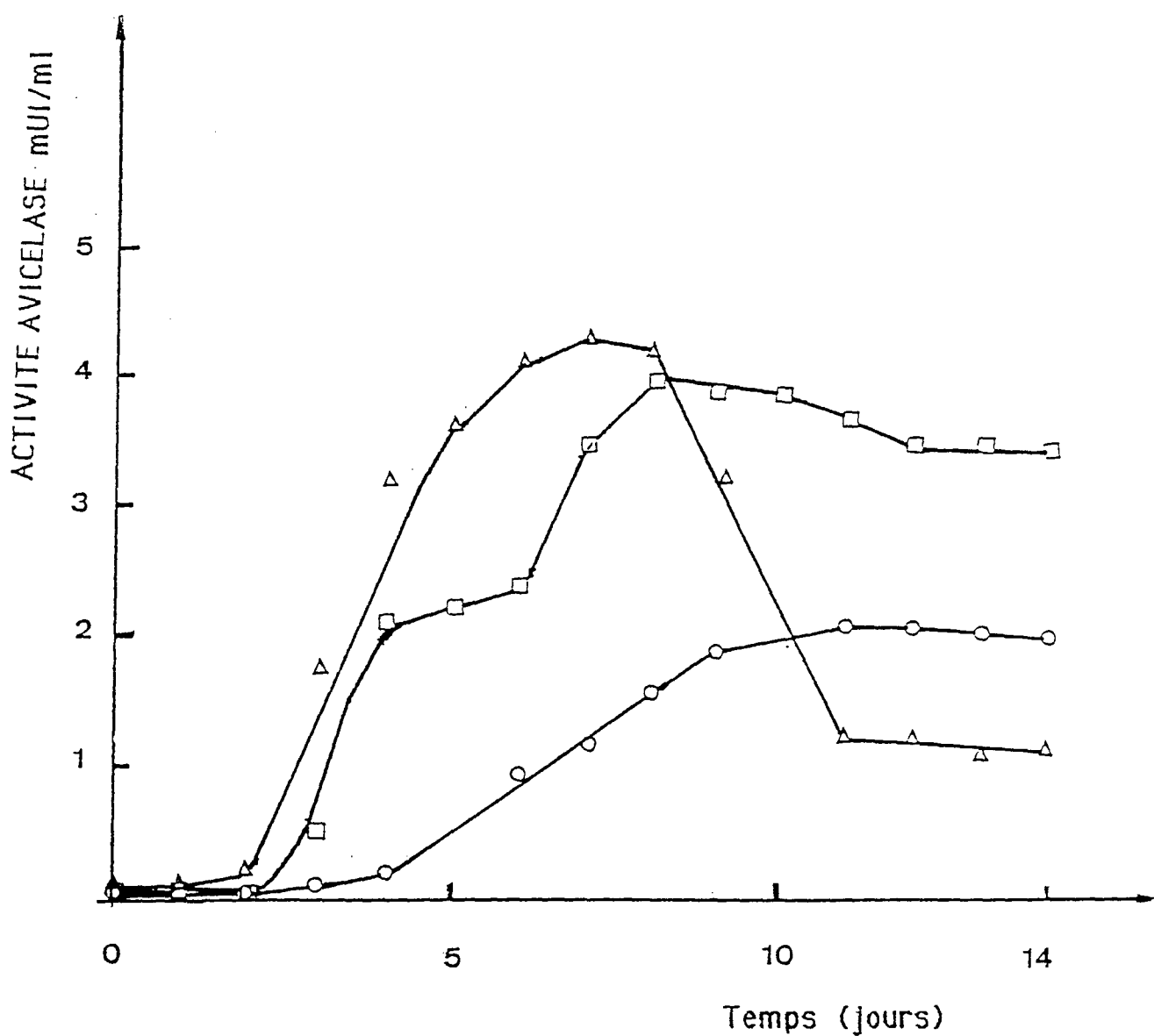


Figure 25 : Coculture sur cellulose Avicel : Activité Avicelase de *Cl. cellulolyticum* (O), du mutant 42 (Δ) et de la coculture (□) en fonction du temps.

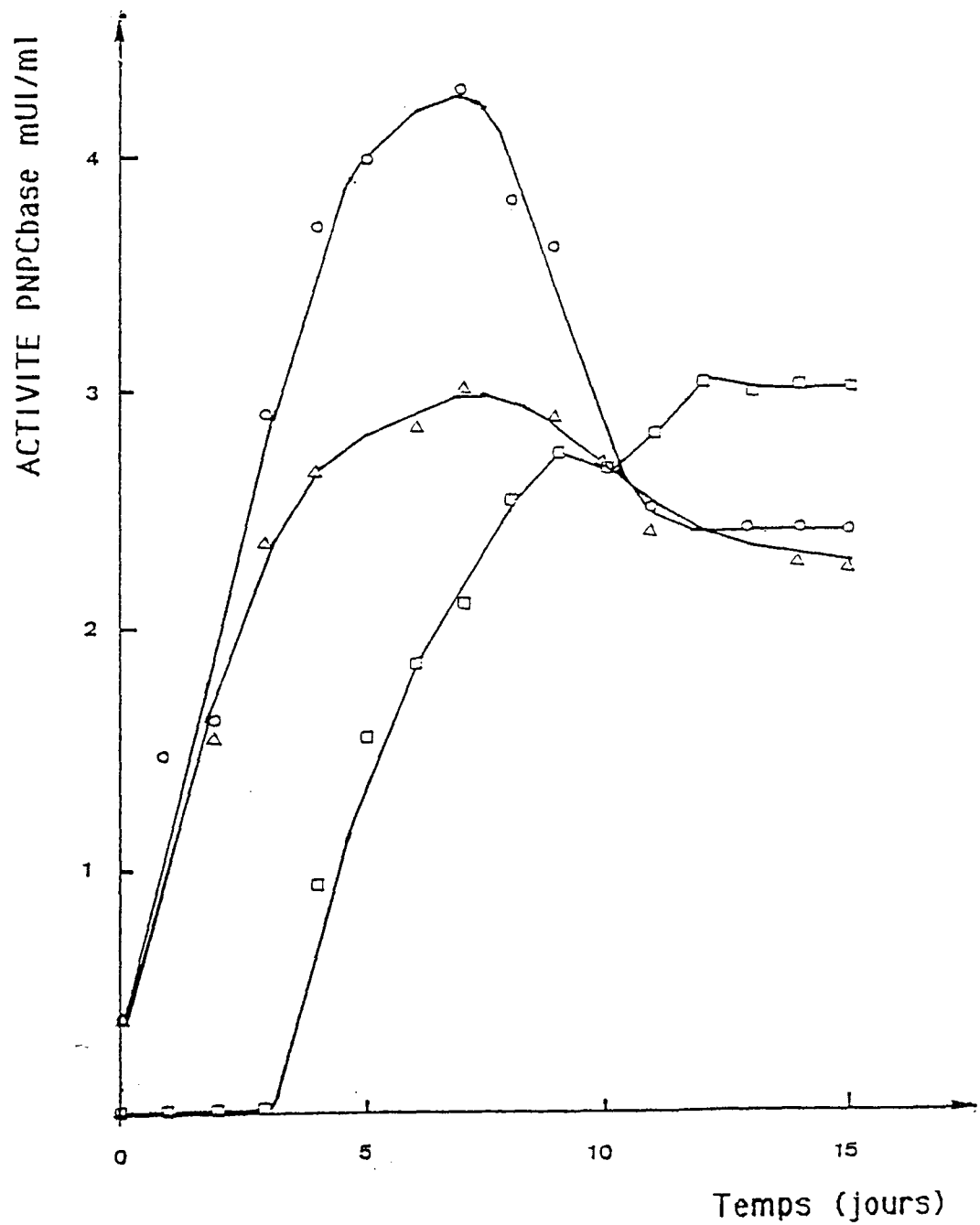


Figure 26 : Coculture sur cellulose Avicel : Activité PNPChase de *C. cellulolyticum* (O), du mutant 42 (Δ) et de la coculture (□) en fonction du temps.

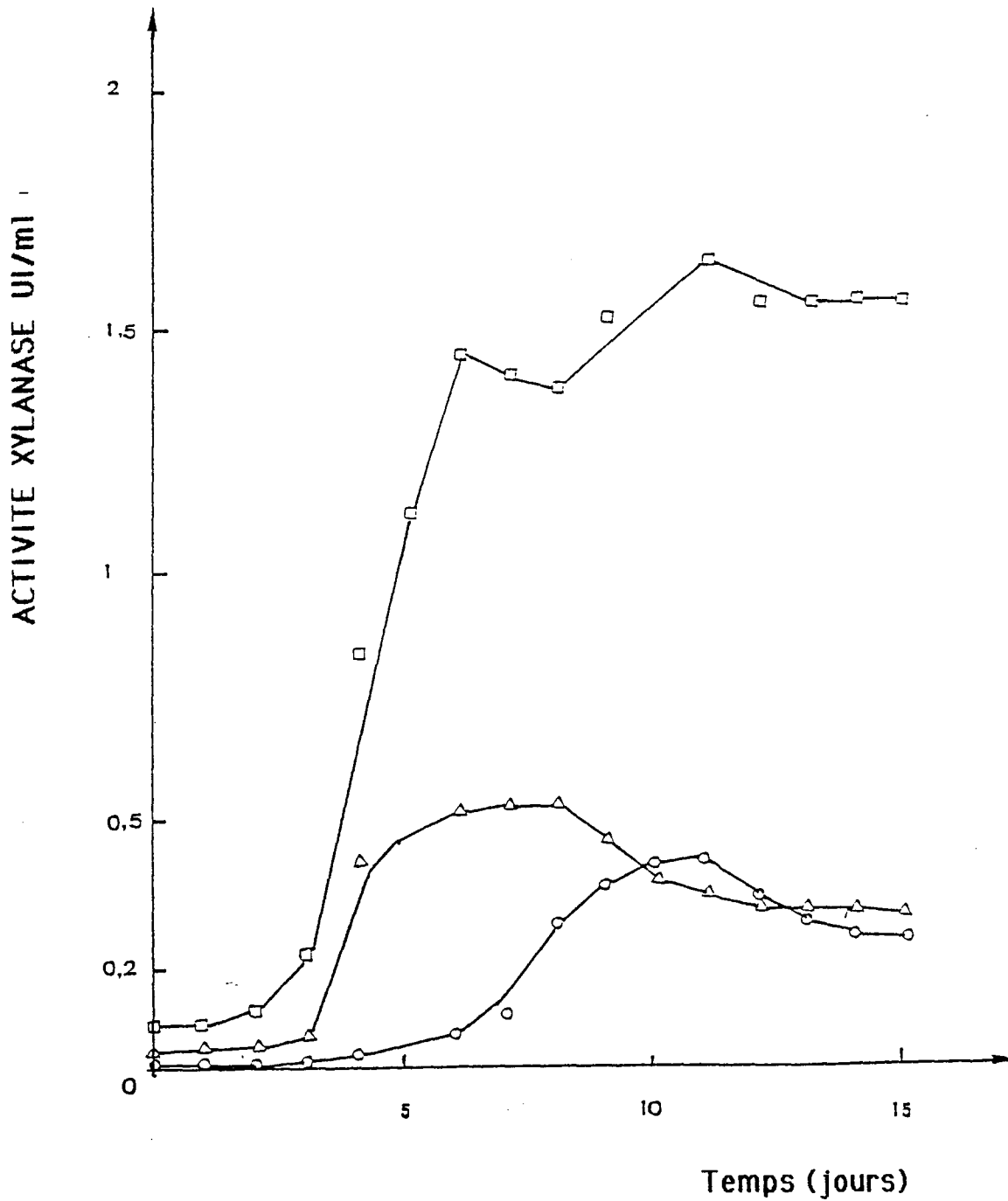


Figure 27 : Coculture cellulose Avicel: Activité xylanase de *C/ cellulolyticum* (O), du mutant 42 (Δ) et de la coculture (□) en fonction du temps.

Le niveau d'activité xylanase finale représente un pourcentage d'amélioration de 76 % par rapport à la somme des activités obtenue en culture pure.

En conclusion : l'étude de la coculture de *Cl. cellulolyticum* et du mutant n° 42 montre une synergie d'action au niveau de l'activité xylanase.

**ETUDE DU SYSTEME CELLULOLYTIQUE DE *Ci.*
cellulolyticum , DU MUTANT 42 ET DU
MUTANT 121**

Au cours des chapitres précédents, nous avons étudié l'influence des milieux de culture et de différents substrats cellulosiques sur la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*. Nous avons également isolé un mutant qui présente des activités cellulases améliorées par rapport à la souche sauvage. Généralement, les activités cellulases sont caractérisées par la mesure de sucres réducteurs libérés à partir des substrats cellulosiques.

Afin de mieux cerner les différences entre les mutants et la souche sauvage *Cl. cellulolyticum*, il nous a paru intéressant d'analyser la composition protéique des surnageants de culture des différentes souches. Ceci a été réalisé en utilisant la technique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

1 - Analyse de la composition protéique après migration électrophorétique

Les souches de *Cl. cellulolyticum*, du mutant n° 42 et du mutant n° 121 (obtenu également par mutation de la souche sauvage sous rayonnement ultraviolet mais sur la cellulose CMC) ont été cultivées dans les conditions optimales de croissance et de la production de cellulases à savoir : culture en fermenteur avec régulation de pH 7,2 par une solution de NH_4OH 4N, utilisation de la cellulose microcristalline Avicel 7,5 g/l comme substrat cellulosique.

De plus, pour savoir si la nature du substrat cellulosique pouvait avoir une influence sur la composition protéique de l'extrait enzymatique, *Cl. cellulolyticum* a été également cultivée sur cellobiose 5 g/l et sur cellulose MN 300 (7,5 g/l). Après 8 jours de fermentation sur cellulose et 2 jours sur cellobiose, 0,02 % de N_3Na sont ajoutés à la culture pour éviter les contaminations éventuelles. Les surnageants de culture sont récoltés par centrifugation puis concentrés par ultrafiltration à 4°C sur fibre creuse PM 10 (MP2 Dual Hollow fiber system PM 10 cartrige). Les protéines sont ensuite précipitées avec du sulfate d'ammonium et désalées sur colonne de Séphadex G 25 et leur concentration déterminée.

L'analyse par électrophorèse des différents surnageants concentrés révèle une composition protéique complexe. Ceci est une caractéristique

des bactéries Gram+ qui sont de bonnes productrices de protéines extracellulaires. Le spectre protéique des différentes souches est représenté sur la figure 28.

On détecte 6 bandes majeures et 5 bandes mineures après résolution du complexe protéique de la souche sauvage ; le spectre protéique du mutant n° 42 présente 3 bandes majeures et 7 bandes mineures, celui du mutant 121 est semblable au spectre protéique de la souche sauvage ; on peut remarquer 2 bandes majeures dans le spectre protéique des surnageants provenant de la coculture de la souche sauvage et du mutant n° 42 et pas de bande mineure. L'analyse de la composition protéique du surnageant provenant de la culture sur cellobiose montre au moins 11 petites bandes. On ne note aucune différence dans la composition protéique des surnageants de culture de *Cl. cellulolyticum* sur cellulose Avicel et MN 300.

Il est à remarquer que les différentes protéines ont un poids moléculaire compris entre 29 et 120 Kd.

2 - Localisation des différentes activités cellulaisiques

Dans le but d'identifier les bandes protéiques correspondant aux enzymes cellulolytiques, nous avons essayé de localiser les différentes activités enzymatiques directement sur le gel.

Différentes techniques ont été employées pour visualiser l'activité spécifique dans le gel.

Il est bien connu que la carboxyméthylcellulose est facilement dégradée par l'endoglucanase. Ainsi, les bandes correspondant à cette enzyme ont été localisées en incorporant la CMC dans le gel suivi d'une coloration au rouge Congo comme décrit dans le chapitre "matériel et méthodes". Par cette technique on a pu constater l'existence de 2 bandes majeures et de 2 bandes mineures correspondant à l'endoglucanase dans l'extrait protéique de *Cl. cellulolyticum*.

Les résultats sont représentés sur la figure 29.

Chez le mutant 42, on a localisé deux bandes correspondant à l'endoglucanase. Les résultats sont représentés sur la figure 30.

Deux bandes correspondant à cette enzyme ont été détectés dans l'extrait protéique provenant de la coculture de la souche sauvage et du mutant ainsi que celle provenant de la culture sur cellobiose. Mais dans ce dernier cas, on observe de très petites bandes au même niveau de

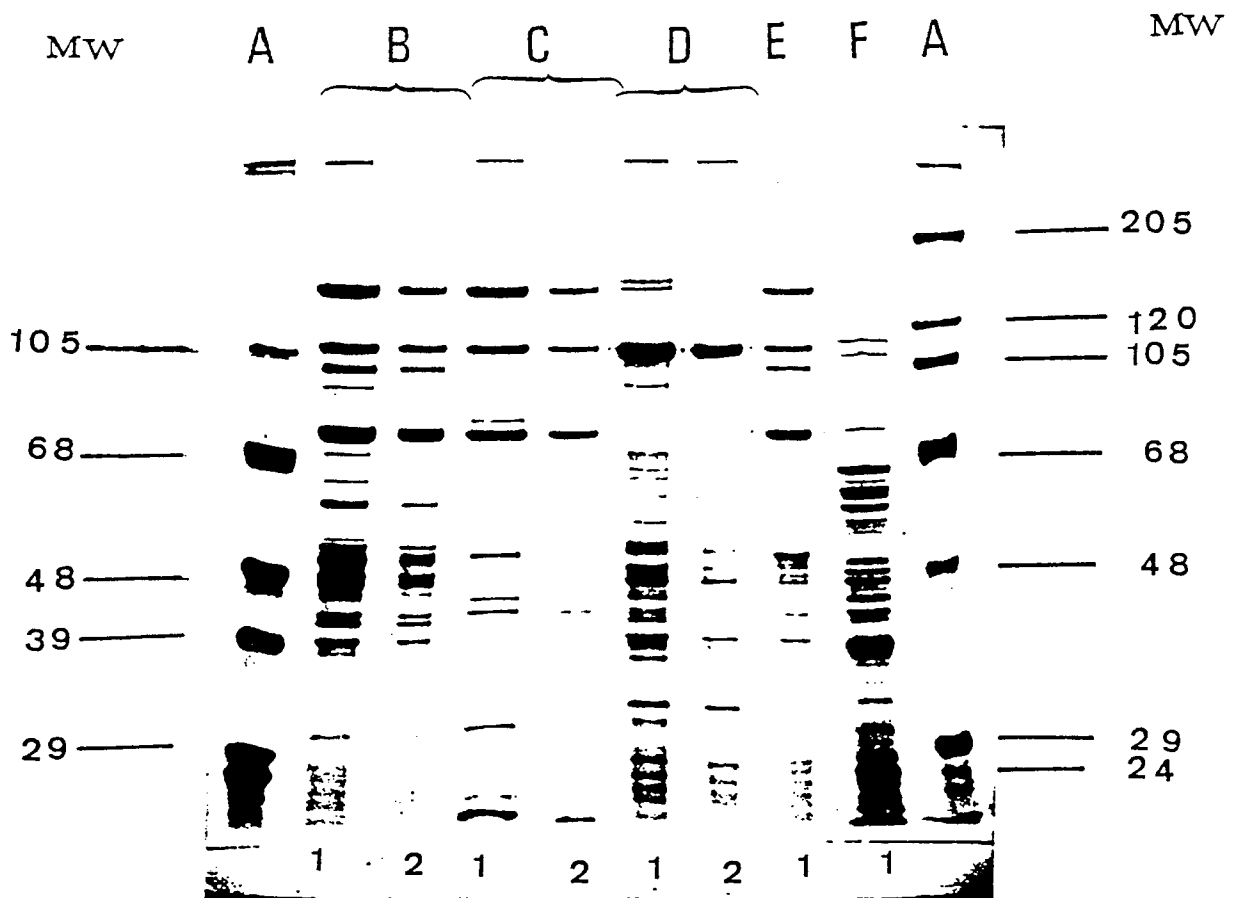


Figure 28 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% des protéines extracellulaires :

- A : protéines standard ;
- B : spectre protéique de *Cl. cellulolyticum* ;
- C : spectre protéique du mutant 42 ;
- D : spectre protéique de la coculture des deux souches ;
- E : spectre protéique du mutant 121 ;
- F : spectre protéique de *Cl. cellulolyticum* cultivé sur cellobiose ;
- A : protéines standard .
- 1 : quantité de protéines dans l'échantillon : 40µg
- 2 : quantité de protéines dans l'échantillon : 20µg

En B, C, D, E, les protéines proviennent d'une culture sur cellulose Avicel.

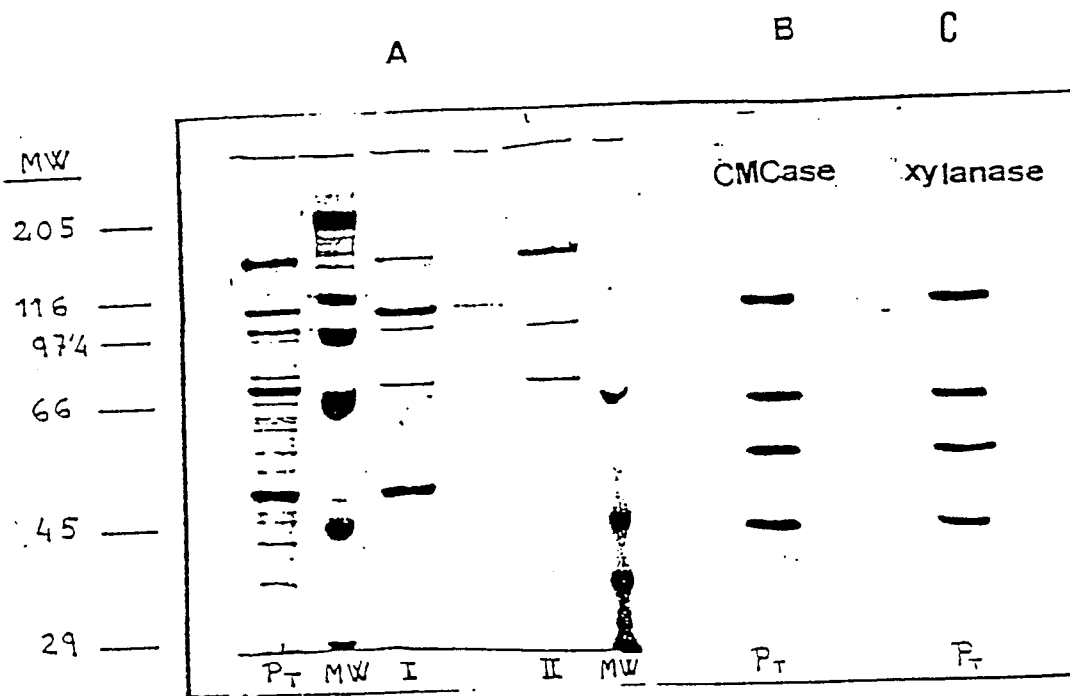


Figure 29 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide du complexe cellulolytique de *Cl. cellulolyticum*.

- A : spectre protéique PT (protéines totales) ;
- MW : poids moléculaire des protéines standard ;
- B et C : zymogramme de l'activité CMCase et xylanase du même complexe ;
- I : fraction non adsorbée sur Avicel
- II : fraction adsorbée sur Avicel récupérée par lavage à l'eau .

Les fractions I et II ont été obtenues à partir de surnageant de culture et séparées par adsorption sur cellulose Avicel selon le schéma décrit en annexe.

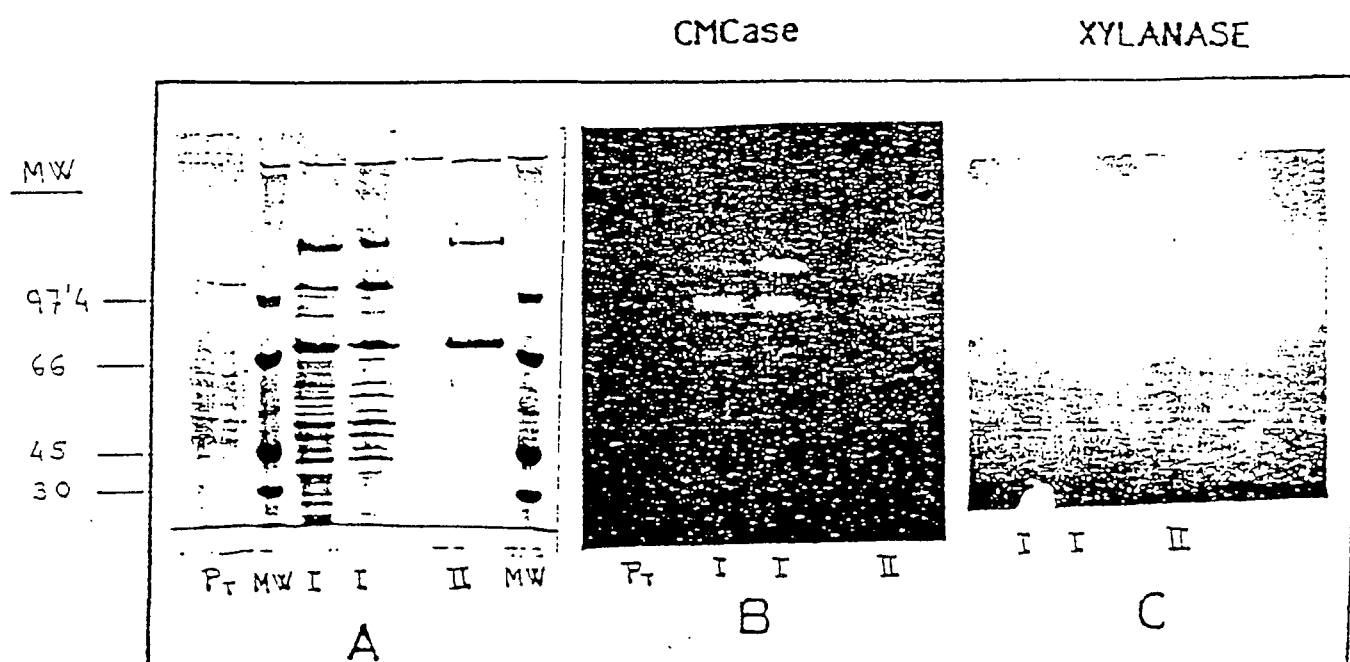


Figure 30 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide du complexe cellulolytique du mutant 42 :

- A : spectre protéique PT (protéines totales) ;
- MW : poids moléculaire des protéines standard ;
- B et C : zymogramme de l'activité CMCase et xylanase du même complexe ;
- I : fraction non adsorbée sur "Avicel"
- II : fraction adsorbée sur Avicel récupérée par lavage à l'eau.

Les fractions I et II ont été obtenues à partir de surnageant de culture et séparées par adsorption sur cellulose Avicel selon le schéma décrit en annexe.

migration que les bandes correspondant à l'endoglucanase de l'extrait provenant des substrats celluloses.

L'exoglucanase a été localisée en faisant un overlay avec une solution d'agarose contenant du MUC comme décrit au "chapitre matériel" et méthodes. Par cette méthode, nous n'avons pu observer qu'une seule bande correspondant à cette enzyme dans les extraits protéiques des différents surnageants de culture à l'exception de l'extrait protéique provenant de la culture sur cellobiose. Les résultats sont représentés sur la figure 31.

Pour localiser cette enzyme sur le gel, il est intéressant de noter que l'activité exoglucanase n'est visualisée que si l'échantillon protéique a été traité à 37°C pendant 2 heures avant migration électrophorétique. Aucune bande correspondant à cette enzyme n'a pu être détectée lorsque l'enzyme est chauffée à 50°C ou à 70°C pendant 15 minutes. Cet enzyme est donc thermosensible.

La localisation de la xylanase s'est faite de la même façon que pour l'endoglucanase mais seulement en incorporant le xylane dans le gel au lieu de la CMC.

Le spectre protéique du mutant n° 121 est le même que celui de la souche sauvage. Il en est de même des activités enzymatiques détectées.

3 – Discussion

a) Spectre protéique :

L'analyse de la composition des protéines extracellulaires de la souche sauvage de *Cl. cellulolyticum* et de ses deux mutants dérivés montre que leur spectre protéique est généralement semblable mais que quelques différences sont notables spécialement chez le mutant n° 42 qui montre seulement 3 bandes majeures alors que la souche sauvage présente 5 bandes. De plus, le spectre protéique du mutant n° 42 est distinct de celui du mutant n° 121 malgré le fait que ces deux mutants dérivent d'une même souche.

On peut donc conclure que la mutation de *Cl. cellulolyticum* souche sauvage a une influence sur la composition des protéines extracellulaires sécrétées par cette souche.

b) Identification et caractérisation des composants cellulolytiques

Le fractionnement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des enzymes extracellulaires sécrétées par *Cl. cellulolyticum* cultivée sur cellulose a permis une caractérisation préliminaire en termes d'activités

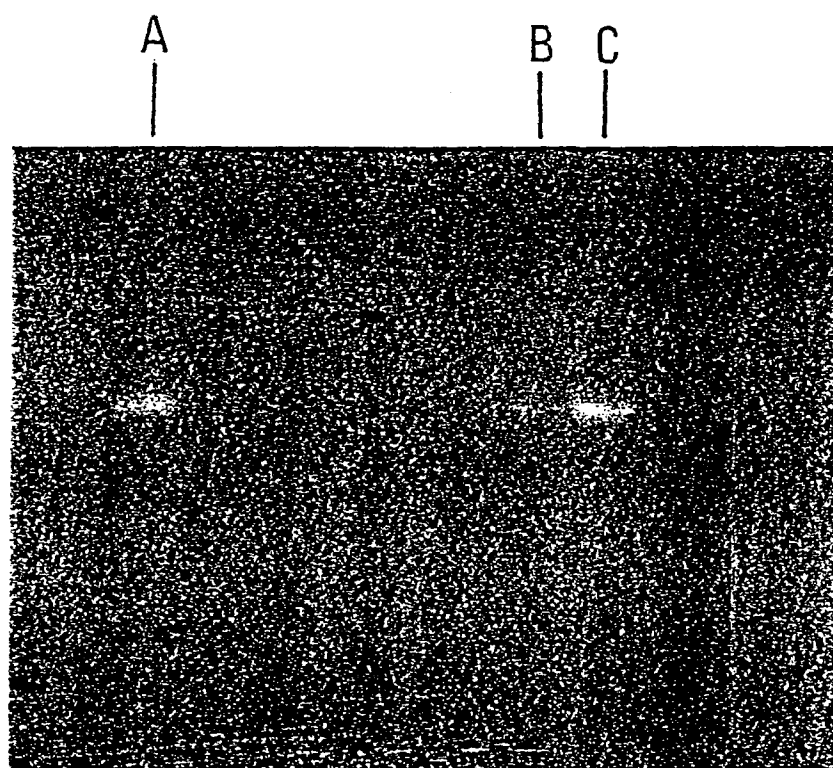


Figure 31 : Mise en évidence de l'activité exoglucanase dans les protéines extracellulaires de *Cl. cellulolyticum* (A) , du mutant 121 (B) et du mutant 42 (C).

exo et endocellulasiques. Cette technique a permis également une séparation satisfaisante et de façon reproductible du complexe cellulasique dans un minimum de temps. Une telle procédure analytique a été adoptée par Mc HALE ET COUGHLAN (1981) pour le fractionnement des enzymes secrétées par *Talaromyces ermersoni*, par CANEVASCINI et al. (1983) pour analyser la composition protéique des enzymes secrétées par *Sporotrichum thermophile*. D'après les résultats que nous avons obtenus nous pouvons affirmer que le complexe cellulasique de *Cl. cellulolyticum* contient les enzymes essentielles dont l'action synergique permet la dégradation de la cellulose en sucres simples. Ces enzymes sont composées de multiples formes d'endoglucanase et d'une exoglucanase.

Nous avons également observé que l'intensité relative des bandes dépend fortement de la quantité d'enzymes appliquées sur le gel. Alors que la raison de cette variation n'est pas très claire, il semble que l'efficacité de renaturation dépend souvent de la quantité de protéines présentes dans la bande. Ceci nous amène à penser que l'absence de bande correspondant aux enzymes cellulolytiques dans l'extrait enzymatique provenant de la culture de *Cl. cellulolyticum* sur cellobiose serait due à la faible quantité de protéine sécrétée.

Nous avons également observé que les activités endo et exoglucanase ne sont pas détruites par le SDS. Cette observation se rapproche de celle faite par KOYU HON nami et al. (1980) chez *Cl. thermocellum* où l'activité CMCase n'est pas détruite par le SDS. Mais d'un autre côté, nous avons constaté que l'activité exoglucanase est inactivée par la température. Aucune bande correspondant à cette enzyme n'a pu être localisée lorsque les préparations enzymatiques étaient traitées à 50°C et à 70°C.

En plus de la caractérisation des cellulases, nous avons détecté d'autres hydrolases telles que la xylanase. Alors que cette enzyme n'a été visualisée que sur le xylan, nous avons pu remarquer que les bandes correspondant à l'endoglucanase révélée sur la cellulose CMC ont été également localisées sur le gel contenant du xylane. Ce résultat laisse penser que l'endoglucanase n'est pas spécifique à la carboxyméthylcellulose.

D'après les résultats que nous avons obtenus, l'endoglucanase de *Cl. cellulolyticum* existerait sous formes multiples. Cette enzyme se présenterait sous forme d'isoenzymes de poids moléculaire variable. Ceci avait déjà été observé par ANDRIANARISOA (1985) chez *Cl. cellulolyticum* et par d'autres chercheurs utilisant des techniques de séparation

conventionnelles chez d'autres micro-organismes et chez *T. reesei*.

Les différences observées dans le spectre protéique des mutants n° 42 et n° 121 ne supportent pas entièrement les hypothèses de NAKAYAMANA, 1975 ; GON CS, 1979. Selon ces auteurs les multiformes d'enzymes cellulolytiques seraient dues à une protéolyse limitée d'un précurseur commun dans le milieu de culture (NAKAYAMANA, 1975 ; GON CS, 1979). Si une modification protéolytique d'un précurseur commun était la seule raison de la multiplicité des formes de l'enzyme, on obtiendrait le même spectre protéique pour les deux souches mutantes et probablement pas du tout d'activité.

4 - Conclusion

Les résultats obtenus nous montrent que la mutation de *Cl. cellulolyticum* par le rayonnement UV a une influence sur la composition protéique du complexe cellulolytique. La caractérisation préliminaire des protéines extracellulaires par analyse électrophorétique montre la présence au sein du complexe cellulasique de *Cl. cellulolyticum* et ses mutants des activités endo et exoglucanase. Ce qui nous permet de considérer leur système cellulolytique comme un complexe pur contenant toutes les activités nécessaires à l'hydrolyse de la cellulose cristalline.

5 - Application

Une séparation du complexe cellulasique de *Cl. cellulolyticum* et du mutant n° 42 a été réalisée au laboratoire de Bioengineering à Valencia (Espagne). Les résultats sont présentés sur les figures 32 et 33. Il ressort de cette étude que le complexe enzymatique des deux souches présentent des chromatogrammes différents.

- *Cl. cellulolyticum* possède un seul pic de poids moléculaire supérieur à $20 \cdot 10^6$ daltons

- le mutant n° 42 possède en plus du pic de poids moléculaire supérieur à $20 \cdot 10^6$ daltons, trois autres pics importants : $1-3 \cdot 10^6$, $0,7-0,9 \cdot 10^6$, $6-8 \cdot 10^6$ dotés d'activité cellulasique. Cette structure diversifiée pourrait être à l'origine de la forte activité cellulasique que présente le mutant n° 42 sur cellulose microcristalline type Avicel.

Ces premiers résultats obtenus permettent d'avancer une hypothèse dans l'interprétation de la présence chez le mutant n° 42 d'activités enzymatiques particulièrement élevées. Ils ont montré que contrairement à la souche sauvage, le mutant n° 42 excrète dans le milieu de culture des

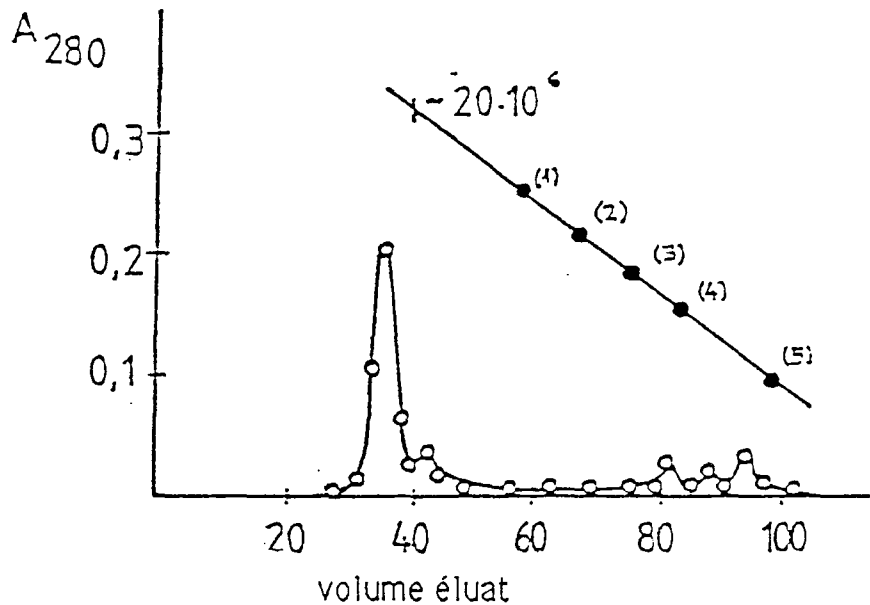


Figure 32 : Chromatographie sur sepharose 4B du complexe cellulolytique de *Cl. cellulolyticum*.
 Dimensions colonne : 1,6 x 50 cm ; vitesse 12 ml/h ;
 volume fraction = 2,1 ml ; volume échantillon = 0,5 ml ;
 liquide d'équilibration et d'élution : eau

Etalonnage de l'exclusion avec les poids moléculaires :
 (1) Tiroglobuline : 670 000 ; (2) Gammaglobuline : 158 000 ; (3)
 Ovalbumine : 44 000 ; (4) Myoglobine : 17 000 ; (5) Vitamine B₁₂ : 1350.

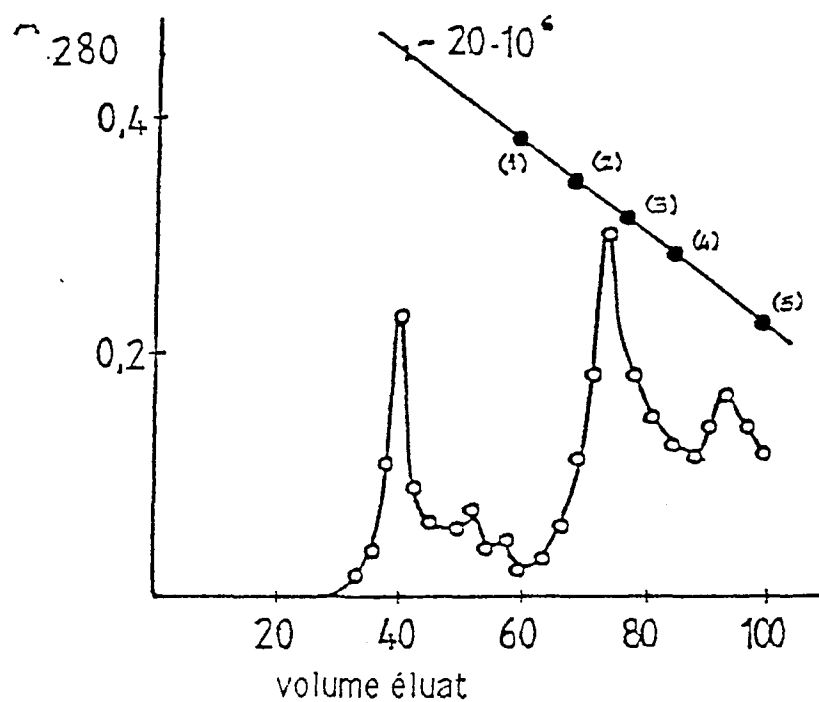


Figure 33 : Chromatographie sur sepharose 4B du complexe cellulolytique du mutant 42 .
 Dimensions colonne : 1,6 x 50 cm ; vitesse 12 ml/h ; volume fraction = 2,6 ml ; volume échantillon = 2 ml
 liquide d'équilibration et d'élution : eau .

protéines enzymatiques de petites dimensions séparables par gel filtration. Grâce à leur petite taille, elles pourraient pénétrer plus aisément dans les pores du substrat cellulosique ; ce caractère souhaité pour des cellulases a été évoqué à la réunion de la CEE d'Orléans en 1987.

Sur le plan industriel, des essais ont été réalisés avec le mutant n° 42 pour la production de biogaz par le procédé de méthanisation des ordures ménagères (OM) en comparaison avec la souche mère *Cl. cellulolyticum*.

Les résultats des premiers essais montrent que :

- la capacité de *Cl. cellulolyticum* à s'implanter dans le milieu varie selon la qualité des OM. Il semble que cette souche nécessite une période de latence ou d'adaptation et des OM prédégradées pour stimuler fortement la production de biogaz.

- le mutant n° 42 semble moins influencé que *Cl. cellulolyticum* par la dégradation des OM. Bien qu'étranger à la flore, il s'intègre correctement au milieu de fermentation et stimule la production de biogaz. Il peut s'incorporer à la niche écologique et modifier l'équilibre de la méthanisation en le stimulant.

Les pourcentages de stimulation moyens obtenus avec chaque souche sont représentés dans le tableau (17) ci-dessous :

	Phase exponentielle	Phase stationnaire
H10	20 %	15 %
Mutant n° 42	20 - 50 %	40 %

L'étude de ce tableau montre que les pourcentages de stimulation sont inférieurs en phase stationnaire pour *Cl. cellulolyticum*.

Pour le mutant n° 42, les pourcentages de stimulation sont plus forts et sont constants tout au long de la fermentation.

Il est à noter que la stimulation est fonction non pas de la quantité de cellulases que l'on amène, mais des possibilités d'adaptation de la souche, elles-mêmes fonction de la qualité des ordures ménagères.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail était d'améliorer les performances cellulolytiques de *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319 dans le but d'arriver à une possibilité d'utilisation industrielle de la souche.

Tout au long de ce travail , nous avons montré que l'amélioration de la production de cellulase par *Cl cellulolyticum* est réalisable :

- au niveau des conditions de culture , notre travail s'est porté sur la recherche des conditions qui permettent une meilleure production de cellulases . Ainsi, nous avons étudié l'influence du milieu de culture sur la production de cellulases par la souche de *Cl. cellulolyticum*. Cette étude a montré que :

- Sans régulation de pH , dans les conditions de culture en tubes de Hungate , l'ordre d'influence relative des trois milieux de culture que nous avons testés en comparaison avec le milieu CM3 de WEIMER et ZEIKUS, sur la production de cellulases était : DMS1 > CM3 + Urée > CM3 + Urée + MOPS > CM3 .

Le milieu DMS1 s'est révélé particulièrement intéressant :

lorsque la culture est réalisée sur cellulose MN 300 , l'utilisation de ce milieu conduit à une plus forte production de cellulases:

- l'activité engluconasique est multipliée par un facteur 2 ;
- l'activité exogluconasique est multipliée par un facteur 3.

Lorsque la culture est réalisée sur cellobiose , les activités enzymatiques varient dans le même sens que pour la cellulose MN 300.

L'étude de l'influence des différentes sources d'azote sur la production des enzymes cellulasiqes a montré que le milieu CM3 est pauvre en azote. Une supplémentation de ce milieu en azote conduit à une augmentation de la production de l'activité endogluconase

Ainsi , une culture de *Cl. cellulolyticum* avec régulation de pH par une solution d'ammoniac 4N a montré une amélioration de l'activité cellulasiqse globale :

- l'activité endogluconasique est multipliée par un facteur 3 ;
- l'activité exogluconasique est multipliée par un facteur 6 .

Mais nous avons constaté que cette augmentation dépend de la nature de la source principale de carbone utilisée.

Ainsi, une étude de l'influence des différents substrats celluloses MN 300 , Avicel et Solka Floc sur la formation des enzymes cellulases par *Cl. cellulolyticum* a montré que le niveau de production de ces enzymes dépend de la nature de la source principale de carbone utilisé. La cellulose Avicel s'est révélée meilleur inducteur de cellulases pour cette souche.

Dans un deuxième temps , nous avons essayé d'améliorer la souche de *Cl. cellulolyticum* en sélectionnant des souches mutantes présentant des activités enzymatiques améliorées que la souche mère . Il convient ici de souligner que la génétique de la souche n'est pas encore très connue.

L'emploi du rayonnement ultraviolet comme agent mutagène a permis d'obtenir une souche mutante de *Cl. cellulolyticum*, le mutant n° 42 dont les performances cellulolytiques sont nettement meilleures que celle de la souche mère.

Il a été possible grâce au mutant n° 42 d'améliorer :

- le temps de fermentation de la cellulose ; il est ramené à 8 jours au lieu de 12 jours pour la souche mère ,
 - l'activité endoglucanasique (CMCase) atteint après 8 jours de fermentation 1,36 UI/ ml soit 3 fois les valeurs obtenues avec la souche mère . L'activité spécifique CMCase du mutant 42 se situe entre celle de *Cl. thermocellum* et celle de *T. reesei*,
 - l'activité exoglucanasique atteint 5,5 mUI/ml soit 7 fois plus importante que chez la souche mère ,
 - la vitesse de la cellulolyse est 2,3 fois plus importante chez le mutant 42 que chez *Cl. cellulolyticum* ; Après 8 jours de fermentation , le mutant dégrade 79 % de la cellulose Avicel et *Cl. cellulolyticum* ne dégrade que 35 % .
 - l'utilisation industrielle du mutant 42 pour la dégradation des ordures ménagères a montré que cette souche s'intègre correctement au milieu de fermentation et stimule la production de biogaz. Un pourcentage de stimulation de 20-50 % a été obtenu en phase exponentielle de croissance et seulement un pourcentage de 20 % pour la souche mère ;
- en phase stationnaire de croissance, ce pourcentage de stimulation est de 40 % pour le mutant 42 et 15 % pour la souche sauvage.

Les expériences d'associations de *Cl. cellulolyticum* et du mutant 42 n'ont pas permis d'augmenter la capacité de dégradation extensive de la cellulose . Aucun effet de synergie n'apparaît entre les CMCases et avicelases des surnageants de cultures pures; par contre une synergie d'action des xylanases a été mise en évidence .

d'action des xylanases a été mise en évidence .

Cette approche biotechnologique nous a permis de constater que toutes les bactéries ne se prêtent pas à des expériences d'association de microorganismes.

En plus des essais d'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum*, nous avons entrepris une étude du système cellulolytique des protéines extracellulaires de cette souche et de son mutant :

une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des surnageants de cultures concentrées des deux souches a permis de montrer la présence de protéines dont les poids moléculaires sont compris entre 29 et 120 kd . Ces protéines possèdent une activité endoglucanasique , exoglucanasique . *Cl. cellulolyticum* et son mutant semble donc posséder un système cellulolytique complet.

Une étude préliminaire de la séparation du complexe cellulasique des protéines extracellulaires de ces deux microorganismes a montré la présence chez le mutant 42 des protéines enzymatiques de petites dimensions séparables par gel filtration . Grâce à leurs petites tailles pourraient pénétrer plus aisément dans les pores du substrat cellulosique et permettre une meilleure dégradation.

Les déchets urbains de toutes sortes renferment 50 à 60 % de cellulose, hémicellulose et lignine. Pour les éliminer, il existe plusieurs techniques parmi lesquelles la méthanisation qui est l'une des plus valorisantes. C'est pourquoi de nombreuses communautés et collectivités ont retenu la méthanisation des déchets lignocellulosiques qui consiste à dégrader les celluloses et hémicelluloses. Or il est bien connu que l'hydrolyse des polysaccharides possède un caractère "Vitesse Limitante" qui constitue un frein à l'application industrielle des procédés de transformation biologique des composés lignocellulosiques de la biomasse.

Cette étude sur l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* permet pour le développement futur du travail d'envisager de rechercher des conditions autorisant la dissociation du complexe " Bactéries - Enzymes - Cellulose " et la libération des enzymes dans le milieu de fermentation ; ce qui permettrait d'optimiser l'hydrolyse bactérienne de polysaccharides de la lignocellulose en sucres simples. Ceci ayant pour objectif d'optimiser la biométhanisation.

A ce propos , il convient de souligner que la culture énergétique pour la production de méthane n'a pas encore fait l'objet d'un intérêt particulier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AIT, N., N. CREUZET and P. FORGET. 1979a.
J. Gen. Microbiol. **113** : 399-402.
- AKIN, D.E., H.E. AMOS . 1975.
Appl. Microbiol. **29** : 692-701.
- AKIN D.E. 1976.
Appl. Environ. Microbiol. **31**: 562-568.
- ALLOCK, E.R., S.J. REID, D.T. JONES, and D.R. WOODS. 1981.
Appl. Environ. Microbiol. **42** (6s) : 935-939.
- ANDER, P., K.E. ERIKSSON . 1975.
Svensk papperstiden . **18** : 643-652 .
- ANDER, P. , K.E. ERIKSSON . 1977.
Physiol. Plant. **41** : 239-248.
- ANDRIANARISSOA . 1985.
Thèse de 3e cycle , Université d'Aix-Marseille I.
- AYERS, W.A. 1958.
J. Bacteriol. **76** : 515-517
- AYERS, W.A. 1959.
J. Biol. Chem. **234** : 2819-2822.
- AYERS, A., S.B. AYERS and K.E. ERIKSSON. 1978.
Eur. J. Biochem. **90** : 171-181.
- BACON, J.S.D. 1979.
dans "Microbial polysaccharides and polysaccharases", 270-284.
BERKELEY R;C;W;, GOODAY J;W;, ELLWOOD D;C; (ed.).
Academic Press, Inc., London.
- BAGNARA, G., R. TOCI, C. GAUDIN and J.P. BELAICH. 1985.
Int. J. Syst. Bacteriol. **35** : 502-507.
- BARNOUD, F. and K. RUEL. 1980.
Colloque Cellulolyse Microbienne , CNRS Marseille , 23-24 Mai 1980.

- BAUCHOP, T. 1979.
Ann. Rech. Vet. **10** : 246-248.
- BAYER, E.A., R. KENIG and R. LAMED. 1983.
J. Bacteriol. **156** : 818-827.
- BEGUIN, P., H. EISEN, and A. ROUPAS. 1977.
J. Gen. Microbiol. **101**: 191-196.
- BEGUIN, P., P. CORNET and J. MILLET. 1983.
Biochimie, **65** : 495-500 .
- BERG, B., B.V HOFSTEN and G. PETTERSSON. 1972.
J. Appl. Bacteriol. **35** : 201-204.
- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology 8th ed. 1974.
BUCHANAN, R.E. et N.E. GIBBONS (eds). The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. 1984.
KRIEG, N.R. et J.G. HOLT (ed) . The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- BLASCHEK, H.P. and M.A. KLACIK. 1984.
Appl. Environ. Microbiol. **48** : 178-181
- BORETTI, G., L. GAROFANO, P. MONTECUCCHI and C. SPALLA. 1973.
Arch. Microbiol. **92** : 189-200.
- BOWRING, S.N. and J.G. MORRIS. 1985.
Journal of Applied Bacteriology. **58** : 577-584.
- BOYER, M.H., J.P. CHAMBOST, M. MAGNAN and J. CATTANEO. 1984 a.
J. Biotechnol. **1** : 229-239.
- BOYER, M.H. 1985.
Thèse de 3e cycle, Marseille, Décembre 1985.
- BRADFORD, M.M. 1976.
Analytic. Biochem. **72** : 248-254

BRYANT, M.P. and N. SMALL. 1956.
J. Bacteriol. **72** : 22-26 .

BRYANT, M.P. 1963.
J. Anim. Sci. **22** : 801-813.

BRYANT, M.P. 1972.
Am. J. Clin. Nutr. **25** : 1324-1328 .

BRYANT, M.P. 1973.
Fed. Proc. **32** : 1809-1813.

CANEVASCINI, G., D. GRACHEBOUD and H. MELER. 1973.
Can. J. Microbiol. **29** : 1071-1080.

CHANG, W.T.H. and D.W. TAYER. 1977.
J. Microbiol. **23** : 1285-1292.

CHENG, K.J., BROWN and J.W. COSTERTON. 1977.
Appl. Environ. Microbiol. **33** : 718-724.

CHENG, K.J. , J.W. COSTERTON. 1979.
Dans "Digestive physiology and metabolism in ruminants".
RUCKEBUSH Y., THIVEND P. (ed.)
M.T.P. PRESS, LANCASTER.

CHOI, W.J. , K.D. HAGGET and N.W. DUNN . 1978.
Aust. J. Biol. Sci. **31** : 553-564.

CHOUDHURY, N., P.P. GRAY and N.W. DUNN . 1980.
Biotechnol. lett. **2** : 427-428.

COLVIN, J.R. 1972.
CRC. Crit. Rev. macromol. Sci. **1** : 47-81.

CHUNG, K.T. 1976.
Appl. Environ. Microbiol. **31** : 342-348.

CREUZET, N. et C. FRIXON . 1983 a.
Biochimie , **65** : 149-156.

DERMOUN, Z. 1986.
Thèse de Doctorat ès-Sciences-Université d'Aix-Marseille I .

DESPHANDE, M.V., K.E. ERIKSSON et L.G PETTERSON. 1984.
Anal. Biochem. **138** : 481-487.

DUONG, T.V.C., E.A. JOHNSON et A.L. DEMAİN. 1983.
Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.
(ed.) A. WEISMAN **7**: 156-195 .

DURRE, P., A. KUHN et G. GOTTSCHALIX. 1986.
FEMS Microbiol. Letters, **36** : 77-81 .

ENRIQUEZ, A. and H. RODRIGUEZ. 1983.
Biotechnol. Bioeng. **25** : 877-880.

ERIKSSON, K.T. et B. PETTERSON . 1975.
Eur. J. Biochem. **51** : 213-218.

FOND, O., E. PETITDEMANGE, H. PETITDEMANGE and J.M. ENGASSER. 1983.
Biotechnol. Bioeng. Symp. **13** : 217-224 .

FREY-WYSSLING. 1979.
Fortschr. Chem. Org. Naturst. **27** : 1-30.

GARCIA-MARTÍNEZ, D.V., A. SHIMNYO, A. MADIA and A.L. DEMAİN 1980.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **9** : 189-197 .

GARG, S.K. and S. NEELAKAN. 1982.
Biotechnol. Bioeng. **24** : 2407-2417.

GIALLO, J. 1984.
Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université d'Aix-Marseille I.

GILKES, N.R. , M.L. LANGSFORD, D.G. KILBURN, R.C. MILLER JR. and R.A.J. WARREN. 1984 c .
J. Biol. Chem. **259** : 10 455 - 10 459.

- GOMEZ, R.F. , B. SNEDECOR and B. MENDEZ. 1981.
Developments in Industrial Microbiology. **22** : 87-96.
- GONG, C.S. , M.R. LADISCH and G.T. TSAO. 1977.
Biotechnol. and Bioeng. **19** : 959-981.
- GONG, C.S., M.R. LADISCH and G.T. TSAO. 1979.
Adv. Chem. Ser. **181** : 261-287.
- GORDON, J., M. JIMING, C.L. GOONEY and D.I.G. WANG. 1978.
Aiche Symp. Ser n° 18 174 : 91-97.
- GROLEAU, D. and C.W. FORSBERG. 1981.
Can. J. Microbiol. **27** : 517-530.
- GROLEAU, D. and C.W. FORSBERG. 1983.
Can. J. Microbiol. **29** : 504-517.
- GUM, E.K. and R.D. BROWN. 1977.
Biochim. Biophys. Acta. **492** : 225-231.
- GUPTA, D.P. and J.B. HEAELE. 1971.
J. Gen. Microbiol. **63** : 163-173
- HAGGET, K.D. , P.P. GRAY and N.W. DUNN. 1979.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8** : 183-190.
- HALLIWELL, G. 1961.
Biochem. J. **79** : 185-192.
- HALLIWELL, G. and M. RIAZ. 1971.
Mikrobiol. **78** : 295-309.
- HALLIWELL, G. M. GRIFFIN and R. VINCENT. 1972.
Biochem. J. **127** : 43 P.
- HALLIWELL, G. and M. GRIFFIN. 1973.
Biochem. J. **135** : 587-594.

- HAN, Y.W. and V.R. SRINIVASAN. 1968.
Appl. Microbiol. **16** : 1140-1145.
- HAN, H.W. 1982.
J. Ferment. Technol. **60** : 99-104.
- HERMANN, M., P. FAYOLLE and R. MARCHAL. 1983.
Eur. Pat. Appl. EP 88 : 14 September.
- HERRERO, A.A. and R.F. GOMEZ. 1980.
Appl. Environ. Microbiol. **40** : 571-577.
- HEYN, A.N.J. 1966.
J. Cell. Biol. **29** : 181-197.
- HITCHNER, E.V. and J.M. LEATHERWOOD. 1980.
Appl. Environ. Microbiol. **39** : 382-386.
- HULCHER, F.H. and K.W. KING. 1958 a .
J. Bacteriol. **76** : 565-570.
- HULCHER, F.H. and K.W. KING. 1958 b.
J. Bacteriol. **76** : 571-577 .
- HUNGATE, R.E. 1944.
Bacteriol. **48** : 499 - 513 .
- HUNGATE, R.E. 1950.
Bacteriol. , Rév. **14** : 1-49 .
- HUNGATE, R.E. 1957.
Can. J. Microbiol. **3** : 289-311.
- HUNGATE, R.E. 1969.
Methods in microbiology Vol. **3b**. Academic Press Inc London.
- JANATI-IDRISSI, R. , A.M. JUNELLES , A. EL KANOUNI , H. PETITDEMANGE and R. GAY . 1984.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. **138** : 313-323.

JONES, D.T., A. VAN DER WESTHUIZEN, S. LONG, E.R. ALLOSK, S.J. REID and D.R. WOODS. 1982.

Appl. Environ. Microbiol. **43** : 1434-1439.

JONES, D.T. and D.R. WOODS . 1986 b.

Microbiological Sciences . **31** : 19-22.

JOHNSON, E.A. , M. SAKAJON, G. HALLIWELL, A.MADIA and A.L. DEMAIN. 1982.

Appl. Environ. Microbiol. **43** : 1125-1132.

KAN, A.W. , J.N. SADDLER, G.B. PATEL, J.R. COLVIN and S.M. MARTIN. 1980. FEMS Microbiol. Lett. **7** : 47-50.

KEDDIE, R.M. 1974.

dans "BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology" p. 629-631. 8ème Ed.

KOYU HON-nami, M.P. COUGHLAN , HIROMI HON-nami and L.G. LUNGDAHL. 1966.

Arch. Microbiol. **145** : 13-19.

KRISTENSEN, T.P. 1978.

Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **5** :155-163 .

KUBICEK, C.P. 1981.

dans " Cellulases and their application" (R.E. GOULD Ed.) p. 7-25. Advances in chemistry . Series **95**. Washington D.C. American Chemical Society.

LADISCH, M.R. , and G.T. TSAO .1979 b.

Energy , **4** : 263-275 , Pergamon Press.

LAEMLI, U.K. 1970.

Nature , **227** : 680-685.

LAMED, R. , E. SETTER, R. KENIG and E.A.BAYER. 1983 b.

Biotechnol. Bioengin. Symp. **13** : 163-181 .

LANSFORD, M.L., N.R. GILKES, W.W. WAKARCHUK, D.G. KILBURN, R.C.J.R. MILLER, and A.J. WARREN. 1984.

J. Gen. Microbiol. **130** : 1367-1376 .

LEMME, S.A. 1985.
Biotechnology Letters. **7** : 711-716.

LESHINE, S.B. and E. CANALE-PAROLA. 1984.
Current Microbiol. **11** : 129-136.

LI, L.H. , R.M. FLORA and K.W. KING. 1965.
Arch. Biochem. Biophys. **111** : 439-447.

LYNCH, J.M. , J.H. SLATER, J.A. BENETT and S.H.T. HARPER. 1981.
J. Gen. Microbiol. **127** : 231-236.

MADDEN, R.H. 1983.
Int. J. Syst. Bacteriol. **33** : 837 - 840.

MANDELS, M. , S. DORVAL and J. MEIDERSOS .1978.
Shuster, W.W. (ed.) . 627-669. RPI. TROY,N.Y.

MANDEL, M. 1985.
Biochem. Soc. Trans. **13** : 414-416.

MANLEY, R.ST.J. 1964.
Nature, **204** : 1155-1157.

Mc HALE, A. and M.P. COUGHLAN. 1980.
FEBS Lett. **117** : 319-322.

Mc HALE, A. and M.P. COUGHLAN. 1981.
Biochim. Biophys. Acta. **662** : 145-151.

Mc KENZIE, C.R. and D. BILOUS . 1982.
Can. J. Microbiol. **28** : 1158-1164.

MILLET, J., P. BEGUIN, G. JOLIFF , O. GREPINET and J.P. AUBERT. 1986.
1er Congrès de la Société Française de Microbiologie, Toulouse 3-4-5
Avril .

- MISHRA, C. , M. VAIDYA , M. RAO and V. DESHPANDE. 1983.
Enzyme Microb. Technol. **5** : 430-434.
- MOLENEY, A.P., T.J. HACKETT, P.J. CONSIDINE and J.P. COUGLAN. 1983.
Enzyme Microb. Technol. **5** : 260-264.
- MUNHLETHALER, K. 1969.
J. Polymer. Sci. Part. C. **28** : 305-308.
- NAKAMURA, K. and K. KITAMURA. 1982.
J. Ferm. Technol. **60** : 343-348.
- NAKAMURA, K. and K. KITAMURA. 1983.
J. Ferment Technol. **61**: 379-382.
- NAKAYAMA, M., Y.TOMITA, H. SUZUKI and K. NISIZAWAK. 1976.
J. Biochem. **79** : 955-966.
- NG. T.K. , P. WEIMER and J.G. ZEIKUS. 1977.
Arch. Microbiol. **114**: 1-7.
- NG T.K. , P. WEIMER and J.G. ZEIKUS. 1981.
Biochem. J. **199** : 341-350.
- NG T.K. and J.G. ZEIKUS. 1981.
Appl. Environ. Microbiol. **42** : 231-240.
- ORPIN, C.G. 1975.
J. Gen. Microbiol. **91** : 249-262.
- PATTEL, G.B. and G.R. Mc KENZIE . 1982.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **16** : 212-218.
- PEREZ-MARTINEZ, L., J. GONZALEZ-CANDELAS, J. POLAINA and A. FLORS.
1988.
Journal of Industrial Microbiology. **3** : 365-371
- PETTERSSON, L.G. 1963.
Biochem. Biophys. Acta. **77** : 665-667.

- PETTERSSON, L.G. 1975.
 "Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose " p. 255-261 .
- PETITDEMANGE, E., F. CAILLET, G. GIALLO and C. GAUDIN . 1984.
 Int. J. Syst. Bacteriol. **34** : 155-159.
- PETRE, J., R.LONGIN and J. MILLET. 1981.
 Biochimie. **63** : 629-639.
- PETRE, D. 1985.
 Thèse de Doctorat d'Ingénieur , Université de Paris VII .
- PIERSON, H. 1984.
 D.E.A. , UER. Alimentation-Nutrition , Université de Nancy 1.
- PLASSE, F. 1980.
 Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université d'Aix-Marseille II
- PRESTON, R.D. and J.C. CRONSHAN. 1958.
 Nature . **181** : 248-250 .
- REESE, E.T., R.G.H. SIU and H.S. LEVINSON. 1950.
 J. Bact. **59** : 485-497.
- REESE, E.T., A.H. MAGUIRE and F.W. PARRISH. 1968.
 Can. J. Biochem. **46** : 25-34 .
- REESE, E.T., M.MANDELS and A.H. WEISS . 1972.
 Adv. Biochem. Eng. **2** : 181-200.
- REESE, E.T. 1977.
 Recent Adv. Phytochem. **7** : 311-365 .
- RICHARD, P.A.D. et T.A. LAUGHLIN . 1980.
 Dans les " Polymères Végétaux " , B. Montières (ed.), Gauthier. Villars 46-65.
- RICHARD, P.A.D. and S.P. PEIRIS . 1981.
 Biotechnol. lett. **3** : 39-44.

- ROGERS, P. 1986.
Advances in Appl. Microbiol. **31** : 1-60.
- SAIDANI, H. 1983.
Thèse de Doctorat de spécialité , Université d'Aix-Marseille I .
- SATO, M. and H.TAKAHASHI. 1967.
Agr. Biol. chem. **31** : 470-474
- SCHELIHORN, H.E. and C.W. FORSBERG. 1984.
Can. J. Microbiol. **30** : 930-937.
- SCHINZ, K.L., B. BROLL, B. RUTTEN and M. TRETTER. 1981.
Biochem. Soc. Transact. **9** : 2-165.
- SCHWARTZ, R.D. and F.A. KELLER. 1982.
Appl. and Environ. Microbiol. **43** : 117-123.
- SELBY, K., C.C. MAITLAND. 1967.
Biochem. J. **104** : 716-724.
- SELBY, K. 1968.
"Proc. 1st. International. Biodeterioration Symp. Southampton " 1968,
Amsterdam; London, N.Y. , Elsevier publishing Co. : 62-78.
- SHETH, K. and J.K. ALEXANDER . 1969.
J. Biol. chem. **244** : 457-464.
- SHEWALE, L.G. and J.C. SADANA . 1981.
Arch. Biochem. Biophys. **207** : 185-196
- SHINMYO, A. , D.V. GARCIA-MARTINEZ and A.L. DEMAINE . 1979.
J. Appl. Biochem. **1** : 202-209.
- SIH ,C.J. , Mc BEE, R.H., (1955)
Proc. Montana Acad. Sci. **15** : 21-22.
- SLEAT , R. , R.A. MAH and R. ROBINSON. 1984.
Appl. Environ. Microbiol. **48** : 88-93 .

- SMITH, P.H., F.M. BORDEAUX, A. WILKIE, J. YANG, D. BOONE, R.A. MAH ,
D. CHYNOWETH and D. JERGER . 1988
Elsevier Applied Science LONDON : 335-353 .
- STACKEBRANDT, E. and O. KANDLER. 1979.
Int. J. Syst. Bacteriol. **30** : 186-188.
- STACKEBRANDT, E. and O. KANDLER . 1980 a.
Int. J. Syst. Bacteriol. **30** : 186-188.
- STACKEBRAND, E., H. SEILER and K.H. SCHLEIFER. 1982.
Zentralbl. Bakteriол. parasitenkd. Infektion. Skr. Hyg. Abt.
1 orig. Reiche C1 : 40-50.
- STORVICK, W.O., F.E. COLE and K.W. KING .1963.
Biochemistry. **2** : 1106-1110.
- STREAMER, M., K.E. ERIKSSON and B. PETTERSSON. 1975.
Europ. J; Biochem. **59** : 607-613.
- TARDIF, C. 1982.
D.E.A. , Université d'Aix-Marseille I
- TRACEY, M.V. 1950.
Biochem. J. **47** : 433-436.
- TSENG, T.C. 1974.
Bot. Bull. Academica Chimica .**15** : 49-53.
- WEIMER, P.J. and J.G. ZEIKUS. 1977.
Appl. and Environ. Microbiol. **33** : 289-297.
- WILDISH, D.J. and N.J. POOLE. 1970.
Comparative Biochemistry and Physiology . **33** : 213-216 .
- WITTAKER, R.H. 1970.
Communities Ecosystems Mac Milan, New-York.
- WOLFANG, H., K. BRONNENMEIER, F. GRABNITZ and W.L. STAUDENBAUER.
1987.
Analytical. Biochem. **164** : 72-77 .

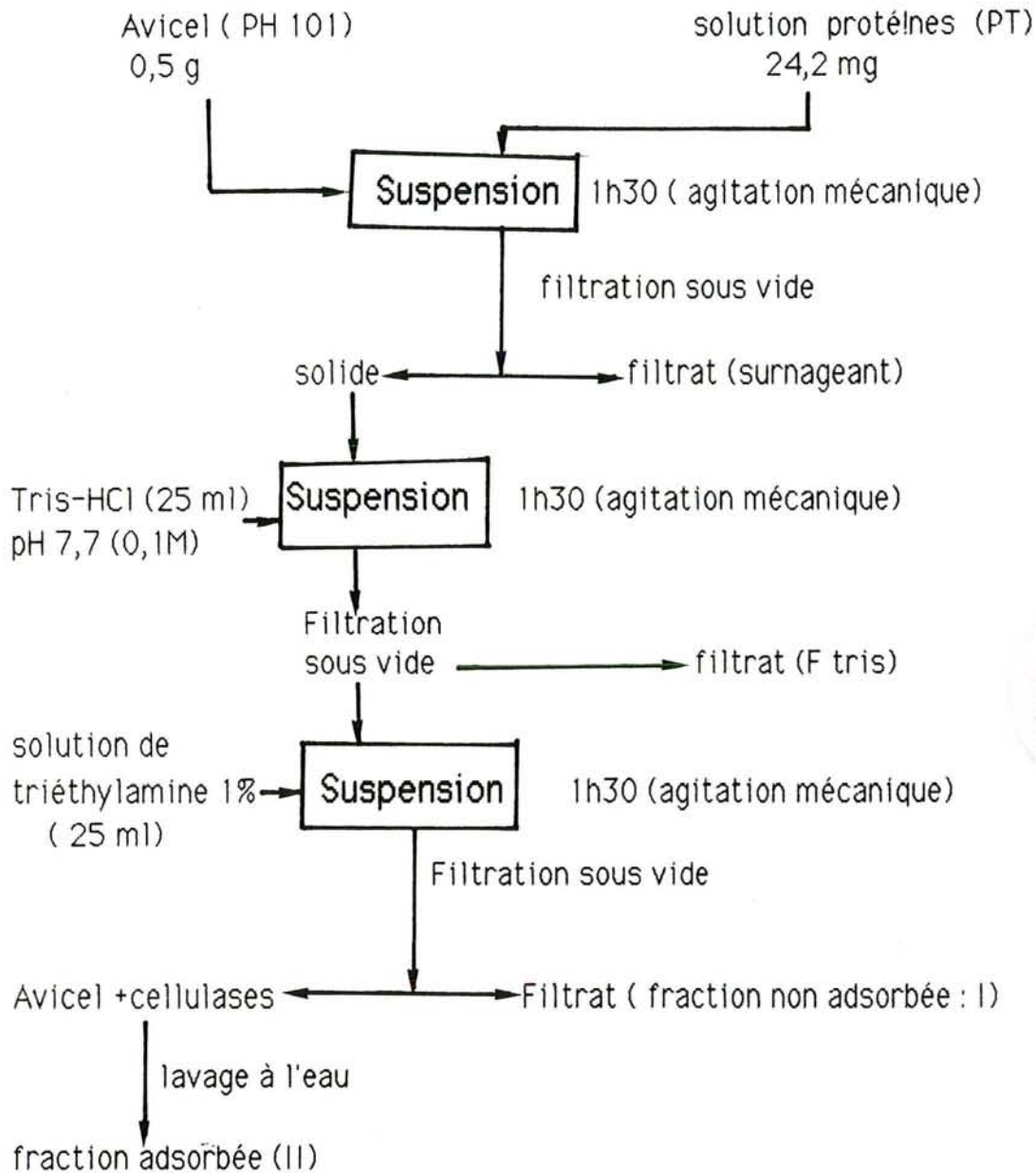
WOOD, T.M. 1969.
Biochem. J. **115** : 457-464.

WOOD , T.M. 1975.
Biotechn. Bioeng. Symp. **5** : 111-137

WOOD, T.M. and S.I. Mc CRAE. 1979.
Adv. Chem. Series . **181** : 181-200

WOOD, T.M. and S.I. Mc CRAE. 1982.
Carbohydr. Res. **110** : 291-303 .

ZALEWSKA-SOBCZAK, J. and H. URBANEK . 1981.
Arch. Microbiol. **129** : 247-250 .



Protocole de la séparation par adsorption sur cellulose Avicel de composants du complexe cellulasique extracellulaire de *Cl. cellulolyticum*

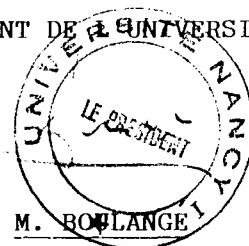
NOM DE L'ETUDIANT : TCHUNDEN Jeannette

NATURE DE LA THESE : Doctorat de l'Université de NANCY I
en Biochimie Appliquée

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 1^{er} FEV. 1990 n° 465

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



Résumé : *Cl. cellulolyticum* est une bactérie cellulolytique mésophile isolée au laboratoire à partir d'herbes en décomposition. Cette bactérie est capable de dégrader la cellulose en sucres simples puis de fermenter ces sucres en acides et en alcools. Mais l'activité cellulolytique de la souche reste faible. Pour arriver à une possibilité d'utilisation industrielle, il paraît nécessaire d'améliorer les performances cellulolytiques de la bactérie en la rendant meilleure productrice de cellulases.

L'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* passe par l'amélioration des conditions de culture car chez cette souche la biosynthèse des cellulases est couplée à la croissance du microorganisme. Ainsi nous avons montré, qu'une culture en fermenteur avec régulation de pH à 7,2 par une solution d'ammoniac 4N, conduit à une plus forte production de cellulases.

L'utilisation du rayonnement ultraviolet comme agent mutagène et du cellobiose comme crible de sélection ont permis de sélectionner le mutant 42 qui présente des activités cellulases doubles de celles de la souche mère.

Nous avons également montré que la cellulose Avicel est meilleure inductrice des activités endo et exoglucanasiques aussi bien chez *Cl. cellulolyticum* que chez le mutant.

L'étude de l'association de la souche mère et du mutant 42 a permis de produire 4,7 fois plus d'activité xylanase.

Nous avons montré, après analyse électrophorétique des protéines extracellulaires de *Cl. cellulolyticum* et du mutant 42, suivie de zymogramme des activités cellulases, que leur système cellulolytique est complet ; il possède toutes les enzymes nécessaires à la solubilisation de la cellulose.

Mots Clés : *Cl. cellulolyticum* - cellulose - cellulase - endoglucanase - exoglucanase - xylanase - cellobiose.