

50376
1994
23

50376
1994
23

N° d'ordre: 1268

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

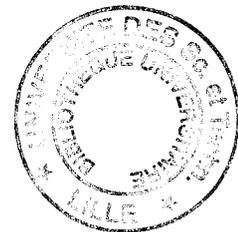
de

DOCTORAT D'UNIVERSITE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Microbiologie

Présentée par

Charlemagne-Gilles HOUNSA



Sujet de la thèse

OPTIMISATION EN MILIEU MINIMUM DE LA PRODUCTION D'UNE
PECTATE LYASE DE *BACTEROIDES* CLONÉE CHEZ *ESCHERICHIA COLI*

Soutenue le 28 Janvier 1994 devant la Commission d'examen :

- | | |
|--------------------|--|
| Président | M. R. TAILLIEZ, Professeur à l'Université de Lille 1 |
| Rapporteurs | M. J.N. BARBOTIN, Professeur à l'Université de Picardie
M. J.M. LEBEAULT, Professeur à l'Université de
Compiègne |
| Examineurs | M. J.M. AUBRY, Professeur à l'Université de Lille 1
M. H.C. DUBOURGUIER, Directeur de Recherches INRA
M. J.P. HORNEZ, Maître de Conférences, Docteur d'Etat à
l'Université de Lille 1 |

RESUME

L'étude a porté sur l'optimisation en milieu minimum de la production d'une pectate lyase (EC 4.2.2.2) de *Bacteroides thetaiotaomicron* 217 clonée chez *Escherichia coli* HB101(pBT4). Cette étude nous a conduits, à partir de l'utilisation de deux types de plans d'expériences factoriels à deux niveaux inspirés du modèle de Box-Wilson (1951), à rechercher les facteurs pouvant influencer la production de l'enzyme. Nos résultats ont montré que l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium sont les constituants du milieu les plus influents sur la production de pectate lyase. Ces deux plans ont été complétés par la méthodologie de réponse de surface de Doehlert (1970) qui nous a permis de déterminer la bonne combinaison des concentrations de glucose et de magnésium pour une meilleure production de pectate lyase.

Le plasmide pBT4 est plus stable à 30°C qu'à 37°C, même en présence de tétracycline et d'ampicilline utilisées comme pressions de sélection. Un plan factoriel d'expériences de type 2⁴ nous a permis de montrer que la présence simultanée de tétracycline, d'ampicilline, et de glucose dans le milieu de culture contribue à une meilleure stabilité du pBT4 chez *E. coli* HB101 et à une meilleure reproductibilité dans la production de la pectate lyase.

Après 8 heures de culture en fermenteur, les concentrations du glucose et des sels d'ammonium sont réduites de moitié. Le réajustement de leurs concentrations entraîne une augmentation de la production de biomasse accompagnée d'une diminution importante de celle de pectate lyase. Sachant que la production d'acétate, que nous avons observée lors de la croissance de la cellule recombinée, est un des principaux facteurs limitant la production de biomasse et de pectate lyase en fermenteur, nous avons étudié l'influence de l'addition de l'extrait de levure à 1 g/l ou du 3-bromopyruvate à 50 µM sur la production de l'acétate par *E. coli* HB101(pBT4). Bien que ces deux substances réduisent de façon importante la quantité d'acétate produite dans le milieu de culture suivant des mécanismes différents, seul l'extrait de levure a permis une production de 3,7 g/l de biomasse et de 670 unités de pectate lyase par millilitre de culture en fermenteur. Ainsi, par étapes successives, nous sommes parvenus à augmenter la production de pectate lyase par la cellule recombinée d'environ 21 fois en erlenmeyers puis ensuite de 3 fois en fermenteur.

Mots clés: Optimisation, protéine recombinante, pectate lyase, fermentation, *Escherichia coli*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, stabilité plasmidique, acétate,

SUMMARY

This present study reports on the optimization of the production of one pectate lyase (E.C 4.2.2.2) from *Bacteroides thetaiotaomicron* 217 cloned in *Escherichia coli* HB101(pBT4). We have investigated the enzyme production with the statistical model of Box-Wilson (1951). Our results showed that casamino acids, glucose and magnesium are the more influent factors in pectate lyase production by recombinant *E. coli* HB101(pBT4). This model of Box-Wilson (1951) was completed with surface response methodology of Doehlert (1970), in order to optimize the ratios of glucose and magnesium concentrations for better pectate lyase production.

The recombinant plasmid pBT4 is more stable at 30°C than at 37°C even if tetracycline and ampicillin are used as selective pressure. The Box-Wilson model type 2⁴ showed that presence of both tetracycline, ampicillin and glucose in minimum medium contributes firstly, to a better stability of pBT4 in *E. coli* and, secondly, to a better reproducibility in fermentation processes.

After 8 hours of culture in fermentor, glucose and ammonium salts concentrations are reduced to 50%. Their adjustment at their initial levels leads to an increase of biomass with an important decrease of pectate lyase production. Taking account that the observed acetate production during the growth of recombinant cell is one of the major factor limiting the production of pectate lyase in fermentor, we have studied the influence of addition of yeast extract (1 g/l) and 3-bromopyruvate (50 µM) on acetate production by *Escherichia coli* HB101(pBT4). Although these two substances strongly reduce the amount of acetate in the minimum culture medium following different mechanisms, only yeast extract allowed a production of 3,7 g/l biomass and 670 units of pectate lyase per milliliter of culture in fermentor. Following successive steps, we have increased the production of pectate lyase by the recombinant cells of about 21-fold in erlenmeyers and three-fold in fermentor.

Keys words: Optimization, recombinant protein, pectate lyase, fermentation, *Escherichia coli*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, plasmid stability, acetate.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie (SN2) de l'Université des Sciences et Technologies de LILLE, dirigé par M. Roger TAILLIEZ, Professeur à l'Institut Agricole et Alimentaire de LILLE. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour l'honneur qu'il me fait de présider la Commission d'examen.

Je remercie MM. les Professeurs Jean-Noël BARBOTIN et Jean-Michel LEBEAULT qui ont accepté d'être rapporteurs de cette Thèse, ainsi que M. Jean-Pierre HORNEZ d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tout particulièrement M. le Professeur Jean-Marie AUBRY pour les nombreuses heures qu'il m'a accordées dans l'élaboration de ce travail malgré ses nombreuses occupations et son emploi du temps très chargé, ses précieux conseils et enfin pour m'avoir initié aux méthodes des plans d'expériences.

J'adresse mes sincères remerciements à M. Henri-Charles DUBOURGUIER, Directeur de Recherches à l'INRA, qui m'a accueilli au sein de son équipe. Je lui suis reconnaissant d'avoir suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt et d'avoir permis la réalisation de ce manuscrit par ses critiques et ses conseils.

Mes remerciements à Yann et Max, mes compagnons de laboratoire pour leur amitié, leur aide et les nombreuses discussions scientifiques qui m'ont permis d'orienter ce travail.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire d'avoir fait régner une ambiance amicale durant l'élaboration de ce travail.

Je ne saurais oublier ma famille et tous mes amis qui ont su m'encourager durant ces longues et difficiles années d'exil.

Enfin, je remercie le gouvernement Ivoirien pour m'avoir accordé une bourse qui m'a permis de réaliser ce travail.

SOMMAIRE

	Pages
I. INTRODUCTION.	7
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.	12
1. Historique et généralités	13
2. Action de la présence des plasmides sur la physiologie de la cellule.	14
3. L'instabilité plasmidique	16
4. Les méthodes utilisées pour stabiliser les plasmides	20
5. Optimisation des conditions de culture en fermenteur	23
6. Les pectinases	27
7. Objectif des travaux	31
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.	33
1. Les souches et les plasmides	34
2. Les milieux et les techniques de culture	35
3. Les techniques analytiques	36
4. Les techniques enzymatiques.	39
5. Stabilité et contenu plasmidiques	43
6. Les plans d'expériences utilisés	44
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	49
1. Estimation de la biomasse	50
2. Etude de la localisation de la pectate lyase	50
3. Optimisation de la composition du milieu minimum	52
4. Stabilité du pBT4 en fonction de la composition du milieu	74
5. Optimisation des conditions d'aération	79
6. Etudes des cinétiques de fermentation	82
7. Fed-batch	86
8. Développement de stratégies pour limiter la production d'acétate	88
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
VI. BIBLIOGRAPHIE	95

Sommaire des figures

- Figure 1. La carte de restriction du plasmide recombinant pBT4.
- Figure 2. Les halos de clarification.
- Figure 3. Corrélation entre la biomasse d'*E. coli* HB101(pBT4) exprimée en poids sec (g/l) et la densité optique mesurée à 600 nm.
- Figure 4. Influence de l'extrait de caséine sur la production de biomasse d'*E. coli* HB101(pBT4).
- Figure 5. Influence de l'extrait de caséine sur la production de pectate lyase.
- Figure 6. Stabilité du pBT4 en fonction de la température d'incubation.
- Figure 7. Influence de l'ampicilline et de la tétracycline sur la production de la pectate lyase.
- Figure 8. Etude de plusieurs coefficients de concentration de la production de pectate lyase.
- Figure 9. Construction du réseau de Doehlert.
- Figure 10. Représentation plane du réseau de Doehlert.
- Figure 11. Courbes d'isoréponses.
- Figure 12. Etude de la structure et de la concentration du pBT4 au cours de la fermentation.
- Figure 13. Etude des cinétiques de fermentation.
- Figure 14. Evolution des sels d'ammonium et du magnésium au cours de la fermentation.
- Figure 15. Influence de l'addition du glucose, des sels d'ammonium et de la variation de température sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Figure 16. La voie de production de l'acétate à partir du pyruvate.
- Figure 17. Les différentes étapes de conversion du pyruvate en acétate et production d'ATP au cours de la croissance d'*E. coli*.
- Figure 18. Influence du 3-bromopyruvate et de l'extrait de levure sur la production de biomasse et de pectate lyase.

Sommaire des tableaux

- Tableau 1. Application expérimentale du modèle de Box et Wilson (1951).
- Tableau 2. Application expérimentale du modèle de Doehlert (1970.)
- Tableau 3. Etude de la localisation de la pectate lyase recombinante chez *Escherichia coli* HB101(pBT4).
- Tableau 4. Etude comparative de l'influence des différentes sources de carbone sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Tableau 5. Etude de l'influence de différents tampons organiques sur la production de pectate lyase.
- Tableau 5. Influence des ions calcium et magnésium sur la production de pectate lyase.
- Tableau 7. Groupe 1 de facteurs utilisés dans la réalisation du premier plan d'expériences.
- Tableau 8. Groupe 2 de facteurs utilisés dans la réalisation du deuxième plan d'expériences.
- Tableau 9. Résultats expérimentaux du premier plan d'expériences.
- Tableau 10. Résultats expérimentaux du deuxième plan d'expériences.
- Tableau 11. Les coefficients de régression du premier plan d'expériences.
- Tableau 12. Les coefficients de régression du deuxième plan d'expériences.
- Tableau 13. La composition provisoire du milieu de culture.
- Tableau 14. Les coefficients de concentration et leurs correspondances pondérales.
- Tableau 15. Construction du réseau de Doehlert.
- Tableau 16. Les facteurs du troisième plan d'expériences pour l'étude de la stabilité du pBT4.
- Tableau 17. Résultats expérimentaux du troisième plan d'expériences.
- Tableau 18. Les coefficients de régression du troisième plan d'expériences.
- Tableau 19. La composition définitive du milieu de culture.
- Tableau 20. Etude de l'influence de l'aération sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Tableau 21. Etude de l'influence du débit d'air sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Tableau 22. Etude de l'influence de l'agitation sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Tableau 23. Production et consommation nettes de glucose ou d'acétate.
- Tableau 24. Influence de l'addition du glucose des sels d'ammonium et la variation de la température sur la production de biomasse et de pectate lyase.
- Tableau 25. Etude de l'influence du 3-bromopyruvate et de l'extrait de levure sur la production de pectate lyase et d'acétate.

INTRODUCTION

Parmi les systèmes dynamiques que comporte la biosphère, les bactéries anaérobies font partie de ceux ayant un champ d'action immense et jouant un rôle considérable. En effet, tous les grands cycles biochimiques des sols et des eaux concernant le carbone, l'azote, le soufre, le phosphore et les métaux sont conditionnés par les anaérobies au même titre que les aérobies mais avec une intensité supérieure (Prévot *et al.*, 1967). Les bactéries anaérobies ont survécu et évolué principalement dans les environnements à bas potentiel de réduction dont, entre autres, les sols imbibés d'eau, les décharges municipales, les eaux stagnantes, les eaux d'égouts, les sédiments aquatiques, le tractus digestif des animaux et, tous les autres habitats très faiblement aérés où les conditions d'humidité et de température sont favorables (Hungate, 1985; Brock et Madigan, 1988; Evans, 1988).

L'intérêt pour les bactéries anaérobies strictes se situe dans le fait qu'elles sont impliquées dans de nombreuses infections humaines (Swenson, 1986; Rocha *et al.*, 1991): le botulisme dû à l'ingestion de toxines de *Clostridium botulinum*, certaines entérocrites et la gangrène causées encore par quelques espèces de *Clostridium*, le tétanos par *Clostridium tetani*, des espèces du genre *Fusobacterium* associées à l'angine de Vincent et des infections cutanées attribuées à plusieurs espèces du genre *Bacteroides* (Canivez, 1990). De plus, les bactéries anaérobies possèdent d'énormes capacités de biodégradation (Schink et Zeikus, 1982; Madawar et Mithal, 1985) comme le traduit leur intervention dans les étapes de minéralisation des matières organiques en méthane.

Par ailleurs, les industries agro-alimentaires utilisant la matière première végétale font régulièrement appel à des systèmes enzymatiques pour produire, soit pour transformer, soit pour améliorer la qualité des produits finis. L'utilisation des micro-organismes dans les procédés de conversion de la matière organique remonte à plusieurs millénaires. Les caractéristiques intéressantes de ces procédés par rapport aux réactions chimiques classiques sont dues aux propriétés du système biologique de pouvoir se multiplier, s'adapter et évoluer très rapidement selon les conditions physico-chimiques environnantes. Les enzymes sont utilisées comme biocatalyseurs dans des conditions douces avec une spécificité très élevée pour le substrat (Kobayashi

et al., 1991) et la plupart d'entre-elles, utilisées à l'échelle industrielle, proviennent de micro-organismes aérobies tels que *Bacillus* sp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae* (Sasson, 1985).

Ces dernières années à travers le monde, s'est développé un effort de recherche pour une meilleure connaissance des potentialités métaboliques, génétiques et enzymatiques de nombreux micro-organismes anaérobies, principalement les genres *Clostridium* et *Bacteroides* (Patterson, 1989; Shoemaker et al., 1991). Actuellement, sur les anaérobies, on ne dispose que de peu d'informations au sujet de la physiologie et des régulations au niveau moléculaire. Ceci, en raison des difficultés méthodologiques de travail en anaérobiose stricte et du métabolisme tout à fait particulier des micro-organismes anaérobies qui diffère par bien des points de celui des aérobies. Pour contourner ces difficultés, la tendance qui se développe est le transfert des gènes des anaérobies vers des micro-organismes aérobies connus et faciles à étudier. Le développement de cet axe de recherche a déjà donné lieu au clonage d'un certain nombre de gènes impliqués dans les phénomènes de virulence de bactéries anaérobies ou codant pour des enzymes intervenant dans les processus de biodégradation et de bioconversion (Canivez, 1990).

Les progrès rapides du génie génétique, grâce au transfert des gènes codant pour des protéines données, ont permis à l'homme de modifier les souches microbiennes afin d'améliorer leurs propriétés ou créer des possibilités nouvelles d'utilisation dans des domaines tels que les industries pharmaceutiques et agro-alimentaires.

Pour modifier les potentialités d'une souche, il existe deux possibilités: la mutation et la recombinaison. Cette dernière est un procédé qui permet de produire une nouvelle combinaison de gènes présents dans des individus différents. Cette technologie offrant des perspectives nouvelles et immenses se heurte à de nombreux problèmes législatifs (Smith et al., 1992). Néanmoins, elle est de plus en plus utilisée et a permis de produire, en laboratoire et à l'échelle industrielle, des protéines recombinantes.

La cellule vivante est une fabrique de protéines. Elle synthétise les enzymes et les autres protéines qui maintiennent son intégrité et son fonctionnement physiologique. La cellule vivante peut être considérée comme

un réacteur chimique d'une grande complexité dans lesquels des milliers de réactions catalysées par des enzymes prennent place à côté des effets de régulations internes telles que l'inhibition, la répression et l'activation. Ces réactions du métabolisme sont subdivisées en anabolisme et en catabolisme (Parelukar et Lim, 1985). La physiologie de la cellule est déterminée par le matériel génétique (ADN) et toute altération de cet ADN (chromosomique ou plasmidique) engendre des modifications de ses capacités métaboliques (Bocquet, 1988).

Pour construire un micro-organisme recombinant, il faut choisir un hôte et un vecteur. Ce dernier est choisi en fonction du promoteur transcriptionnel (Seo et Bailey, 1985), de son nombre d'exemplaires et de sa stabilité dans la cellule. Un système hôte idéal doit correctement exprimer le gène cloné, réaliser les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles nécessaires, maintenir de façon stable le vecteur et la protéine étrangère, être peu exigeant en éléments nutritifs et enfin, se développer rapidement (Forsberg *et al.*, 1986). Théoriquement, tous les micro-organismes peuvent être utilisés comme cellules hôtes pour la production de protéines étrangères. En réalité, on n'en choisit que quelques-uns. Dans la littérature, seulement quatre systèmes sont très employés et leur choix est guidé par les besoins de l'expérimentateur et par les caractéristiques de la protéine ou la substance étrangère à produire; ce sont les bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et enfin les cellules de mammifères. De ces systèmes, l'entérobactérie gram-négative *E. coli* reste de loin la plus utilisée dans l'exploration de la génétique et de la physiologie des micro-organismes (Forsberg *et al.*, 1986; Jensen et Carlsen, 1990). Plusieurs auteurs ont cloné et fait exprimer, chez elle, un grand nombre de gènes viraux, eucaryotiques et procaryotiques (Allen *et al.*, 1992). Les arguments en faveur du choix d'*E. coli* sont l'abondance et la qualité des informations existantes, tant sur la biologie moléculaire que sur la physiologie, le fait qu'une variété de systèmes d'expression ait été mise au point et puisse être efficacement utilisée chez différentes souches de cette bactérie (Lunn *et al.*, 1986; Zabriniski et Arcuri, 1986) et surtout, concernant la sécurité, qu'aucun problème significatif ne soit lié, jusqu'à présent, à l'utilisation de ces différentes souches. En général, les difficultés rencontrées avec les micro-organismes recombinés, à

part les problèmes législatifs, sont diverses. Ce sont l'instabilité du vecteur (Park et Ryu, 1992), l'insolubilité et la toxicité dans la cellule hôte de la protéine étrangère, la dégradation rapide des protéines recombinantes par les protéases cellulaires et enfin, la qualité souvent imparfaite de la structure tertiaire des produits du gène étranger (Martson, 1986; Nicaud *et al.*, 1986; Kane et Hartley, 1988).

Une connaissance plus approfondie du comportement des micro-organismes recombinés permettra de mettre au point une ou plusieurs stratégies pour leur meilleure exploitation. Dans le travail que nous allons présenter, nous avons utilisé comme système hôte/vecteur la souche d'*E. coli* HB101 hébergeant le plasmide pBT4 portant un gène codant pour une pectate lyase (EC 4.2.2.2). Ce gène de 4,5 Kb, inséré dans le pBR325 dont le nom de pBT4 a été donné à l'ensemble de la construction, a été isolé au laboratoire de Microbiologie (Tierny, 1992) à partir de la bactérie anaérobie du côlon humain *Bacteroides thetaiotaomicron* 217. La pectate lyase est industriellement utilisée dans l'extraction, la clarification, la liquéfaction et la stabilisation des jus de fruits (Rombouts et Pilnik, 1978) et encore dans le rouissage des plantes textiles (Siessere *et al.*, 1992). Il s'agit d'une enzyme d'un grand intérêt industriel justifiant pour sa production, la mise en oeuvre de micro-organismes recombinés (Keen *et al.*, 1984; Laing et Pretorius, 1992).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. HISTORIQUE ET GENERALITES

L'idée de la construction d'organismes recombinés n'est pas le fruit du hasard. Elle s'est forgée scientifiquement à partir de 1865 avec les travaux de Mendel qui formule les lois de l'hérédité classique. D'après Lints (1981), plusieurs travaux sont venus confirmer et même approfondir les thèses mendéliennes; c'est le cas en 1883 de Roux et Weissman qui étudient le chromosome et affirment qu'il est porteur des tendances héréditaires; de Johanssen (1909) qui émet l'hypothèse que le gène constitue l'unité héréditaire et que le phénotype est lié au génotype; de Steon (1931) qui montre que la recombinaison génétique est accompagnée d'un échange physique; de Avery *et al.*, (1944) qui démontrent que l'ADN est porteur de l'information génétique; de Watson et Crick (1953) qui mettent en évidence la structure en double hélice de l'ADN; de Jacob et Monod (1960) qui découvrent les mécanismes de l'induction et de la répression. Plus tard, en 1973, Boyer et Cohen découvrent le rôle possible de vecteurs génétiques des plasmides bactériens. Enfin la construction du premier vecteur de clonage par Bolivar *et al.*, (1977) a donné un essor fulgurant au génie génétique et à la biologie moléculaire. Depuis, les recherches se sont accélérées pour aboutir aujourd'hui à une connaissance parfaite de la structure et de l'action des produits de nombreux gènes, au point d'envisager des recombinaisons en vue de produire des substances utiles sur les plans agricole, médical, pharmaceutique et industriel.

Ces dernières années, les progrès de la biologie moléculaire et du génie génétique ont considérablement influencé la littérature scientifique. Les investigations se poursuivent; elles s'étendent à de nouveaux micro-organismes. Les quelques retombées confortent les espoirs mais il reste beaucoup à faire. Les techniques du génie génétique utilisent souvent les plasmides comme vecteurs d'expression. Cependant, la présence de plasmides dans la cellule peut être considérée comme une sorte de parasitisme intracellulaire et en constituer un handicap pour la cellule (Anderson *et al.*, 1986). Une partie plus ou moins importante des ressources cellulaires est alors détournée pour la réplication des plasmides, la transcription et la synthèse des produits des gènes plasmidiques (Lee et

Bailey, 1984). Il s'établit une sorte de compétition dans l'utilisation des enzymes, des ribosomes, de l'énergie métabolique, des précurseurs de biosynthèse, des facteurs d'activation, de répression et d'initiation entre les plasmides et leurs ARN messagers et l'ADN chromosomique et ses produits de la transcription (Seo et Bailey, 1985). Cette situation va entraîner des modifications plus ou moins importantes du comportement de la cellule hôte.

2. ACTION DE LA PRESENCE DES PLASMIDES SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE HOTE.

La présence de plasmides peut se traduire par des effets variables. Lee et Bailey (1984), utilisant un modèle mathématique, ont simulé la diminution du taux de croissance d'*E. coli* en rapport avec l'augmentation du contenu plasmidique et l'accumulation intracellulaire de la protéine recombinante, telle qu'elle fut observée expérimentalement avec les plasmides pBR322 (Stuber et Bujard, 1982), NR1 (Morris *et al.*, 1974), R1 (Engberg et Nordström, 1975) et ColE1. Gu *et al.* (1989) confirmant ces résultats, ont montré que la sécrétion de l'antigène de surface de l'hépatite B par *S. cerevisiae* 20B12, n'entraînait pas une réduction du taux de croissance de la levure recombinante. Par contre les résultats de Park et Pack (1986) vont à l'encontre de ceux de Lee et Bailey (1984). Ils montrent qu'une forte expression de la cellulase de *B. subtilis* clonée chez *E. coli* HB101 n'entraînait pas une modification du taux de croissance de la cellule recombinée.

Masson et Bailey (1989) ont étudié entre autre, par dosage de la ribose-phosphate isomérase et de la Fructose 1,6 diphosphate aldolase respectivement marqueurs des voies de Dickens-Horecker et d'Embden-Meyerhof-Parnas ou glycolyse, l'influence des plasmides RSF1050, pDM246, pDM247 ou pDM248 sur la prédominance de la voie du métabolisme du glucose. Ils ont montré que la cellule d'*E. coli* DH5 α , hébergeant l'un de ces plasmides, métabolise le glucose principalement par la voie des pentoses alors que chez la souche sauvage, seulement 28% du glucose le sont par cette voie. La voie des pentoses se distingue de la glycolyse par le fait qu'il s'agit d'un processus essentiellement aérobie dont l'oxydation ne nécessite pas d'ATP.

L'intérêt de cette voie est multiple: elle fournit des pentoses phosphates qui sont indispensables à la synthèse des nucléotides que l'on trouve dans divers coenzymes et surtout dans les acides nucléiques; elle permet l'oxydation du glucose en CO_2 avec la formation de NADPH qui est utilisé dans le métabolisme lipidique. Le NADPH formé peut aussi constituer une source d'ATP si les électrons sont transportés jusqu'à l'oxygène par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire.

Chez la souche recombinée, des modifications de l'assimilation du substrat peuvent s'observer. C'est le cas de l' α -méthylglucoside, un substrat inhibiteur compétitif du glucose et métaboliquement inerte qui n'est utilisé ni comme source de carbone ni comme source d'énergie par la cellule pour sa croissance. Seo et Bailey (1985) ont montré que la souche *E. coli* HB101 recombinée est moins sensible à l' α -méthylglucoside lorsque l'un des plasmides (RSF1050, pFH118, pDM248, pDM247 ou pDM246) hébergé par la cellule possède un nombre de copies élevé. Ces auteurs expliquent ce phénomène par le fait que plus le nombre de copies du plasmide est élevé, plus cela entraîne un ralentissement des réactions du métabolisme intracellulaire d'*E. coli* HB101. Ce qui fait que la diminution du transport membranaire du glucose due à la présence de α -méthylglucoside n'affecte pas globalement le taux de croissance qui est déjà faible. Ces auteurs ont aussi étudié l'influence des plasmides pMD247, pMD246, RSF1050, pDM248 et pFH118, dont les nombres de copies sont respectivement de 12, 24, 60, 122 et 408, sur la croissance d'*E. coli* HB101. Ils ont remarqué que les cellules hébergeant ces plasmides connaissent respectivement une diminution de leur taux de croissance de 8%, 9%, 13%, 18% et 23% par rapport à la cellule sauvage.

Da Silva et Bailey (1986), dans une étude énergétique de simulation sur *E. coli*, ont calculé que la présence d'un plasmide hypothétique de la taille du pBR322 occasionnait une dépense de 68% d'ATP supplémentaire chez la cellule recombinée par rapport à son homologue sauvage.

3. L'INSTABILITE PLASMIDIQUE

Les plasmides sont des outils très utiles et très précieux pour améliorer le niveau de production d'une enzyme ou d'un métabolite spécifique chez les micro-organismes. L'introduction et l'expression de nouveaux gènes chez *E. coli*, ou chez d'autres hôtes, conduit cependant à l'examen des difficultés dans l'obtention du meilleur niveau d'expression des gènes clonés: stabilité génétique du vecteur de clonage, transcription du gène cloné, traduction des ARN messagers en protéines et aussi stabilité des protéines étrangères synthétisées (Simon *et al.*, 1983). C'est ainsi que Stephenson (1983) a souligné que la réussite de la commercialisation des micro-organismes recombinés était directement liée à la résolution des problèmes d'instabilité plasmidique qui constituent un facteur limitant dans l'utilisation des micro-organismes recombinés. L'instabilité génétique des plasmides, située au confluent du génie génétique et de la fermentation, a été largement étudiée par de nombreux auteurs lors des différents procédés de production utilisant les micro-organismes transformés. La stabilité plasmidique peut être définie comme étant la capacité des cellules recombinées à maintenir le plasmide au cours des divisions cellulaires et à en conserver les caractéristiques phénotypiques en l'absence de pression de sélection (Imanaka et Aiba, 1981). Cette stabilité plasmidique, facteur très important lors de l'extrapolation d'un procédé de fermentation, est un phénomène complexe. Elle fait intervenir aussi bien les aspects génétiques du vecteur (Noack *et al.*, 1981), de la cellule hôte (Lee *et al.*, 1989), que les caractéristiques physiologiques et les conduites de culture de la cellule hôte (Noack *et al.*, 1981; Sayadi *et al.*, 1989). On distingue deux principaux types d'instabilité: l'une est structurale, et l'autre, ségrégationnelle, est encore appelée instabilité de répartition.

L'instabilité structurale est définie comme un changement dans la structure du plasmide dû à une insertion, une délétion ou un réarrangement de l'ADN, occasionnant une perte des fonctions du gène désiré (Zabinski et Arcuri, 1986). Chez *Bacillus stearothermophilus* recombiné, Aiba *et al.* (1986) ont été confrontés à un problème d'instabilité structurale avec le plasmide

pAT9 portant le gène codant pour l' α -amylase. En effet, il se produit des délétions sur ce plasmide quel que soit le type de culture utilisé.

L'instabilité de répartition ou ségrégation est définie comme une perte complète du plasmide due à une mauvaise répartition de celui-ci dans les cellules filles au cours des divisions cellulaires. Cette instabilité est fréquente en l'absence de pression de sélection; elle aboutit souvent à la perte complète des plasmides avec l'apparition de cellules sauvages ayant un taux de croissance plus élevé que leurs homologues transformés. Plusieurs situations seraient responsables de l'instabilité ségrégationnelle.

* Une forte expression du gène cloné peut entraîner une instabilité des plasmides. Kaprlek et Jecmen (1992) travaillant sur la souche recombinée d'*E. coli* HB101 portant le cDNA de la prochymosine de veau ont montré que, lorsqu'ils arrivaient à bloquer l'expression du gène étranger dans certaines conditions de culture, les plasmides restaient stables sur 200 générations. Cependant, dans les conditions permettant l'expression du même gène, seulement 10% des cellules portent les plasmides après 100 générations. L'expression des gènes étrangers sur les plasmides peut être constitutive (Bernard et Helinski, 1980; McAleer *et al.*, 1984; Fieschko *et al.*, 1987) ou inductible (Goeddel *et al.*, 1979 et 1980). Dans tous les cas, chacune des situations présente des avantages et des inconvénients.

* Les caractéristiques du plasmide telles que le nombre de copies, la taille, les gènes présents sur le vecteur, sont aussi des facteurs qui influencent considérablement la stabilité du plasmide. A des températures supérieures à 30°C, Seo *et al.* (1987) ont montré que le plasmide pCK108, portant le gène codant pour la carboxyméthyl cellulase, présentait une instabilité (de l'ordre de 60%) en rapport avec l'augmentation de la concentration plasmidique cellulaire. En culture continue, Warnes et Stephenson (1986) ont montré que l'instabilité du plasmide pAT153 augmente proportionnellement avec la taille des fragments d'ADN (2, 8 ou 21 kb) du cytomégalovirus insérés. En ce qui concerne le type de gène présent sur le plasmide, Chiang et Bremer (1988) ont étudié l'influence du gène de résistance à la tétracycline sur la stabilité de dérivés du pBR322. Ils ont observé que, dans les mêmes conditions de culture,

la stabilité du pBR322 augmentait lorsque des délétions étaient effectuées dans ce gène.

* La vitesse de croissance, une des caractéristiques physiologiques de la cellule hôte peut entraîner une instabilité plasmidique plus grande. Lin-Chao et Bremer (1986) se sont penchés sur l'effet du taux de croissance d'*E. coli* B/ra en fonction de la concentration en pBR322. Ils ont montré que le taux de croissance cellulaire était inversement proportionnel au nombre de copies du plasmide. Un taux de croissance relativement faible ou constant avec une expression élevée du gène peut entraîner aussi une instabilité des plasmides dans certains cas. En effet, cette forte expression peut éventuellement perturber le métabolisme cellulaire. Les résultats obtenus par Sayadi *et al.* (1989) abondent dans ce sens. Ils ont constaté qu'en milieu minimum, lorsque le taux de croissance spécifique d'*E. coli* W 310 hébergeant le plasmide TP120 qui porte le gène codant pour la catéchol 2,3-dioxygénase est réduit, l'instabilité du plasmide était proportionnelle à l'augmentation du nombre de copies du plasmide et à l'augmentation de l'activité de l'enzyme recombinante.

* La nature du milieu de culture peut considérablement affecter la stabilité plasmidique. Shoham et Demain (1990) ont observé que le pCED3 codant pour le phénotype LacZ⁺, est plus stable chez *B. subtilis* BR151 lorsque la souche est cultivée en milieu minimum. Sur une population d'*E. coli* K12 hébergeant le plasmide TP120 portant les gènes codant pour les résistances à la tétracycline, à l'ampicilline, à la streptomycine et au sulfonamide, Godwin et Slater (1979) ont observé, qu'en condition limitante de glucose, les souches perdaient seulement leur résistance à la tétracycline, tandis qu'en condition limitante de phosphate, non seulement la résistance à la tétracycline est perdue mais plusieurs autres résistances le sont aussi. Smith *et al.* (1982) ont montré que chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, lorsque le lactose était remplacé par le glucose dans le milieu de culture, la stabilité des plasmides portant le gène codant pour l'enzyme de dégradation du lactose diminuait.

* Le type de culture peut affecter la stabilité des plasmides. Dwivedi *et al.* (1982) ont remarqué que l'instabilité plasmidique des souches recombinées d'*E. coli* était très élevée en culture continue. Iijima *et al.* (1986) ont montré que l'instabilité du plasmide pHI301 codant pour l' α -amylase de *B. stearothermophilus* est de 50% chez *E. coli* HB101 en fin de culture en fed-batch. Noack *et al.* (1981) ont étudié l'influence des conditions de culture en chémostat sur la stabilité des plasmides pBR325 et pBR322. Ils ont remarqué que le pBR325 présentait une grande instabilité en condition limitante de glucose et à faible taux de dilution, tandis que le pBR322 était plus stable dans toutes ces conditions.

* Un autre facteur qui semble affecter de façon considérable la stabilité plasmidique est le niveau d'oxygène dissous dans le milieu de culture. Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'action de la déplétion ou de l'absence d'oxygène en culture. Hopking *et al.* (1987) ont montré qu'une privation de la culture d'*E. coli* AB115 portant le plasmide thermosensible pKN401, codant pour les gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampicilline, en oxygène pendant une période allant de 30 à 96 minutes, provoquait une instabilité du plasmide alors que ce dernier est stable dans la cellule recombinée en présence d'oxygène. Caunt *et al.* (1989) ont étudié chez la souche recombinée de *S. cerevisiae* YN124 en culture continue, l'effet de l'appauvrissement du milieu de culture en oxygène sur la stabilité du plasmide pLG669-z codant pour la β -galactosidase. Ils ont remarqué que la stabilité du pLG669-z dans la levure était proportionnelle au niveau de l'oxygène dissous dans le milieu. Khosravi *et al.* (1990) ont observé que les besoins en oxygène des cellules transformées étaient proportionnels à la taille du plasmide porté. Ils ont montré qu'une souche d'*E. coli* portant le plasmide pBS5 (8,7 kb) a un besoin en oxygène 2,5 fois supérieur à la même souche portant le plasmide pUC18 (2,5 kb) qui, à son tour, a un besoin 7,5 fois supérieur à celui de la souche sauvage. Huang *et al.* (1990) ont montré qu'à de fortes agitations l'instabilité du plasmide pTG201, codant pour le catéchol 2-3 dioxygénase, est plus grande chez la souche d'*E. coli* B cultivée sur milieu minimum.

* La température, dans les procédés de fermentation utilisant les cellules en vue d'une production, est l'un des facteurs environnementaux les plus importants affectant non seulement le taux de croissance, mais aussi le nombre de copies et la stabilité des plasmides recombinants (Aiba et Koizumi, 1984; Son *et al.*, 1987). Seo *et al.* (1988) ont étudié l'influence de la température sur les souches recombinées MH300 et TK1046 d'*E. coli*. Entre 26°C et 30°C, le taux de croissance spécifique des deux souches augmentait, tandis qu'à des températures supérieures à 30°C, ce taux de croissance diminuait suite à une forte lyse cellulaire.

4. LES METHODES DE STABILISATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Face à ces nombreux facteurs pouvant engendrer des instabilités plasmidiques, plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer la stabilité des vecteurs de clonage. Trois grands types de méthodes peuvent être utilisés pour lutter contre les problèmes d'instabilité plasmidique.

4.1. Les méthodes génétiques

Ces méthodes sont nombreuses et sont basées sur une réorganisation structurale raisonnée des plasmides en vue d'une amélioration de leur stabilité au cours des divisions cellulaires. Elles utilisent des fonctions responsables de la répartition active des plasmides à faible nombre de copies (Kobayashi *et al.*, 1991). Meacock et Cohen (1980) ont montré qu'un fragment d'ADN, le locus *parB*, permettait de régulariser la répartition des plasmides entre les cellules filles. Boe *et al.* (1987) ont utilisé ce locus *parB* pour améliorer la stabilité d'un certain nombre de dérivés du pBR322. L'insertion du locus *par* dans les plasmides recombinants a été très souvent utilisée pour améliorer leur stabilité dans les procédés de fermentation (Molin *et al.*, 1987; Ogden *et al.*, 1992; Schwerder *et al.*, 1992). Toujours dans le même esprit, Boe *et al.* (1987) ont testé le locus *sop* ("stability of plasmid") provenant du plasmide F. Ces auteurs ont remarqué que ce locus avait une efficacité similaire à celle du locus *parB*

sur la stabilité des vecteurs de clonage dérivés du pBR332. D'autres loci ont été aussi utilisés dans la littérature pour réduire l'instabilité plasmidique. Il s'agit par exemple chez le plasmide F des loci *ccd* ("coupled cell division") et *flm* (leading region maintenance function). Chez le plasmide R1, deux gènes: *hok* ("host killing") et *sok* ("suppressor of killing"), portés par le locus *parB*, peuvent être utilisés pour stabiliser les plasmides (Schweder *et al.*, 1992).

Lorsque la souche recombinée présente une auxotrophie, on peut également introduire sur le plasmide la fonction pouvant corriger celle-ci. Dans ce cas, seules les cellules recombinées seront capables de se développer. Shako et Imanaka (1990) se sont inspirés de ce principe pour stabiliser le plasmide pSC101*trpI*15-14 hébergé par une souche mutante d'*E. coli*, auxotrophe pour le tryptophane et cultivée sur milieu minimum. Dans ces conditions la croissance de la bactérie dépend de la présence du vecteur qui sera alors maintenu de façon stable dans la cellule. Dans les cas où seule la biosynthèse de la substance déficiente est en jeu, cette méthode présente des limites car la substance peut être sécrétée ou se retrouver dans le milieu de culture suite à la lyse des cellules transformées et, permettre aux cellules dépourvues de plasmides de se développer. Si en plus de la biosynthèse, la cellule sans le plasmide présente une déficience pour l'incorporation de la substance, la technique dans ce cas s'avérerait très efficace comme l'ont montré Shako et Imanaka (1990).

4.2. Les méthodes sélectives

Ces méthodes utilisent des substances, soit produites par les cellules recombinées soit ajoutées dans le milieu de culture, pour empêcher la croissance des cellules qui seraient débarrassées de leurs plasmides.

* La sélection intracellulaire a été une stratégie utilisée par Rosteck et Hershberger (1983) pour améliorer la stabilité du plasmide pPR12 chez la souche lysogénique d'*E. coli* K12. Ils ont développé un système dans lequel la survie de la cellule dépendait de la présence du pPR12 qui porte, en plus du gène codant pour l'insuline humaine, le gène codant pour le répresseur du

phage λ . Toute perte du plasmide, donc du répresseur, va déclencher l'induction du cycle lytique du phage λ et causer la mort de la cellule.

* La sélection par antibiotiques est une méthode très utilisée en laboratoire et qui permet d'inhiber la croissance des cellules sauvages et de favoriser par la présence d'une ou de plusieurs pressions de sélection, uniquement la croissance des cellules recombinées. Plusieurs auteurs ont appliqué cette stratégie pour améliorer la stabilité de leurs plasmides dans les cellules recombinées. C'est le cas de Collmer *et al.* (1985) qui ont supplémenté d'ampicilline le milieu de culture de la souche d'*E. coli* HB101 hébergeant le pBR322 portant le gène codant pour des isomères de la pectate lyase d'*Erwinia chrysanthemi* CUCPB 1237. Cette méthode présente cependant des inconvénients, lors de son utilisation à grande échelle en industrie, pour plusieurs raisons: d'une part, les antibiotiques sont des produits coûteux et ne permettent pas de prévenir les cas d'instabilités structurales. En plus, ceci conduit à une contamination du produit final sécrété, ce qui rendrait leur purification plus difficile. De surcroît certains antibiotiques, tels que l'ampicilline, sont dégradés par les β -lactamases microbiennes. Ce qui par conséquent, nécessite leur addition continue pendant toute la durée de la fermentation afin de maintenir leur effet de pression de sélection.

4.3. Les méthodes non sélectives

Il est possible de dissocier la phase de croissance cellulaire de celle de production, par le contrôle du niveau d'expression du gène recombinant, en utilisant un commutateur génétique. Siegel et Ryu (1985) ont appliqué le principe de cette stratégie pour minimiser l'instabilité du plasmide pPLc23-*trpAl* dans la souche d'*E. coli* M72. L'insertion, sur le plasmide, du promoteur thermo-inducteur pL du phage λ leur a permis de réprimer l'expression du gène recombinant codant pour la tryptophane-synthétase Al pendant la phase de croissance, puis de le dérprimer par une simple commutation de température pour permettre une forte production de l'enzyme par la cellule recombinante.

* L'immobilisation des cellules recombinées est aussi utilisée comme une approche expérimentale pour améliorer la stabilité des plasmides. Sayadi *et al.* (1989) ont réussi, en culture continue, à augmenter la stabilité du plasmide pTG201 portant le gène codant pour le catéchol 2,3-dioxygénase par immobilisation sur une matrice de carraghenane à 2% (p/v) d'*E. coli* W3101 dans les conditions limitantes de glucose, d'azote et de magnésium, alors que le même plasmide présente une instabilité plus élevée dans les mêmes conditions lorsque les cellules sont libres. Dinçbas *et al.* (1993), en immobilisant sur gel d'alginate, *E. coli* HB101 hébergeant le plasmide recombinant YEp352 qui code respectivement pour la β -galactosidase et la trans-acétylase, sont arrivés à améliorer la stabilité de ce plasmide durant environ 40 heures de culture.

L'instabilité des plasmides, facteur limitant considérablement les performances des procédés biologiques utilisant des micro-organismes recombinants, est un phénomène très complexe faisant intervenir aussi bien les caractéristiques des plasmides et des cellules hôtes que, les conditions de fermentation. Les diverses approches qui ont été proposées pour tenter de résoudre les problèmes sont la preuve qu'aucune ne semble satisfaire pleinement. Après la présentation des différentes causes d'instabilité plasmidique chez les micro-organismes recombinés et les solutions pouvant être apportées pour corriger cette instabilité, intéressons nous aux conditions de culture pouvant influencer une production en fermenteur.

5. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE EN FERMENTEUR

L'objectif des fermentations utilisant des micro-organismes recombinés pour la production d'enzymes est le même que celui des autres fermentations à savoir l'obtention d'un haut rendement avec des substrats bon marché (Zabinski et Arcuri, 1986). Dans ce type de fermentation, en marge des problèmes d'instabilité du plasmide dans la cellule recombinée, d'autres paramètres de fermentation tels que la composition du milieu de culture et l'aération ont une influence importante sur le rendement de la production.

L'étude des meilleures conditions de production passe par l'optimisation de ces paramètres.

5.1. Le milieu de culture.

De nombreux auteurs ont montré que la production des enzymes microbiennes est influencée par les éléments nutritifs du milieu de culture (Pazlarova, *et al.*, 1984; Donnelly et Crawford, 1988). Kirk *et al.* (1989) ont montré que la supplémentation du milieu minimum en alcool vératrylique et en traces d'éléments minéraux conduisait à une augmentation de 4,7 fois de la ligninase chez *Phanerochaete chrysosporium* SC26 comparativement à la culture témoin. Jayaraman *et al.* (1992) ont montré que, chez *Nocardia asteroides* ATCC27938, l'induction de la production de la peroxydase et de l' α -amylase était sous le contrôle du niveau carbone/azote du milieu de culture. Lorsque ce rapport est très élevé, la production de l' α -amylase est favorisée alors qu'un rapport faible induit la production de peroxydase. Ainsi le milieu de culture est un facteur environnemental très important en fermentation. Différentes méthodes, dont les méthodes factorielles et les méthodes d'isoréponses, ont été utilisées pour optimiser la composition des milieux de culture. Par exemple, Galvez-Marisca et Lopez-Munguia (1991), Kisaalita *et al.* (1993) ont utilisé des méthodes factorielles pour optimiser la composition d'un milieu de culture pour la production respective de dextranase chez *Paecilomyces lilacinus* 6R et de pyoverdine chez *Pseudomonas fluorescens* 2-79. La méthode d'isoréponse a été utilisée par Maddox et Richert (1977) pour optimiser la composition d'un milieu de production de l'acide gibbéréllique par le champignon *Fusarium moniliforme* ACC 917.

5.2. L'oxygénation du milieu de culture

L'oxygène joue un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie producteur d'énergie, comme accepteur final des électrons et des protons produits par les réactions d'oxydation. L'oxygène intervient dans certains mécanismes de régulation du métabolisme de façon directe, comme inducteur

ou répresseur de la synthèse d'enzymes respiratoires, mais aussi de façon indirecte du fait de son rôle dans le métabolisme énergétique. Dans les procédés d'optimisation des conditions de culture, l'un des paramètres à considérer en priorité est l'oxygénation du milieu de culture car la solubilité de l'oxygène dans les liquides est très faible (Kalina, 1993). La concentration en oxygène dissous est un facteur essentiel agissant à la fois sur la croissance et la productivité des micro-organismes aérobies. Certains auteurs utilisent de l'air pour réaliser l'approvisionnement en oxygène des cellules recombinées en culture. Jung *et al.* (1998) ont utilisé un débit d'air de 1 l/min pour produire en fermenteur l'interleukine-1 β humaine chez *E. coli* C600K. Par contre Yee et Blanch (1993) pour produire la trypsine chez la souche recombinée d'*E. coli* X90 ont utilisé de l'oxygène pur à un débit variant entre 1,5 et 3 vvm afin de maintenir l'oxygène dissous à un niveau de saturation supérieur à 20% durant la fermentation.

Le transfert de l'oxygène dans une culture microbienne dépend essentiellement du débit d'air d'alimentation et de la vitesse d'agitation. Ces deux paramètres fixés, il en résulte une variation de la concentration en oxygène dissous en fonction de la demande biologique en cet élément. Cette variation entraînera à son tour des modifications métaboliques importantes (Corrieu, 1975). Chez certains micro-organismes, l'augmentation de l'agitation dans les fermenteurs entraîne des changements de morphologie, des agrégations ou une inhibition de la croissance (Ujcová *et al.*, 1980; Kalina, 1993). Généralement, les vitesses d'agitation de l'ordre de 200 à 1000 t/min pour la culture de cellules recombinées d'*E. coli* sont utilisées. C'est ainsi que Brownlie et Cole (1990), pour étudier le taux de croissance de la souche recombinée d'*E. coli* HB101(pAT153) en fermenteur, ont utilisé une agitation de 1000 t/min. Par contre Robbins et Taylor (1989) ont utilisé une agitation de 500 t/min pour optimiser la croissance en culture fed-batch d'une souche recombinante d'*E. coli* HB101(pRW756).

5.3. La température de culture

La température exerce une influence considérable sur l'ensemble de l'activité cellulaire. Son choix est déterminant dans l'amélioration des

performances du bioréacteur. Chez les cellules recombinées d'*E. coli*, les températures utilisées lors de la croissance en fermenteur varient entre 28°C et 37°C. Tolentino et San (1988) ont cultivé à une température de 32°C la souche recombinée d'*E. coli* C600(pKN401). George *et al.* (1992) ont cultivé à 37°C la souche recombinée d'*E. coli* JM109 portant le plasmide pTAC-TGF57-PE40 qui code pour l'exotoxine A (TGF α) de *Pseudomonas aeruginosa*. Xu *et al.* (1990) ont cultivé à la température de 30°C la souche recombinée d'*E. coli* POP13 hébergeant le plasmide pDI21 codant pour une protéinase de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2. Kim et Ryu (1991) ont utilisé, en culture continue, une souche recombinée thermosensible d'*E. coli* M72(pLc-RP4.5) qui porte le gène codant pour l'ARN 4,5 S. Dans un premier temps, ces auteurs ont utilisé 28°C comme température de croissance puis, ils ont effectué une commutation de température à 40°C pour la phase de production de la protéine recombinante.

5.4. Le pH de culture

L'effet du pH sur la physiologie cellulaire est également très important. Il influence fortement les activités cellulaires et les processus de transport. Ryan *et al.* (1989) ont montré que, dans la souche recombinée d'*E. coli* JM103 portant le plasmide pDB2 qui dérive du pUC18 et qui porte en plus du gène codant pour la β -lactamase, un fragment d'ADN de *Drosophila melanogaster* de 2,6 kb, la production optimale de la β -lactamase se situait dans les zones de pH allant de 7,3 à 7,4. Ces mêmes auteurs ont aussi montré que le pH optimum de production maximale de la β -lactamase variait en fonction de la taille du plasmide recombinant. Il est intéressant de noter que de nombreux auteurs ont maintenu constant autour de 7 le pH des milieux de culture durant la croissance des souches recombinées d'*E. coli*. C'est le cas d'Iijima *et al.* (1986) qui ont fixé le pH de leur milieu de culture pour produire l' α -amylase de *Bacillus stearothermophilus* chez plusieurs souches recombinées d'*E. coli* HB101. Yee et Blanch (1993) pour produire la trypsine chez la souche recombinée d'*E. coli* X90 ont fixé le pH de leur milieu de culture à 6,9.

5.5. Le type de culture utilisé

Trois types de cultures peuvent être utilisés dans la production des protéines recombinantes en fermenteur. Il s'agit des cultures discontinues encore appelées "culture en batch", il y a aussi les cultures semi-continues appelées "culture en fed-batch" et enfin les cultures continues. Le choix de l'un ou l'autre de ces types de cultures dépend principalement des objectifs de l'expérimentateur. Kim et Ryu (1991) ont réalisé une culture continue pour étudier la production du gène codant pour l'ARN 4,5 S cloné chez *E. coli* M72. Nancib et Boudrant (1991) ont utilisé le type de culture en batch pour étudier le rôle de la peptone et de l'extrait de levure sur le niveau de production de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase chez la souche recombinée d'*E. coli* C600 gal K, ATCC 23724. Par ailleurs, Iijima *et al.* (1986) ont utilisé le type de culture "fed-batch" pour étudier l'influence de l'addition d'un certain nombre de nutriments sur la production de l' α -amylase de *Bacillus stearothermophilus* clonée chez *E. coli* HB101(pHI301).

6. LES PECTINASES

6.1. Généralités

Les substances pectiques sont des macromolécules glucidiques présentes largement et exclusivement dans le règne végétal. Elles participent à l'organisation structurale des parois comme composantes majeures de la lamelle moyenne, comme ciment intercellulaire (Seyrig *et al.*, 1983) et comme échangeurs d'ions (Rubinstein *et al.*, 1992). Associées notamment à la cellulose, elles forment un complexe ordonné, dont la rigidité intervient dans la fermeté des tissus végétaux. Les substances pectiques sont extraites et utilisées comme additif en industries alimentaires (Kravtchenko *et al.*, 1992). Elles constituent par ailleurs, les substrats spécifiques des pectinases impliquées dans l'apparition de nombreuses maladies végétales et, particulièrement celles qui se caractérisent par une pourriture molle chez les végétaux (Favey , 1991).

Les pectinases sont une famille d'enzymes produites à la fois par les plantes supérieures au cours du mûrissement et de la sénescence des fruits (Konno et Tsumuki, 1991; Pressey, 1991; Leuchtenberg et Mayer, 1992) et par une grande variété de micro-organismes entériques (Gradel et Dehority, 1972; Chatterjee *et al.*, 1979), phytopathogènes et saprophytiques (Polizeti *et al.*, 1991).

La paroi des végétaux constitue une barrière inévitable et incontournable pour les phytopathogènes (Frittrang *et al.*, 1992) qui, pour réussir l'invasion des tissus à la recherche de nutriments, sécrètent des variétés d'enzymes telles que des protéases, cellulases et des pectinases qui dégraderont les principaux constituants des parois végétales (Temsah *et al.*, 1991; Nasser *et al.*, 1992). L'adhésion entre les cellules adjacentes des tissus végétaux est perdue lorsque ces derniers sont infectés par les micro-organismes phytopathogènes. Les pectinases sont étroitement associées à ce phénomène qu'on appelle communément la macération (Peretto *et al.*, 1982). L'intérêt pour les pectinases, à part leur rôle dans la pathogénicité, réside dans leur considérable valeur commerciale en industrie alimentaire et leurs applications en biotechnologie végétale (Polizeti *et al.*, 1991; Spök *et al.*, 1991). Les enzymes pectinolytiques peuvent être classées en deux principaux groupes: les enzymes dé-estérifiantes éliminant les résidus méthoxylés des pectines et une variété d'enzymes dépolymérisantes (Heikinheimo *et al.*, 1991; Spök *et al.* 1991), qui peuvent être subdivisées en deux groupes suivant le mécanisme par lequel elles coupent les liaisons α -1,4-glycosidiques des substances pectiques: par hydrolyse (polygalacturonases) ou par β -élimination (lyases). Du fait de la complexité structurale des substances pectiques, les pectinases agissent soit de façon concertée soit en respectant une succession temporelle. Par exemple, les pectine lyases et les pectine méthylestérases agissent en premier sur les chaînes pectiques. Il faut noter que les pectine lyases pourraient agir seules sans l'intervention préalable des pectine méthylestérases. En effet les pectine lyases sont capables de dégrader les pectines hautement méthylées (Collmer et Keen, 1986). Les produits de l'action combinée de ces deux enzymes vont constituer le substrat des pectate lyases et des polygalacturonases (Perreto *et*

al., 1992). De ces dégradations, résulte un mélange d'oligomères insaturés et saturés de différentes tailles. Les dimères et le galacturonate sont transportés à l'intérieur de la cellule et métabolisés pour rejoindre la voie de dégradation des hexuronates (Favey, 1991).

6.2. La pectate lyase

Une des activités pectinolytiques la mieux caractérisée est la pectate lyase ou poly-1,4 α -D-galacturonide lyase (EC 4.2.2.2). Il s'agit d'une enzyme de dépolymérisation agissant par β -élimination et qui a été mise en évidence la première fois par Albersheim *et al.* (1960) sur une préparation commerciale de pectinases de champignons. Depuis, de nombreuses informations sur les pectinases de bactéries, levures, champignons, moisissures (Ravelomanana *et al.*, 1968; Bailey et Pessa 1990; Martinez *et al.*, 1991) et de protozoaires (Wojciechowicz, 1971) ont été accumulées. Karbassi et Luh (1979) ont montré qu'il existait deux types de pectate lyases:

- Les endo-pectate lyases (EC 4.2.2.2) agissant par coupure au hasard à l'intérieur de l'acide polygalacturonique.

- Les exo-pectate lyases ou polygalacturonate-lyases (EC 4.2.2.9) qui ont la propriété de rompre la dernière liaison glycosidique α -1,4 de l'acide galacturonique, le processus se poursuivant jusqu'à dégradation complète de la chaîne.

Les pectate lyases sont des enzymes exclusivement microbiennes. Elles catalysent le clivage des liaisons glycosidiques α -1,4 par β -élimination, encore appelée trans-élimination, pour générer des produits insaturés, le plus souvent des dimères. La coupure de la liaison glycosidique s'effectue entre le carbone 4 et l'oxygène placé en β reliant les molécules d'acide galacturonique. Cette réaction s'accompagne de l'élimination simultanée de l'atome d'oxygène en β et de l'atome d'hydrogène situé au niveau du carbone 5, avec formation d'une double liaison entre les carbones 4 et 5. La conjugaison de la double liaison avec le carbone 6 entraîne une absorption maximale dans l'ultra-violet à 235 nm. La mesure de l'activité repose sur la mesure de cette absorption.

Chez le genre *Bacillus*, des pectinases sont également produites. Miyazaki *et al.* (1991) ont purifié et caractérisé une endo-pectate lyase de *Bacillus macerans*. Jauneau *et al.* (1986) ont fait produire la pectate lyase à une souche de *Bacillus subtilis* dans un fermenteur à membrane. Parmi les nombreuses pectate lyases, celles de *E. chrysanthemi* et *E. carotovora* ont été amplement étudiées en ce qui concerne la régulation de leur production, leur rôle dans la pathogénicité et leurs propriétés enzymatiques (Nishida *et al.*, 1990). Ces études ont fait de ces deux bactéries, les modèles de référence dans l'étude des mécanismes de la phytopathogénicité (Collmer et Keen, 1986). *E. carotovora* produit deux à cinq isoenzymes de la pectate lyase que l'on peut distinguer par leur point isoélectrique; deux de ces isoenzymes sont alcalines (PLd et PLe), deux autres sont neutres (PLb et PLc) et enfin la cinquième (PLa) est acide (Ried et Collmer, 1987). Les gènes codant pour ces isoenzymes constituent des unités de transcription indépendantes (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1993). Leur mise en évidence n'a été rendue possible qu'après clonage de leur gène respectif chez *Escherichia coli* (Barras *et al.*, 1987). Favey (1991) a montré que chez *Erwinia chrysanthemi*, les pectate lyases produites ne s'expriment pas toutes de façon équivalente. Alors que la PLe, responsable de la phytopathogénicité, contribue à 60% dans l'activité pectate lyase totale dans les tissus de plantes, seulement 3% de cette activité sont attribués à la PLa.

Chez le genre *Erwinia*, la production des pectinases est induite par les substances pectiques et leurs métabolites et soumise à une répression catabolique (Liao, 1991). Chez *E. chrysanthemi*, l'analyse de mutants dont la pectinolyse est bloquée à différentes étapes a montré que l'inducteur intracellulaire réel est le 2-kéto-3-déoxygluconate (KDG) ou ses dérivés. Les dérivés des substances pectiques ont un effet inducteur lorsque le répresseur KdgR est présent. Mais la présence du KDG inhibe la fixation du répresseur KdgR sur son opérateur (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992). Certains auteurs ont montré qu'en plus du gène *kdgR*, d'autres loci tels que *pecl*, *pecS*, *pecY*, *pecZ* et *pecX* sont impliqués dans la régulation de la synthèse des pectate lyases (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 1992). Le nombre d'isoenzymes de pectate lyase varie d'une souche à l'autre. C'est ainsi que Liao (1989) a montré que sur les huit souches de *Pseudomonas* étudiées, aucune ne

possède plus deux isoenzymes de pectate lyase. Chez le genre *Bacteroides*, plusieurs pectinases ont été mises en évidence. Jensen *et al.* (1986) ont détecté chez deux *Bacteroides* du côlon, à savoir *B. galacturonicus* et *B. pectinolyticus*, des activités pectine méthylestérase et polygalacturonase lyase. McCarthy *et al.* (1985 et 1986) ont mis en évidence chez plusieurs espèces de *Bacteroides* du tube digestif de l'homme dont, entre autres *B. thetaiotaomicron*, la production de pectinases, essentiellement des polygalacturonases et des pectate lyases.

7. OBJECTIFS DES TRAVAUX PRESENTES

L'objectif de cette thèse est de produire en fermenteur une pectate lyase EC 4.2.2.2 de *B. thetaiotaomicron* 217 clonée chez *E. coli* HB101 par Tierny (1992). D'après les études réalisées au laboratoire, cette pectate lyase recombinante exprimée chez *E. coli* HB101 possède des propriétés biochimiques quelque peu différentes de l'enzyme native produite par *B. thetaiotaomicron* 217. En plus du niveau d'activité spécifique apparente qui est environ 30 fois plus élevé chez *E. coli* HB101 que chez *B. thetaiotaomicron* 217, le pH optimal d'action de l'enzyme recombinante s'observe à 9.4 alors qu'il est de 8.4 chez la souche originelle. Par ailleurs, la pectate lyase synthétisée aussi bien par *E. coli* que par *B. thetaiotaomicron* présente la même température optimale avec une thermostabilité à 50°C pour l'enzyme recombinante. Enfin, les ions magnésium ont un effet activateur très important sur la pectate lyase recombinante alors que c'est plutôt le calcium qui exercerait le même effet sur la pectate lyase produite par *B. thetaiotaomicron*. Nous nous sommes intéressés à la production de la pectate lyase recombinante par les cultures d'*E. coli* HB101(pBT4). Après l'optimisation de la composition du milieu minimum de culture, nous avons étudié les meilleures conditions de stabilité du pBT4 chez *E. coli* HB101, puis nous avons déterminé les meilleures conditions d'aération du fermenteur en vue d'optimiser la production de pectate lyase. Nous avons ensuite examiné les modifications de du contenu plasmidique et des constituants du milieu de culture survenant au cours de la fermentation. Ayant remarqué une production notable d'acétate, acide potentiellement inhibiteur de la croissance cellulaire et de la production

des enzymes recombinantes, nous avons tenté de limiter sa production dans le but d'améliorer la production de pectate lyase.

MATERIELS ET METHODES

1- SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

L'étude a porté sur une souche recombinante d'*Escherichia coli* HB101(pBT4) issue des travaux de Tierny *et al.* (1994). Son génotype est le suivant : F⁻, *hsds* 20, *ara-14*, *lacY* 1, *galk* 12, *xyl-5*, *proA2*, *leuB6*, *thi-1*, *supE* 44, *endo I*, *recA* 13, *rpsL* 20 (Sm^r), λ^- . Cette souche porte le plasmide pBT4 de 10,5 kb (figure 1) résultats du clonage de l'insert de 4,5 kb, portant un gène de *Bacteroides thetaiotaomicron* 217 codant pour une endo-pectate lyase EC 4.2.2.2, dans le plasmide pBR325 au niveau de l'unique site de restriction *EcoRI* localisé dans le gène de résistance au chloramphénicol. Le pBR325 est un plasmide hybride d'environ 6 kb dérivé du pBR322 et portant les gènes de résistance à l'ampicilline, la tétracycline et au chloramphénicol.

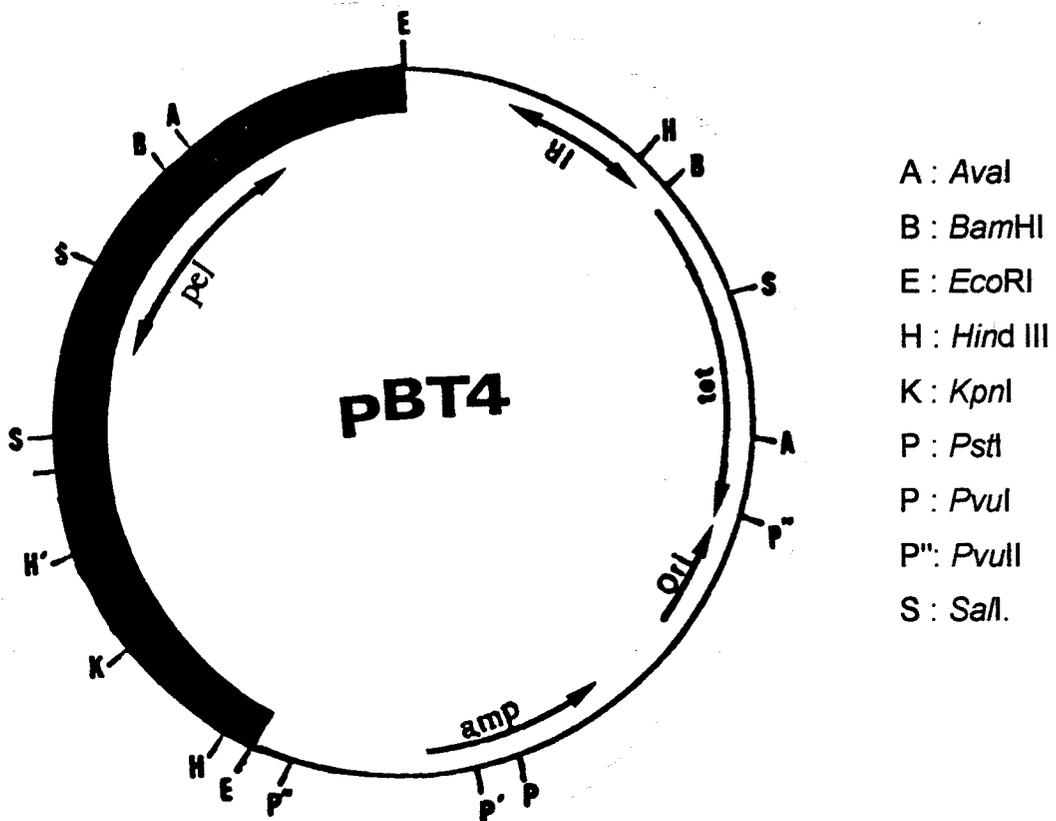


Figure 1. Carte de restriction du pBT4 constitué du pBR325 + un insert de 4,5 kb qui porte un gène codant pour la pectate lyase EC 4.2.2.2 de *B. thetaiotaomicron*. IR : séquence inversée répétée; Tc et Amp: gènes codant respectivement pour les résistances à la tétracycline et à l'ampicilline; Ori: origine de réplication; *pel*: position sur l'insert du gène de la pectate lyase d'après Tierny, 1992.

2 - LES MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE.

2.1. Les milieux

2.1.1 - Le milieu Luria-Bertani (LB)

Il s'agit d'un milieu riche dont la composition est la suivante, pour un litre de culture, Tryptone:10 g; Extrait de levure: 5 g; NaCl, 5 g. Après dissolution de ces composés, le pH est ajusté à 7,2 par addition de soude 1N. Le milieu ainsi obtenu peut être préparé gélosé en y incorporant de l'agar à raison de 15 grammes par litre. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

2.1. 2 - Le milieu minéral M9

Il s'agit d'un milieu minéral dont la composition est la suivante pour un litre de culture, Na₂HPO₄, 2H₂O 7,3 g; KH₂PO₄, 30 g; NaCl 5 g; NH₄Cl 10 g. Il est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Ce milieu est supplémenté suivant les expériences avec les solutions mères suivantes:

* Glucose	200 g/litre
* Extrait de caséine dépourvu de vitamines	200 g/litre
* NH ₄ Cl	100 g/litre
* MgSO ₄ ; 7H ₂ O	1 M
* Thiamine	400 mg/litre
* Extrait de levure	10 g/l
* CaCl ₂ ; 2H ₂ O	100 mM
* Tétracycline chlorydrate	1 mg/ml
* Ampicilline sodique	10 mg/ml
* 3-bromopyruvate	0,1 M

Toutes ces solutions mères sont stérilisées par filtration sur des membranes de 0,2 µm de porosité.

2.2. Les techniques de culture

Les expériences d'optimisation de la composition du milieu de culture et de l'étude la stabilité du pBT4 ont toutes été effectuées en erlenmeyer dans un volume final de 50 ml, et incubées à 30°C sur une table giratoire dont la vitesse d'agitation est fixée à 100 tours par minutes. Pour la réalisation d'une partie de notre travail, nous avons utilisé une unité de fermentation SET 2M, d'une capacité totale de 2 litres (SETRIC GENIE INDUSTRIEL, Toulouse) équipée du contrôle et de la régulation de l'agitation, de la température, du pH et de l'oxygène dissous.

3- LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

3.1 - Evaluation de la biomasse

La biomasse produite a été estimée en mesurant la turbidité de la culture bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON 940 (KONTRON INSTRUMENTS). La corrélation entre la densité optique et le poids sec cellulaire est réalisée à partir d'une gamme étalon établie comme suit: à partir d'une culture, plusieurs parties aliquotes, suffisamment diluées de sorte à avoir des densités optiques comprises entre 0,2 et 0,7, sont prélevées et centrifugées pendant 10 minutes à 12000 g. Les culots correspondant à 10 ml de chacune de ces parties aliquotes sont lavés deux fois avec de l'eau désionisée et mis dans des tubes Eppendorf préalablement tarés. Après élimination des surnageants de lavage, les tubes Eppendorf contenant les culots sont séchés 18 heures à 105°C avant pesée. Pour chaque densité optique, trois pesées ont été effectuées.

3.2 - Quantification du magnésium dans le milieu de culture

Pour évaluer la concentration du magnésium dans le milieu de culture au cours de la fermentation, nous avons utilisé la méthode spectrométrique d'absorption atomique. Cette méthode physique d'analyse utilise la propriété qu'ont les atomes neutres d'absorber à une certaine longueur d'onde un

quantum d'énergie. Lorsqu'une flamme acétylène/air est utilisée, la mesure de l'absorption est réalisée à 285,2 nm après addition de chlorure de lanthane pour réduire les perturbations dues à la silice, au phosphore, à l'aluminium et au fer.

* Les réactifs

- Solution d'acide chlorhydrique 8 ml d'HCl (d =1,19) complétés à 1 litre avec de l'eau ultra pure (filtrée sur une membrane Millipore de 18 ΩM de résistivité) .

- Solution de chlorure de lanthane: 1,25 g/l

- Solutions étalons de magnésium: A partir d'une solution commerciale étalon de magnésium(1g/l), on réalise des dilutions avec la solution d'acide chlorhydrique de sorte à avoir des concentrations situées entre 0,1 et 0,5 mg/litre.

- Préparation des échantillons

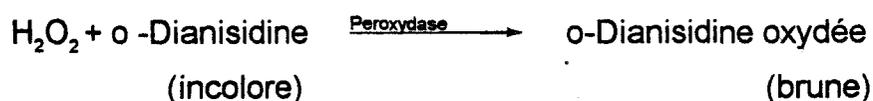
L'échantillon est suffisamment dilué afin d'amener les concentrations dans les limites de la gamme étalon. Un volume déterminé d'échantillon à doser est ajouté à 1ml de solution de lanthane. Le volume est ensuite ajusté à 10 ml avec la solution d'HCl.

3.3- Le dosage du glucose

Le kit glucose oxydase (Sigma diagnostics) a été utilisé pour évaluer le glucose restant dans le milieu de culture au cours de la fermentation.

* Le principe du dosage.

La méthode de dosage utilisant le kit glucose repose sur deux réactions enzymatiques couplées: l'une faisant intervenir la glucose oxydase et l'autre la peroxydase



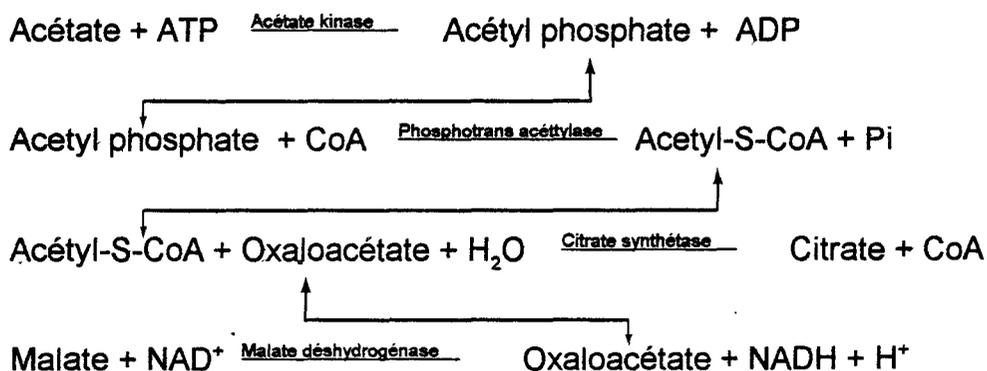
L'intensité de la coloration brune de l'o-Dianisidine oxydée mesurée à 460 nm est proportionnelle à la concentration initiale du glucose.

3.4- Le dosage de l'acétate

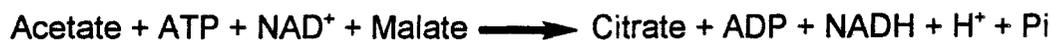
Le kit acide acétique (N° 148261) fabriqué par "Boehringer Mannheim" a été utilisé pour déterminer la quantité d'acétate produite au cours de la fermentation.

* Le principe du dosage

Le principe de la méthode de dosage utilisant le kit acétate repose sur la quantification du NADH formé à partir de la conversion de l'acétate grâce à une succession de réactions catalysées par différentes enzymes. Le NADH formé absorbe dans l'U.V à 340nm.



Balance:



3.5- Le dosage de l'ammonium

* Le principe

En présence du réactif de Nessler, l'ammonium réagit avec les ions HgI_4^{2+} pour conduire à la formation d'un composé orange qui absorbe à 420 nm. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de l'ammonium initial.

* Dosage

La gamme étalon comprise entre 0 et 10 $\mu\text{g/ml}$ est réalisée à partir d'une solution de NH_4Cl . La solution à doser est suffisamment diluée et de sorte à se situer dans les limites de la gamme étalon. On prélève 3 ml auxquels 0,3 ml du réactif commercial de Nessler est ajouté. Après agitation, la densité optique est mesurée à 420 nm après 5 minutes de réaction.

4- TECHNIQUES ENZYMATIQUES

4.1. Quantification de la β -lactamase

L'activité de la β -lactamase (EC 3.5.2.6) a été déterminée par la méthode de Sargent (1968) modifiée par Naglak et Wang (1992):

* Les réactifs

- Tampon phosphate 50 mM pH 7,0.
 - Ampicilline (4 mg/ml dans du tampon phosphate)
 - Tampon acétate (40 g/l d'acétate de sodium dans de d'eau distillée qu'il faudra ajuster à pH 4 avec de l'acide acétique)
 - Solution d'iode (20,3 g de I_2 et 100 g de KI dans 500 ml d'eau distillée).
- Diluer la solution d'iode 20 fois dans le tampon acétate juste avant son utilisation.

* Dosage de la β -lactamase

L'échantillon à doser (0,1 ml) est mélangé à 0,4 ml de tampon phosphate à la température ambiante. La réaction est initiée en ajoutant 0,1 ml d'ampicilline. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 1 ml du réactif d'iode dilué au vingtième, puis la D.O est mesurée à 540 nm. L'activité enzymatique est exprimée par une unité arbitraire proposée par Naglak et Wang (1992):

$$\text{Nombre d'unités /ml de culture} = \frac{A_{540} (\text{Blanc}) - A_{540} (\text{échantillon})}{\text{Temps d'incubation (min)}}$$

4. 2. Quantification de la β -galactosidase

La β -galactosidase (EC 3.2.1.23) d'*Escherichia coli* est une enzyme typiquement cytoplasmique. Elle est dosée en utilisant un substrat artificiel et hydrolysable: le 2-ortho-nitrophényl- β -D-galactosidase (ONPG). L'enzyme reconnaît et hydrolyse la liaison β -1,4 galactosidique. La libération de l'o-nitrophénol se traduit par une coloration jaune.

* Les réactifs

- La solution tampon par litre: Na_2HPO_4 16,1 g; NaH_2PO_4 ; H_2O 5,5 g; KCl 0,75 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g; SDS 1 g; β -mercapto-éthanol 2,7 ml

-Solution d'O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG): Dissoudre 40 mg dans 100 ml du tampon ci-dessus:

* Dosage de la β -galactosidase

-Tampon β -galactosidase.....	3 ml
-SDS1%	1 ml
-Echantillon.....	1 ml
-Réactif (ONPG).....	0,6 ml

Pour stopper la réaction on ajoute 2 ml de Na_2CO_3 1M

La D.O est mesurée à 420 nm contre le témoin dans lequel l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. L'activité enzymatique est exprimée comme suit :

$$\text{Nombre d'unités/ml de culture} = \frac{D.O_{420 \text{ nm}} \times 1000}{\text{Temps d'incubation (min)}}$$

4.3. Détection des colonies d'*Escherichia coli* HB101(pBT4) productrices de la pectate lyase EC 4.2.2.2

La même colonie bactérienne est répliquée sur deux boîtes contenant du milieu LB gélosé additionné de 0,5% d'acide polygalacturonique (PGA). L'emplacement des colonies est repéré sur les deux boîtes. On repique ainsi plusieurs colonies. Après environ 3 jours d'incubation à 37°C, une des deux boîtes est immergée avec une solution de bromure de cétyle triméthylammonium (CTAB) pendant au moins 30 minutes. Le CTAB est ensuite éliminé. La présence d'un halo clair (figure 2) autour des colonies indique une activité pectinolytique. Les colonies positives sont sélectionnées sur la deuxième boîte.

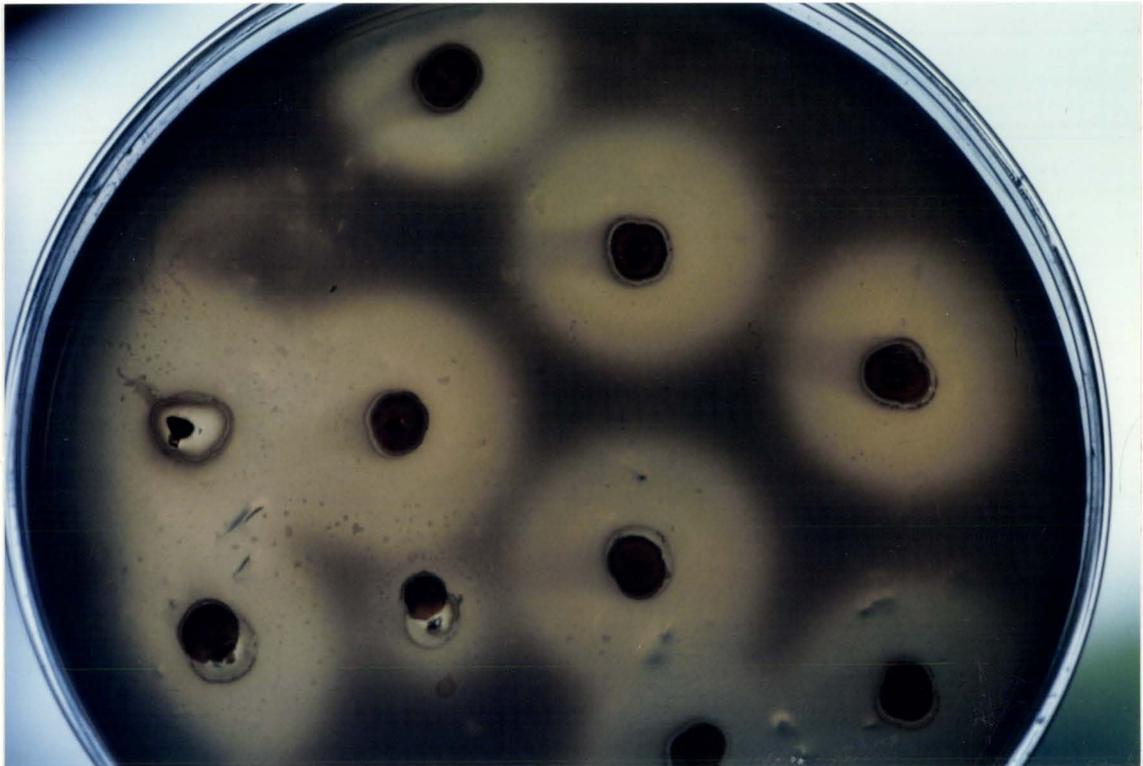


Figure 2: Les halos clairs autour de différentes colonies d'*E. coli* HB101(pBT4).

4. 4. Localisation de la pectate lyase EC 4.2.2.2 dans la cellule recombinée.

La méthode utilisée est basée sur la préparation de sphéropastes (Neu et Heppel 1964). 10 ml de culture sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé deux fois avec du tampon Tris-HCl 10mM; pH 8,0

puis repris dans 2 ml d'une solution hypertonique de Tris 30 mM saccharose 20% pH 8,0. Après homogénéisation, afin de remettre le culot en suspension, on ajoute à la suspension bactérienne de l'EDTA à la concentration finale de 1 mM. Le tube est agité doucement pendant 10 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite du lysozyme (Merck) préparé dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0 à raison de 2 mg/ml. Le milieu réactionnel est alors incubé à 37°C pendant une heure. Il est conseillé de continuer d'agiter doucement les tubes régulièrement pendant le temps d'incubation. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu correspond au contenu périplasmique. Le culot est resuspendu vigoureusement dans 2 ml d'eau distillée, conservé à température ambiante et accompagné de plusieurs homogénéisations vigoureuses par effet de vortex pendant une heure. Par ailleurs, on peut effectuer une sonication des échantillons. Après centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant obtenu constitue le contenu cytoplasmique et le culot obtenu repris dans du tampon Tris-HCl 10 mM constituera la fraction membranaire. Sur les différentes fractions périplasmiques, cytoplasmiques et membranaires, les dosages de la pectate lyase, de la β -lactamase et de la β -galactosidase sont effectués.

4.5. Dosage de la pectate lyase EC 4.2.2.2

Il s'agit d'une activité de dépolymérisation de l'acide polygalacturonique s'opérant par le mécanisme de β -élimination. Il s'ensuit la formation de composés insaturés ayant un maximum d'absorption autour de 235 nm.

*** Les réactifs**

-Tampon de dosage: Pour 1 litre: Tris base: 2,4 g; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 0,5 g ajusté à pH 9,5.

- Acide polygalacturonique (PGA): L'acide polygalacturonique (Sigma) est préparé dans de l'eau distillée à raison de 25 g/l. La solution est centrifugée avant filtration sur une membrane de porosité 0,45 μm .

*** Le dosage**

On ajoute 8 ml de PGA dans 100 ml du tampon de dosage. A 1 ml de ce mélange homogénéisé, on introduit un certain volume (μ l) de l'échantillon. On procède alors à la mesure de la variation de D.O existant entre l'échantillon et le blanc dont l'enzyme a été inactivée par la chaleur. Une variation de densité optique d'une unité d'absorbance en une minute à 235 nm, à pH 9,5 à 37°C et dans 1ml de milieu réactionnel correspond à une unité d'activité pectate lyase.

5- STABILITE ET CONTENU PLASMIDIQUE

5.1 - Mise en évidence de l'instabilité du pBT4

Les bactéries portant le pBT4 sont mises en culture à 30°C une nuit dans le milieu LB supplémenté de tétracycline et d'ampicilline. 1 ml de la culture est centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est lavé deux fois avec du NaCl 0,85% afin d'éliminer toutes traces d'antibiotiques puis remis en suspension dans 1 ml de milieu LB neuf sans antibiotique. Ensuite on inocule avec 25 ml de la suspension deux erlenmeyers contenant chacun 50 ml de milieu LB l'un avec et l'autre sans antibiotiques. Ils sont incubés soit à 30°C soit à 37°C, avec 25 μ l de la suspension cellulaire. 25 μ l de milieu de culture sont prélevés stérilement toutes les 20 générations de croissance cellulaire pour inoculer un autre milieu de même composition incubé dans les mêmes conditions. Ces transferts sont répétés jusqu'à 100 générations de croissance cellulaire. Par ailleurs, 1 ml de culture est convenablement dilué avant étalement sur plusieurs boîtes de Pétri gélosées sans antibiotiques. Après 24 heures d'incubation soit à 30°C soit à 37°C, 100 à 200 colonies sont repiquées sur du LB gélosé dans lequel ont été incorporées de la tétracycline et de l'ampicilline respectivement à la concentration de 10 μ g/ml et 50 μ g/ml. Les boîtes sont ensuite incubées 3 jours à 37°C.

5.2 - Evaluation du contenu plasmidique cellulaire

La méthode utilisée est apparentée à celle de Namdev *et al.* (1993). Les bouillons de culture prélevés à différents temps de fermentation sont centrifugés pendant 10 minutes à 12000 g et à 4°C. Les culots sont d'abord lavés deux fois avec une solution de NaCl 0,9% et repris dans la même solution de sorte que la densité optique soit de 2 puis conservés au congélateur à -20°C. Les échantillons sont décongelés et 1 ml de la suspension cellulaire de D.O de 2 est repris dans du tampon STE (NaCl: 0,1 M; Tris-HCl: 10 mM et EDTA: 1 mM à pH 8,0). Après l'homogénéisation et la centrifugation des suspensions cellulaires, les surnageants sont éliminés et chaque culot est resuspendu dans 150 µl de tampon de lyse dont la composition pour 1 ml est la suivante: 40 µl d'EDTA à 0,25 M; 20µl d'une solution de 2 mg/ml de RNAase; 100 µl de lysozyme à 50 mg/ml; 40 µl d'eau désionisée, et incubés à 37°C pendant 15 minutes. Les suspensions obtenues sont ensuite mélangées à 150 µl de SDS à 2% et incubées dans un bain-marie à 65°C pendant 20 minutes. Après refroidissement ensuite à la température ambiante pendant 10 minutes, 60 µl de chaque échantillon sont mélangés à 20 µl de tampon de dépôt constitué de 60% (w/v) de sucrose et 0,5% (w/v) de bleu de bromophénol. 20 µl de chaque mélange sont déposés sur un gel d'agarose à 0,8% préparé dans du tampon TBE (Tris: 89 mM; acide orthoborique: 89 mM et 2,5 mM d'EDTA) à pH 8,3. L'électrophorèse est réalisée à 75 V dans du tampon TBE pendant environ 2 heures.

6- LES PLANS D'EXPERIENCES UTILISES.

Deux plans d'expériences ont été utilisés pour réaliser l'optimisation de la composition du milieu de culture et l'étude de la stabilité du pBT4. Il s'agit d'une part du plan factoriel complet de type 2ⁿ inspiré du modèle de Box et Wilson (1951) qui a permis de montrer l'influence et les effets d'interaction des facteurs sur les réponses étudiées et d'autre part, celui de la réponse de surface inspiré du modèle de Doehlert (1970), qui nous a permis de déterminer la bonne combinaison des concentrations du glucose et du magnésium dans le

milieu de culture en vue d'une meilleure production de pectate lyase par *E. coli* HB101(pBT4).

6.1. Les plans d'expériences factoriels à deux niveaux (Box-Wilson 1951)

6.1.1. Généralités et modèle mathématique

On appelle factorielle une expérience organisée de manière à étudier l'action de plusieurs facteurs dans toutes leurs combinaisons. Nous n'avons pas envisagé la réalisation d'une matrice de "screening" car tout simplement nous ne pouvions prendre le risque de supposer qu'il n'existe pas d'effet d'interaction entre les facteurs étudiés. Dans une matrice de "screening" on recherche très rapidement, parmi un très grand nombre de facteurs, ceux qui ont de l'influence sur la réponse étudiée dans le domaine de l'étude de chacun des facteurs retenus (Sergent *et al.*, 1991). Le modèle mathématique polynomial de premier degré qui semble approprié pour cette étude pour quatre variables X_1 , X_2 , X_3 et X_4 est celui de Box et Wilson (1951).

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 \\ + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 \\ + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{234}X_2X_3X_4 \\ + b_{1234}X_1X_2X_3X_4$$

où b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} , b_{34} , b_{123} , b_{124} , b_{134} , b_{234} , b_{1234} sont les coefficients de ce modèle à estimer.

Le grand intérêt de l'application expérimentale de cette matrice à part qu'elle permet d'estimer l'influence des facteurs retenus, est qu'elle permet aussi l'étude des influences réciproques des facteurs encore appelées interactions, avec diminution du nombre d'essais et une meilleure précision sur les résultats. Pour chaque facteur, il est important de préciser son domaine; c'est-à-dire son niveau bas et son niveau haut. Dans notre étude, le niveau correspond à des concentrations dont les plus grandes et plus petites sont notées respectivement par (+1) et (-1). L'ensemble de tous les niveaux définit

un domaine expérimental dans un espace à n dimensions (n = nombre de facteurs). Les facteurs sont indifféremment représentés par des variables codées (+ ou -) ou par des variables numériques (les concentrations).

6.1.2. Application expérimentale du modèle de Box et Wilson (1951) pour quatre variables X_1 , X_2 , X_3 et X_4 prise chacune à leurs niveaux (-) et (+).

Expériences	X_1	X_2	X_3	X_4	Réponse étudiée
1	-	-	-	-	Y_1
2	+	-	-	-	Y_2
3	-	+	-	-	Y_3
4	+	+	-	-	Y_4
5	-	-	+	-	Y_5
6	+	-	+	-	Y_6
7	-	+	+	-	Y_7
8	+	+	+	-	Y_8
9	-	-	-	+	Y_9
10	+	-	-	+	Y_{10}
11	-	+	-	+	Y_{11}
12	+	+	-	+	Y_{12}
13	-	-	+	+	Y_{13}
14	+	-	+	+	Y_{14}
15	-	+	+	+	Y_{15}
16	+	+	+	+	Y_{16}

Tableau 1: Application expérimentale du modèle factoriel de Box et Wilson (1951) pour quatre variables. Les réponses expérimentales sont notées Y_1 à Y_{16} .

6.2. Le plan d'expériences suivant le modèle de Doehlert (1970)

6.2.1. Généralités et modèle mathématique

Il s'agit d'une méthode de surface de réponse qui permet de se rendre compte des relations existantes entre une réponse et des variables continues. Elle repose sur une distribution uniforme des points expérimentaux dans l'espace des variables codées, ce qui permet de bien "couvrir" le domaine expérimental et d'explorer la totalité du domaine autour d'un point considéré comme le centre, suivant un hexagone régulier. Cette approche permettra de prédire, sur tout le domaine expérimental, l'évolution des réponses étudiées. Le modèle mathématique polynomial de second degré correspondant au réseau uniforme de Doehlert (1951) est le suivant pour deux variables X_1 et X_2 :

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5 X_1X_2$$

où b_1 , b_2 , b_3 , b_4 et b_5 sont les coefficients du modèle qu'il faudra estimer.

6.2.2. Application expérimentale du modèle de Doehlert (1970)

Expériences	Variables codées		Concentrations		Réponse étudiée
	Glucose	Mg ²⁺	[Glc]	[Mg ²⁺]	
1	-1	0	3	2,5	Z ₁
2	-0,5	-0,87	4	1,4	Z ₂
3	-0,5	0,87	4	3,6	Z ₃
4	0	0	5	2,5	Z ₄
5	0,5	-0,87	6	1,4	Z ₅
6	0,5	0,87	6	3,6	Z ₆
7	1	0	7	2,5	Z ₇

Tableau 2: Application expérimentale du réseau de Doehlert (1970). Z₁ à Z₇ sont les réponses pour chacune des expériences.

Théoriquement, pour connaître l'évolution de la production de pectate lyase par *E. coli* HB101(pBT4) dans le domaine expérimental défini, il faudrait faire des expériences en tout point de ce domaine. Ce qui représenterait un nombre infini d'expériences. La démarche utilisant le réseau de Doehlert (1951) a le grand intérêt de permettre d'obtenir la même information en faisant beaucoup moins d'expériences. Par ailleurs, il est possible d'étendre le domaine expérimental à un domaine voisin du domaine précédemment exploré. Le réseau de Doehlert (1951) permet de réutiliser les points du réseau limitrophe de la nouvelle zone à explorer.

Le logiciel Nemrod, L.P.R.A.I (1980) a été utilisé pour l'exploitation des résultats des plans d'expériences.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. ESTIMATION DE LA BIOMASSE.

Dans tous nos travaux, nous avons estimé la biomasse de la souche d'*E. coli* HB101(pBT4) exprimée en poids sec (g/l) en mesurant la densité optique de la culture bactérienne convenablement diluée et déterminée au spectrophotomètre à 600 nm. La conversion a été effectuée grâce à un étalonnage préalable qui nous a permis de déterminer la corrélation directe entre le poids sec et la densité optique (Figure 3) :

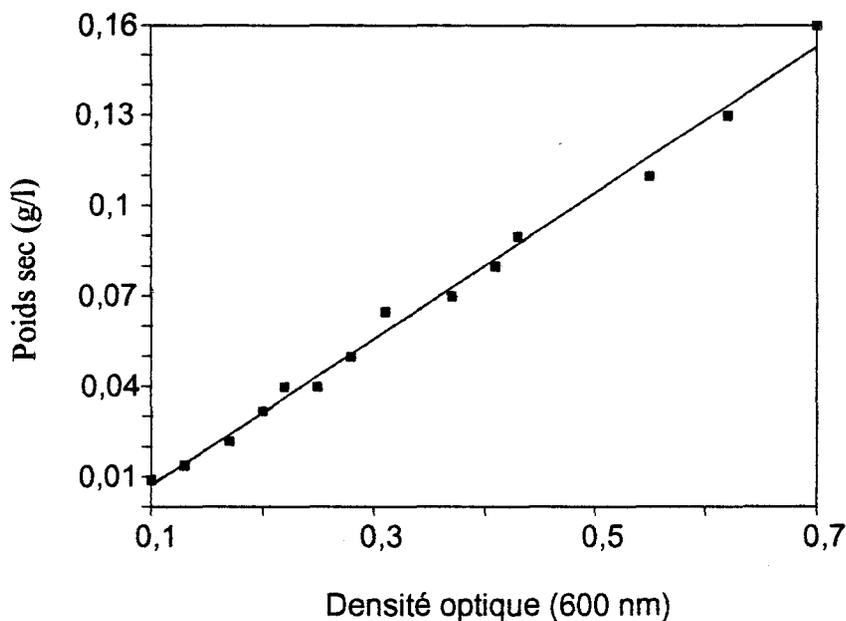


Figure 3. Corrélation entre la biomasse d'*Escherichia coli* HB101(pBT4) et la densité optique mesurée à 600 nm:

$$\text{Biomasse (g/l)} = 0,243 \text{ D.O} - 0,017 \text{ avec } r^2 = 0,9921$$

2. ETUDE DE LA LOCALISATION DE LA PECTATE LYASE

Dans les procédés de production utilisant les micro-organismes recombinés, il est bon de déterminer le compartiment cellulaire où se concentrent les produits des gènes clonés afin de développer une bonne stratégie pour leur récupération. Pour étudier la localisation de la pectate lyase recombinante, nous avons préparé des sphéroplastes afin de séparer le contenu des différents compartiments cellulaires sur des cultures de 12 et 24

heures en milieu LB. Sur les différentes fractions, nous avons dosé en plus de la pectate lyase, deux autres enzymes à savoir la β -lactamase et la β -galactosidase utilisées respectivement comme marqueurs périplasmique et cytoplasmique pour valider la procédure de fractionnement.

Enzymes	Compartiments cellulaires							
	Surnageant		Périplasmique		Cytoplasmique		Membranaire	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Pectate lyase	0	0	120	200	6	80	25	150
β -galactosidase	ND	ND	18%	15%	82%	85%	NM	NM
β -lactamase	ND	ND	90%	92%	10%	8%	NM	NM

Tableau 3. Etude de la localisation de la pectate lyase recombinante sur des cultures de 12 et 24 heures en milieu LB chez *E. coli* HB101(pBT4). L'activité de la pectate lyase est exprimée en U/ml. ND : non détecté; NM : non mesuré.

Cette étude a montré que la pectate lyase n'est pas sécrétée car nous n'en avons pas détecté dans le surnageant de culture (Tableau 3) même concentré plusieurs fois. La pectate lyase et la β -lactamase totales produites se retrouvent concentrées essentiellement au niveau de l'espace périplasmique. Dans le cytoplasme, alors que 82% de la β -galactosidase totale y sont dosés, seulement 5% de de la pectate lyase y sont trouvés. Après 24 heures de culture, la quantité de pectate lyase localisée au niveau du cytoplasme et des membranes augmente, par rapport à celle dosée au bout de 12 heures d'incubation. Cela peut être lié au fait que l'on se trouve dans une situation de saturation de l'espace périplasmique et alors la pectate lyase nouvellement produite n'est plus efficacement exportée au niveau de ce compartiment: elle demeure soit dans le cytoplasme soit reste associée aux membranes. Et cette situation pourrait être la cause de la toxicité du produit du gène recombinant pour la cellule recombinée observée par Tierny *et al.* (1994). Pour récupérer la pectate lyase recombinante à partir des cellules nous avons donc, dans toutes les expériences, adopté la technique de préparation des

sphéroplastes suivie d'une lyse par choc osmotique. La pectate lyase restante, associée aux membranes, est alors récupérée après lavage avec une solution de NaCl 1M.

3. OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.

3.1. Etude et choix des composants du milieu

Sur le plan industriel, les milieux complexes sont plus utilisés en raison de leur faible coût et de la forte densité cellulaire obtenue (Diaz-Ricci *et al.* 1990). Par contre, les milieux minima offrent de meilleures conditions pour les études physiologiques et métaboliques des micro-organismes et surtout, ils permettent de mieux contrôler la production des enzymes avec une meilleure reproductibilité (Yee et Blanch, 1993). Dans le but d'optimiser la production de biomasse et de pectate lyase par la souche recombinée d'*E. coli* HB101(pBT4), nous avons donc opté pour l'utilisation d'un milieu minimum afin de contrôler les différents facteurs pouvant influencer ces productions. Dans un premier temps, nous avons utilisé la démarche classique en fiole agitée qui consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants. Naturellement cette approche nous a conduits à un grand nombre d'expériences. Mais elle s'est révélée d'une importance capitale car, elle nous a permis d'avoir une idée générale sur le comportement de la cellule transformée en culture et cela en fonction des éléments nutritifs introduits dans le milieu.

*** Choix de la source de carbone**

La recherche de la meilleure source de carbone pour notre milieu de culture nous a conduits à étudier les effets de neuf sources différentes sur la croissance d'*E. coli* HB101(pBT4) et la production de pectate lyase (Figures 3 et 4). Toutes, à l'exception de l'acide polygalacturonique, sont métabolisées par la cellule. L'acide polygalacturonique (PGA) possède un poids moléculaire trop élevé pour traverser les parois cellulaires. Pour l'être, il devra être dépolymérisé. Or, la seule pectinase présente chez la souche *E. coli*

HB101(pBT4) pouvant effectuer cette dépolymérisation est la pectate lyase EC 4.2.2.2 clonée qui, nous l'avons montré, n'est pas sécrétée, mais il existe une faible diffusion de l'enzyme à travers la paroi cellulaire qui expliquerait les halos de clarification obtenus après croissance sur milieu gélosé contenant de l'acide polygalacturonique. Etant entièrement périplasmique, cette enzyme ne peut contribuer efficacement à la dépolymérisation du PGA et donc ce polymère est très faiblement utilisé comme source de carbone et comme source d'énergie en milieu liquide. Ceci se traduit par une faible croissance cellulaire et une faible production d'enzyme.

Sources de carbone	Biomasse (g/l)	P.L (U/ml)	P.L /biomasse
Témoin	0,08	1,5	18,8
Glucose	0,17	9,8	59,4
Fructose	0,16	8,3	50,6
Glycérol	0,16	6,9	43,1
Maltose	0,17	7,3	42,9
Sorbitol	0,16	8	50,6
Saccharose	0,14	7,3	52,1
Acide galacturonique	0,16	7	43,8
PGA	0,09	2,1	30

Tableau 4. Récapitulatif des niveaux de production de biomasse et de pectate lyase en fonction des différentes sources de carbone à 1 g/l. PGA: Acide Polygalacturonique. P.L.: pectate lyase.

Les résultats récapitulatifs des niveaux de production (Tableau 4) montrent que, la seule source de carbone qui semble permettre une meilleure production de la pectate lyase est le glucose. Notre choix s'est alors porté sur ce sucre parce qu'il n'est pas cher et aussi parce que le rapport production d'enzyme sur la production de biomasse est le plus élevé comparé à celui des autres sources de carbone utilisées. Par la suite, la concentration du glucose dans le milieu de culture a été provisoirement ajustée à 5 g/l afin d'étudier

l'influence des autres facteurs. Gong *et al.* (1989) pour faire exprimer en milieu minimum chez *E. coli* HB101 le gène de la cellodextrinase isolé chez *Fibrobacter* (anciennement *Bacteroides*) *succinogenes* S85, ont utilisé le glucose à raison de 5 g/l comme source de carbone et d'énergie.

* *Choix de la source d'acides aminés*

L'addition d'extrait de caséine a pour but d'améliorer la croissance cellulaire par un apport d'acides aminés. En effet, l'extrait de caséine est un mélange de tous les acides aminés excepté le tryptophane. L'apport d'extrait de caséine dans le milieu nous permettra de pallier aux problèmes d'auxotrophie car la souche d'*E. coli* HB101(pBT4) utilisée est auxotrophe à la fois pour la leucine et la proline. Les figures 4 et 5 montrent que la production de la pectate lyase et de biomasse est meilleure avec une augmentation de la concentration en extrait de caséine.

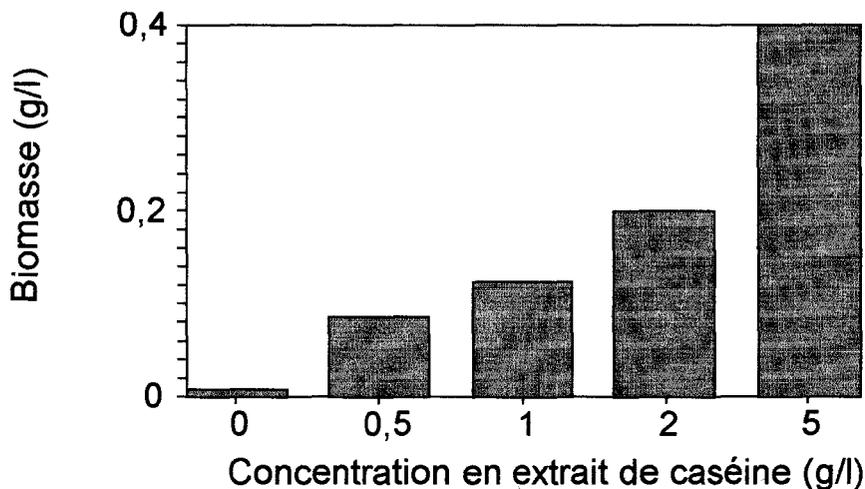


Figure 4. Influence de l'extrait de caséine sur la production de biomasse d'*E. coli* HB101(pBT4) en présence de glucose à 1 g/l

Sachant que l'extrait de caséine peut aussi être utilisé comme source de carbone par les micro-organismes, nous avons limité sa concentration à 5 g/l afin qu'il joue essentiellement son rôle de source d'acides aminés. Les concentrations d'extrait de caséine utilisées pour la réalisation des milieux minima sont très variables. Elles sont motivées par les objectifs de l'expérimentateur. C'est ainsi que Gill et Philipps (1985); Allen *et al.* (1992), ont

supplémenté leurs milieux synthétiques d'extrait de caséine à raison de 10 g/l. Seo et Bailey (1985 et 1986) ont utilisé une concentration d'extrait de caséine à 4 g/l pour cultiver la même souche que la nôtre. Enfin, Fayet et Prere (1992) ont utilisé une concentration en extrait de caséine de 5 g/l pour cultiver la souche d'*E. coli* K12.

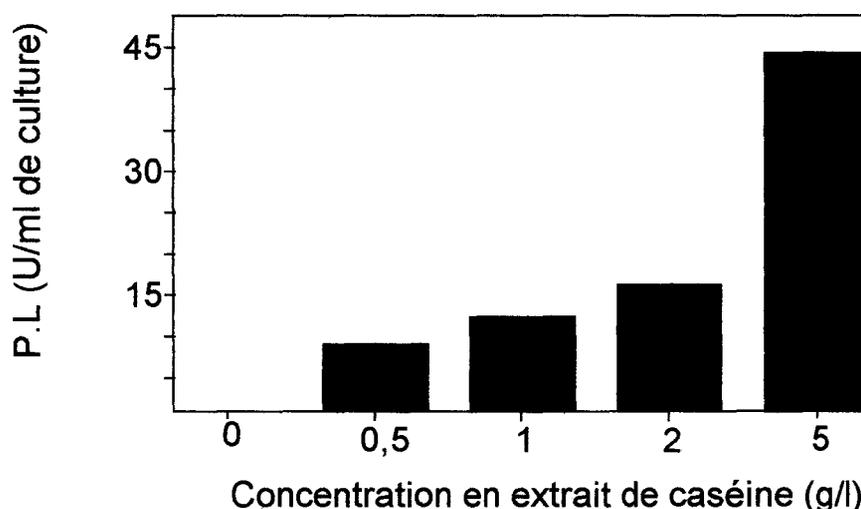


Figure 5. Influence de l'extrait de caséine sur la production de pectate lyase en présence de glucose à 1 g/l.

* Choix de la température d'incubation

Dans les procédés de fermentation et de production utilisant des micro-organismes, la température est un des facteurs environnementaux importants affectant non seulement la croissance cellulaire, mais aussi la stabilité plasmidique (Aiba et Koizumi 1984; Son *et al.*, 1987). Bien que la température de croissance optimale d'*E. coli* soit 37°C, le souci d'être dans les conditions optimales de stabilité du pBT4 nous a confortés dans le choix de 30°C comme température d'incubation pour toutes les expériences. En effet, comme le montre la figure 6, en l'absence de tétracycline et d'ampicilline, la stabilité du pBT4 au terme de 60 générations est très faible. En présence de ces pressions de sélection, la stabilité du pBT4 est proche de 100% à 30°C contre environ 95% à 37°C toujours au terme des 60 générations.

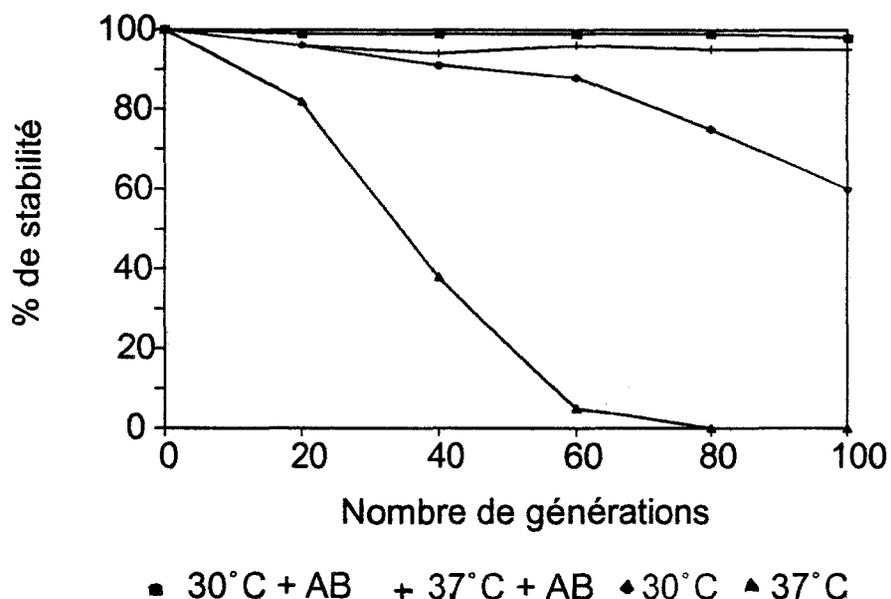


Figure 6. Stabilité du pBT4 en fonction de la température d'incubation d'*E. coli* HB101(pBT4) en présence ou non d'antibiotiques.

Cette différence de stabilité du pBT4 en présence ou non d'antibiotiques est peut être liée à un métabolisme cellulaire plus important à 37°C qu'à 30°C, qui est probablement accompagné d'une forte expression du gène recombinant. De nombreux auteurs ont cultivé les cellules *E. coli* transformées à des températures inférieures à 37°C. C'est par exemple le cas d'Hopking *et al.* (1985), Zabinski *et al.* (1987) et Tolentino et San (1988), qui ont cultivé leurs souches d'*E. coli* recombinées à 32°C. Son *et al.* (1987) ont étudié l'effet de la température sur la stabilité du plasmide pCK108 recombinant portant le gène de la cellulase et l'expression de celui-ci chez *B. megaterium* ATCC14945. Ils ont montré que l'expression du gène était forte à des températures plus élevées mais que le taux de croissance maximal est atteint à 30°C avec une stabilité plus grande du pCK108. Ces auteurs ont donc alors pris la décision de cultiver *B. megaterium* recombiné à 30°C.

** Influence des pressions de sélection*

L'utilisation de pressions de sélection est une des stratégies les plus utilisées en laboratoire pour augmenter la stabilité des plasmides recombinants

(Dennis *et al.* 1985). L'étude de l'influence des antibiotiques seuls ou associés montre que la production de la pectate lyase est meilleure en présence des deux antibiotiques. En effet, dans ces conditions, cette production est 16% supérieure à celle obtenue en présence de la tétracycline seule et 50% supérieure à la production obtenue en présence d'ampicilline seule. Par contre, il n'y a pas de grandes différences dans les productions de pectate lyase lorsque les milieux de culture sont soit dépourvus d'antibiotique soit supplémentés uniquement d'ampicilline (figure 7).

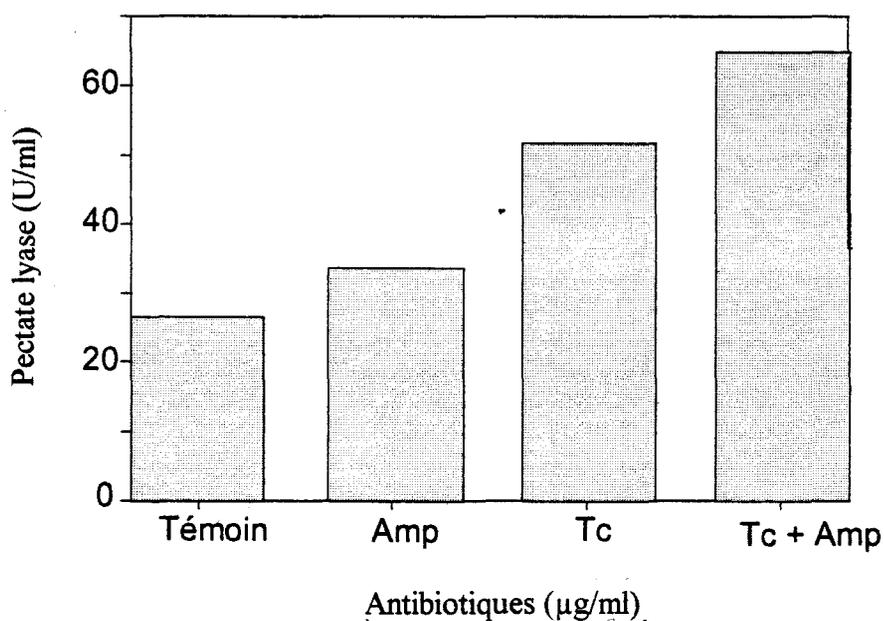


Figure 7. Influence des antibiotiques sur la production de pectate lyase. Les concentrations du glucose et de l'extrait de caséine sont fixées à 1 g/l, celles de la tétracycline et de l'ampicilline sont respectivement de 10 et 50 µg/ml.

La souche recombinée d'*E. coli* HB101(pBT4) produit de façon constitutive la β -lactamase qui est une enzyme dégradant l'ampicilline (Tableau 1). Ceci expliquerait le fait que l'influence de l'ampicilline sur la production de l'enzyme recombinante soit minime car l'antibiotique est dégradé dans l'espace périplasmique avant d'atteindre le cytoplasme. De même, la très faible quantité de β -lactamase qui pourrait diffuser dans le milieu de culture contribuerait encore plus à la dégradation de l'ampicilline. Mais lorsque l'ampicilline est associée à la tétracycline, il semblerait qu'il se produise une synergie de leurs effets sur la production de pectate lyase. Izaki et Arima (1965) ont montré que l'accumulation de la tétracycline se fait par un mécanisme actif et il semblerait

que l'ampicilline suive aussi ce processus d'accumulation. Dans ces conditions, pour être dans les conditions optimales de production de la pectate lyase, il est souhaitable de supplémenter le milieu minimum à la fois de tétracycline et d'ampicilline respectivement aux concentrations de 10 µg/ml et 50 µg/ml.

** Choix d'un tampon*

Le choix d'un tampon approprié est l'un des éléments clés dans la formulation de la composition d'un milieu synthétique. Le tampon phosphate est le plus utilisé: pour son pKa favorable à la culture de nombreux micro-organismes, pour son pouvoir tampon et pour son pouvoir chélateur des ions métalliques et comme source de phosphate (Neidhardt *et al.*, 1974). Le phosphate participe à de nombreuses réactions enzymatiques du métabolisme primaire à savoir la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il est aussi impliqué dans le métabolisme des carbohydrates, dans la respiration et dans le contrôle du niveau de l'ATP cellulaire (Ryan *et al.*, 1989), dans le métabolisme des phospholipides (Brock et Madigan, 1988). Dans ces conditions, sa concentration et son pouvoir tampon tendent à diminuer au cours de la culture (Neidhardt *et al.*, 1974). Cette situation nous a conduits à ajouter des tampons organiques à notre milieu de base M9 dépourvu d'ions calcium et magnésium. Ces tampons ont l'avantage de ne pas être toxiques (Eagle, 1971), de n'être utilisés ni comme source de carbone ni comme source d'azote (Neidhardt *et al.*, 1974). Nos résultats montrent que la plage de pH où s'observe la meilleure production de pectate lyase se situe entre 6,5 et 7.

Tampons	pH	Pectate lyase (U/ml)
MES	6	30
PIPES	6,5	63
MOPS	7	65,5
HEPES	7,5	45,3
	8	24,4

Tableau 5. Influence de différents tampons utilisés à 50 mM sur la production de pectate lyase chez *E. coli* HB101 (pBT4).

Les tampons organiques PIPES et MOPS conviennent parfaitement, car les niveaux de production de l'enzyme recombinante sont similaires entre eux et par ailleurs supérieurs à ceux obtenus avec les tampons HEPES et MES (Tableau 5). Notre choix s'est donc porté sur le tampon MOPS que nous avons ajouté dans tous les milieux à la concentration de 50 mM. Plusieurs auteurs (Neidhardt *et al.*, 1974; Herendeen *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1987) l'ont utilisé à cette concentration dans leurs milieux minima pour cultiver leurs souches d'*E. coli*.

** Choix des ions divalents*

Le magnésium et le calcium respectivement aux concentrations de 2,5 mM et 0,25 mM semblent augmenter la production de la pectate lyase (Tableau 6).

Calcium (mM)	Pectate lyase (U/ml)	Magnésium (mM)	Pectate lyase (U/ml)
0	53,6	0	53,6
0,05	54	1	61,2
0,1	60	1,5	68,4
0,25	67,2	2	67,6
0,4	58	2,5	80
0,5	51,2	3,5	76

Tableau 6. Influence de la concentration de calcium et du magnésium sur la production de pectate lyase.

Le magnésium participe à la synthèse de l'ARN et des polysaccharides qui sont impliqués dans la croissance cellulaire (Tempest *et al.*, 1965). Le calcium participe à la rigidité membranaire et aux phénomènes de perméabilité cellulaire (Wong, 1993). Liao (1991) a montré que la production et la sécrétion de la pectate lyase par la bactérie phytopathogène *Pseudomonas fluorescens* CY091 étaient influencées par les ions calcium. De nombreux auteurs ont mentionné l'influence des ions divalents sur la production d'enzymes. McQueen et Schottel (1987) ont montré que la production de l'estérase par

Streptomyces scabies est influencée par les ions zinc. Kirk *et al.* (1986) ont également montré que la production de la ligninase par *Phanerochaete chrysosporium* était multipliée par trois en présence d'ions cuivre et manganèse. Nous avons remarqué que la production de pectate lyase est améliorée en présence des ions calcium et magnésium ajoutés individuellement dans le milieu de culture.

Suite à cette étude préliminaire pour le choix des facteurs susceptibles d'entrer dans la composition de notre milieu de culture, nous avons retenu l'extrait de caséine, le glucose, le magnésium, le calcium, la tétracycline, l'ampicilline, le tampon MOPS. De plus le tryptophane a été retenu parce c'est le seul acide aminé qui manque dans l'extrait de caséine. Dans l'étude qui va suivre, nous allons étudier l'influence respective de chacun de ces facteurs et leurs interactions réciproques à la fois sur la production de biomasse et de pectate lyase à 30°C.

3.2. Expérimentation factorielle

La formulation de la composition d'un milieu minimum est souvent complexe car les facteurs influents sont nombreux. La réponse n'étant pas parfois unique, la résolution peut comporter diverses approches. Il est donc nécessaire de structurer le problème en rassemblant les informations, en fixant et en classant les objectifs, en comparant et en choisissant les facteurs à étudier et enfin, en énonçant la décision qui consiste à retenir les facteurs les plus importants (Long, 1988). Les huit facteurs retenus ont été répartis en deux groupes 1 et 2 de quatre facteurs chacun (Tableaux 7 et 8) afin d'étudier à l'aide d'expériences factorielles de type 2⁴, leurs influences et leurs interactions sur les réponses étudiées. Dans le groupe 1 sont réunis quatre facteurs constituant des nutriments pour la cellule (sources de carbone, d'acides aminés et d'ions divalents). Dans le groupe 2 sont consignés, à l'exception du tryptophane, les facteurs qui ne sont pas utilisés comme nutriment par la cellule, mais qui influent indirectement sur le procédé.

Facteurs	Unités	Niveaux	
		(+1)	(-1)
Extrait de caséine	g/l	5	1
Glucose	g/l	5	1
Magnésium	mM	2,5	0
Calcium	mM	0,25	0

Tableau 7. Groupe 1 de facteurs retenus pour le premier plan d'expériences.

Facteurs	Unités	Niveaux	
		(+1)	(-1)
Tétracycline	µg/ml	10	2,5
Ampicilline	µg/ml	50	0
Tryptophane	µg/ml	20	0
MOPS	mM	50	25

Tableau 8. Groupe 2 de facteurs retenus pour le deuxième plan d'expériences

Expériences	Casa	Glc	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Biomasse (g/l)		Pectate lyase (U/ml)		
					(1)	(2)	(1)	(2)	(3)
1	1	1	0	0	0,1	0,11	19,2	20,1	23
2	5	1	0	0	0,2	0,22	78	64	67
3	1	5	0	0	0,08	0,09	14,4	12	9,3
4	5	5	0	0	0,19	0,23	73,4	63	60
5	1	1	2,5	0	0,2	0,12	30	22,5	22
6	5	1	2,5	0	0,5	0,45	68	75,8	84
7	1	5	2,5	0	0,3	0,35	12,5	8	9
8	5	5	2,5	0,25	1,2	1,33	152	152	142
9	1	1	0	0,25	0,11	0,12	19,2	22,5	14,2
10	5	1	0	0,25	0,2	0,17	99,4	98	72
11	1	5	0	0,25	0,11	0,1	18,4	32	15,2
12	5	5	0	0,25	0,27	0,16	74	83,6	77
13	1	1	2,5	0,25	0,28	0,15	30,4	40,5	31
14	5	1	2,5	0,25	0,45	0,45	106	91,2	80
15	1	5	2,5	0,25	0,14	0,35	17,5	12,5	10,4
16	5	5	2,5	0,25	1,1	1,21	136	167	140

Tableau 9. Résultats expérimentaux du premier plan d'expériences.

Casa: extrait de caséine; Glc: Glucose; Mg²⁺:Magnésium; Ca²⁺: Calcium; (1), (2) et (3) indiquent le nombre de réalisations des expériences respectivement pour chaque réponse.

Expériences	Tc	Amp	Trp	MOPS	Biomasse (g/l)		Pectate lyase (U/ml)	
					(1)	(2)	(1)	(2)
1	2,5	0	0	25	1,2	1,02	158	130
2	10	0	0	25	1,15	0,95	196	140
3	2,5	50	0	25	1,12	1,18	160	152
4	10	50	0	25	0,96	0,84	150	120
5	2,5	0	20	25	1,16	1,14	186	130
6	10	0	20	25	1,05	0,91	156	120
7	2,5	50	20	25	1,02	0,94	158	106
8	10	50	20	25	1,1	1,07	170	140
9	2,5	0	0	50	1,06	1,05	166	140
10	10	0	0	50	1,04	1,28	162	139
11	2,5	50	0	50	1,2	1,1	146	135
12	10	50	0	50	1,03	1,18	188	141
13	2,5	0	20	50	1,08	1,15	182	158
14	10	0	20	50	1,08	1,06	156	152
15	2,5	50	20	50	1,1	1,27	168	154
16	10	50	20	50	1,05	1,06	178	162

Tableau 10. Résultats expérimentaux du deuxième plan d'expériences.

Tc: Tétracycline; Amp: Ampicilline; Trp: Trypotophane; tampon MOPS: Acide morpholino-4-propanesulfonique; (1) et (2) indiquent le nombre de réalisations des expériences.

Variables	Biomasse (g/l)		Pectate lyase (U/ml)	
	Coefficients	Degré de signification	Coefficients	Degré de signification
Constante	0,35		7,73	
Extrait de caséine (Casa)	0,18	***	38,31	***
Glucose	0,1	***	4,43	*
Magnésium (Mg ²⁺)	0,19	***	10,64	***
Calcium (Ca ²⁺)	-0,01		4,31	*
Casa et Glucose	0,08	***	9,58	***
Casa et Magnésium	0,13	***	9,53	***
Casa et Calcium	-0,01		1,72	
Glucose et Magnésium	0,1		7,16	
Glucose et calcium	-0,01		1,11	
Magnésium et Calcium	-0,01		-0,75	
Casa et Glucose et Mg ²⁺	0,08	***	10,88	***
Casa, Glucose et Ca ²⁺	0		1,93	
Casa, Mg ²⁺ et Ca ²⁺	0		-1,36	
Glucose, Mg ²⁺ et Ca ²⁺	-0,02		-1,73	
Casa , Glc et Mg ²⁺ et Ca ²⁺	0		0,45	

Tableau 11. Coefficients du polynôme de régression du premier plan d'expériences avec estimation du degré de signification des facteurs et des interactions.

*** : Significatif à moins de 0,001

** : Significatif entre 0,001 et 0,01

* : Significatif à moins de 0,05

Variables	Biomasse (g/l)		Pectate lyase (U/ml)	
	Coefficients	Degré de signification	Coefficients	Degré de signification
Constante	-1,07		151,81	
Tétracycline (Tc)	-0,04		0	
Ampicilline (Amp)	-0,01		-2,63	
Tryptophane (Trp)	0,02		0,88	
MOPS	0,02		3,56	
Tétracycline et Ampicilline	0		1,81	
Tétracycline et Tryptophane	-0,02		-2,56	
Tétracycline et MOPS	0,01		0,75	
Ampicilline et Tryptophane	-0,01		0,31	
Ampicilline et MOPS	0,02		-1,12	
Tryptophane et MOPS	0,02		3,38	
Tc , Amp. et Trp	0,05	***	4,63	
Tc, Amp et MOPS	-0,01		2,06	
Tc, Trp et MOPS	-0,01		-2,56	
Amp, Trp et MOPS	-0,01		-1,19	
Tc, Amp, Trp et MOPS	-0,01		-6,38	

Tableau 12. Coefficients du polynôme de régression du deuxième plan d'expériences avec estimation du degré de signification des facteurs et des interactions.

*** : Significatif à moins de 0,001

** : Significatif entre 0,001 et 0,01

* : Significatif à moins de 0,05

Les résultats expérimentaux obtenus après réalisation des plans d'expériences factoriels de type 2⁴ (Tableaux 9 et 10) montrent que, les facteurs du groupe 1 sont ceux qui exercent une influence forte à la fois sur la biomasse cellulaire et sur la production de pectate lyase recombinante. Ces observations sont confirmées par la détermination des coefficients des polynômes de régression relatifs aux réponses des deux groupes (Tableaux 11 et 12). Les quatre facteurs du groupe 1 sont significatifs sur la production de pectate lyase; par contre, pour la production de biomasse, seuls l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium le sont. Il est intéressant de noter que ces trois facteurs combinés (extrait de caséine, glucose et magnésium) sont donc essentiels dans la composition du milieu de culture et exercent une sorte de synergie à la fois sur la production de biomasse et de pectate lyase. Par ailleurs, l'analyse des résultats expérimentaux du deuxième plan d'expériences montre qu'aucun des facteurs du groupe 2 n'est significatif à la fois sur la production de biomasse et de pectate lyase (Tableau 12). Cette observation nous a conduits à retenir dans le milieu l'extrait de caséine, le glucose, le magnésium à leur niveau (+1) et le calcium à son niveau (-1). Par ailleurs, l'analyse des résultats expérimentaux du deuxième groupe montre qu'aucun n'est significatif ni sur la production de biomasse ni sur la production de pectate lyase. Cette observation est confirmée par les productions de biomasse et de pectate lyase qui sont globalement identiques dans les seize expériences du plan d'expériences 2 (Tableau 10). Nos résultats avec le magnésium, qui est un élément essentiel pour la croissance, sont conformes à ceux de Lusk et Kennedy (1969). Ces auteurs ont montré que le magnésium contribue à la production de biomasse d'*E. coli* A234. Le magnésium participe à l'activité de nombreuses enzymes dont probablement celle du métabolisme cellulaire. Ce cation contribue aussi à la préservation de la structure des ribosomes qui sont impliqués dans la synthèses des protéines (Tessières *et al.*, 1959). Le magnésium est transporté à l'intérieur d'*E. coli* via deux systèmes de transport I et II (Nelson et Kennedy, 1972). Le système I ne peut être réprimé et il n'est pas spécifique car il sert aussi au transport d'autres cations tels que le cobalt. Le système II est plus spécifique pour le magnésium; par contre il est réprimé par de fortes concentrations de magnésium.

Des interactions entre les éléments constitutifs d'un milieu de culture peuvent se produire et influencer positivement ou négativement la réponse étudiée (Nancib *et al.*, 1991). De nombreux cas d'interactions ont été confirmés. Par exemple, Polizeli *et al.* (1992) ont montré que chez *Neurospora crassa*, lorsque le glucose est associé à la pectine, à l'acide polygalacturonique ou l'acide galacturonique, il produisait une suppression de l'effet inducteur de ces derniers sur la production de polygalacturonase. Dans le premier plan d'expériences, nous observons des interactions significatives entre l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium. Il est intéressant de noter que ces facteurs interagissent tous les trois positivement à la fois sur la production de biomasse et de pectate lyase. Cette observation est confirmée par les résultats du premier plan d'expériences où les meilleurs niveaux de production de biomasse et de pectate lyase s'obtiennent dans les milieux dans lesquels l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium sont présents simultanément (expériences 8 et 16 du premier plan d'expériences. Il semblerait alors qu'il y ait une sorte de synergie des effets de chacun de ces trois facteurs sur la production de biomasse et de pectate lyase. Par ailleurs, cette synergie s'estompe en présence de calcium.

En ne prenant en compte que les résultats significatifs l'équation générale de la production de biomasse pour le groupe 1 est la suivante :

$$0,35 + 0,18[\text{Casa}] + 0,10[\text{Glc}] + 0,2[\text{Mg}^{2+}] + 0,083[\text{Casa}][\text{Glc}] + 0,13[\text{Casa}][\text{Mg}^{2+}] + 0,10[\text{Glc}][\text{Mg}^{2+}] + 0,075[\text{Casa}][\text{Glc}][\text{Mg}^{2+}] = \text{Biomasse (g/l)}.$$

De même l'équation générale de la production de pectate lyase est la suivante :

$$57,7 + 38,3[\text{Casa}] + 4,4[\text{Glc}] + 10,6[\text{Mg}^{2+}] + 4,3[\text{Ca}^{2+}] + 9,58[\text{Casa}][\text{Glc}] + 9,53[\text{Casa}][\text{Mg}^{2+}] + 7,2[\text{Glc}][\text{Mg}^{2+}] + 10,9[\text{Casa}][\text{Glc}][\text{Mg}^{2+}] = \text{Pectate lyase (U/ml)}.$$

Si on fixe (Mg^{2+}) à 2,5 mM sans ajouter le calcium c'est-à-dire $[\text{Ca}^{2+}] = 0$, l'équation générale de la production de pectate lyase devient:

$$84,2 + 62[\text{Casa}] + 22,4[\text{Glc}] + 36,8[\text{Casa}][\text{Glc}] = \text{Pectate lyase (U/ml)}$$

De même si on fixe (Mg^{2+}) à 2,5 mM et le calcium à 0,25 mM, l'équation générale de la production de biomasse devient:

$$85,3 + 62[\text{Casa}] + 22,4[\text{Glc}] + 36,8[\text{Casa}][\text{Glc}] = \text{Pectate lyase (U/ml)}$$

Ces deux équations montrent que le calcium n'influe pas sur la production de pectate lyase en présence de magnésium et le fait qu'il interagisse plutôt négativement avec les autres facteurs sur les réponses étudiées, nous a conduits à supprimer du milieu le calcium. Ainsi la composition provisoire est donnée dans le Tableau 13.

Ingrédients	g/l
Na_2HPO_4	7,3
KH_2PO_4	3
NaCl	0,5
NH_4Cl	1
Extrait de caséine	5
Glucose	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6
Tétracycline	0,01
Ampicilline	0,05
Tampon MOPS	5,3
Thiamine	0,002

Tableau 13. La composition provisoire du milieu minimum

Wong (1993) a montré que de fortes concentrations de calcium entraînaient des modifications dans la perméabilité membranaire. Cette

modification serait liée à une réorganisation structurale de la paroi cellulaire et il en résulterait une réduction du transport des sources de carbone à travers des membranes accompagnée d'une réduction de la croissance cellulaire (Doran *et al.*, 1987).

L'intérêt des méthodes factorielles tient au fait que l'on peut faire varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée (Goupy, 1988). A priori cette méthode peut paraître choquante au premier abord, le fait de faire varier tous les facteurs à la fois n'est pas un inconvénient mais au contraire offre de nombreux avantages parmi lesquels:

- diminution du nombre d'essais
- nombre de facteurs étudiés très grand
- détection des facteurs influents
- détection des interactions entre facteurs
- détection des optimaux
- meilleure précision des résultats
- optimisation des résultats.

Galvez-Marisca *et al.* (1991) ont utilisé la méthode factorielle de Box et Wilson (1951) pour optimiser la composition d'un milieu minimum de production de la dextranase chez *Paecilomyces lilacinus* 6R.

Ce modèle nous a permis de montrer que l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium sont les principaux nutriments à apporter au milieu de base pour augmenter de façon notable la production de pectate lyase chez *E. coli* HB101(pBT4). Par ailleurs, cette étude a permis de montrer une très forte synergie entre ces trois nutriments sur la production de pectate lyase. Alors nous nous sommes demandés si une augmentation proportionnelle de la concentration des facteurs aura une influence sur la production de pectate lyase ?

Nous avons utilisé une stratégie qui consiste à faire varier proportionnellement les concentrations en glucose, en extrait de caséine et en magnésium par rapport aux concentrations retenues dans le plan d'expériences factoriel précédent. Nous avons donc étudié plusieurs coefficients de concentration (Tableau 14).

Constituants	Facteurs de concentration						
	0,6	1	1,5	2	3	3,5	4
Extrait de caséine ^a	3	5	7,5	10	15	17,5	20
Glucose ^a	3	5	7,5	10	15	17,5	20
Magnésium ^b	1,5	2,5	3,75	5	6,25	8,75	10

Tableau 14. Concentrations des constituants utilisés lors de l'étude des facteurs de concentrations. Les concentrations sont exprimées en g/l (^a) ou en mM (^b).

Nous observons qu'il n'y a pas de proportionnalité entre l'augmentation des coefficients de concentration et la production de pectate lyase. En fait, autour du coefficient de concentration 1, il existe un optimum pour la production de l'enzyme recombinante.

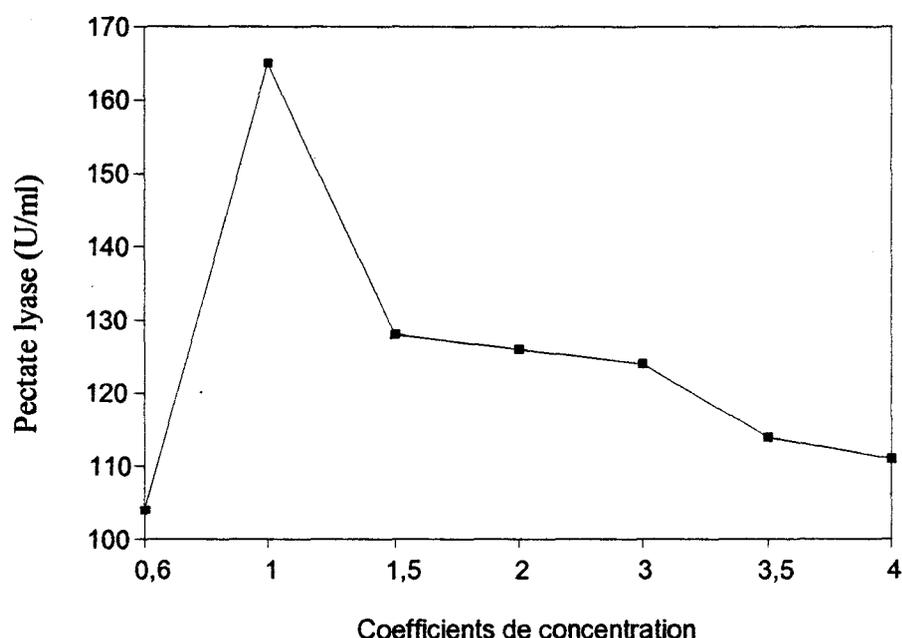


Figure 8. Evolution de la production de pectate lyase en fonction de l'augmentation proportionnelle des concentrations d'extrait de caséine, de glucose et de magnésium.

En culture aérobie, l'excès de nutriments (Yee et Blanch, 1993) et plus particulièrement l'excès de glucose peut entraîner la formation de produits acides dont l'acétate est le principal (Luli et Strohl, 1990). Il existerait une corrélation entre l'accumulation d'acétate et la réduction de la production de protéines recombinantes (Brown *et al.*, 1985; Jensen et Carlsen, 1990). Il est

possible que nous nous trouvions dans ce cas de figure pour une concentration élevée en nutriments.

3.3. Application de la méthode de Doehlert (1970)

La méthode de Doehlert a été utilisée pour mieux cerner le phénomène autour des concentrations en glucose et en magnésium correspondant au coefficient de concentration 1 (Doehlert, 1970; Dumenil *et al.*, 1988). Dans le contexte de notre étude, trois facteurs, à savoir le glucose, le magnésium et l'extrait de caséine, s'avèrent être les plus influents à la fois sur la production de biomasse et de la pectate lyase. Nous avons considéré que l'extrait de caséine se trouvait largement en excès dans le milieu de culture. Cela nous a amenés à fixer à 5 g/l la concentration de l'extrait de caséine pour les raisons évoquées précédemment, et à faire varier les concentrations du glucose et du magnésium autour du point où les concentrations en magnésium et en glucose sont respectivement de 2,5 mM et 5 g/l. C'est-à-dire trouver les meilleures combinaisons de concentration de glucose et de magnésium dans le milieu de culture pour une bonne production de l'enzyme par la cellule recombinée.

Expériences	Variables codées		Concentrations		P.L. expérimentale		P.L. calculée
	Glucose	Mg ²⁺	Glucose	Mg ²⁺	(1)	(2)	
A	-1	0	3 g/l	2,5 mM	112,6	109	113
B	-0,5	-0,87	4 g/l	1,4 mM	161,8	163	159,6
C	-0,5	0,87	4 g/l	3,6 mM	134,1	136	132,2
D	0	0	5 g/l	2,5 mM	169,2	162	165,6
E	0,5	-0,87	6 g/l	1,4 mM	199	195	199,8
F	0,5	0,87	6 g/l	3,6 mM	183,5	178	183,6
G	1	0	7 g/l	2,5 mM	206	210	205

Tableau 15. Les points utilisés pour construire le réseau de Doehlert (1970). (1) et (2) indiquent le nombre de réalisation des expériences. La concentration en extrait de caséine fixée pour toutes les expériences est de 5 g/l. P.L exprimée en U/ml.

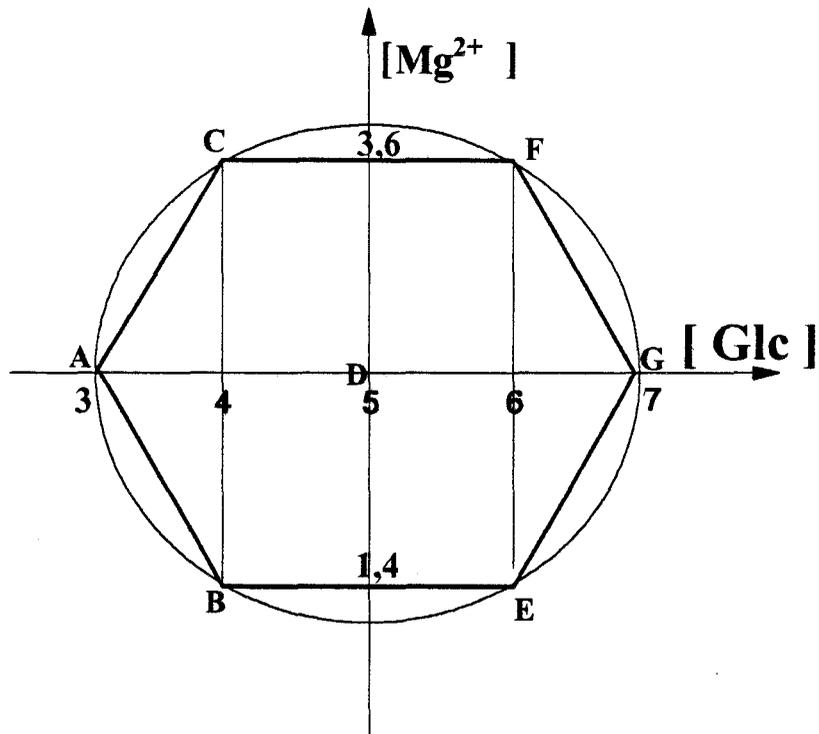


Figure 10. Représentation du réseau de Doehlert (1970) en utilisant les concentrations réelles du Tableau 15.

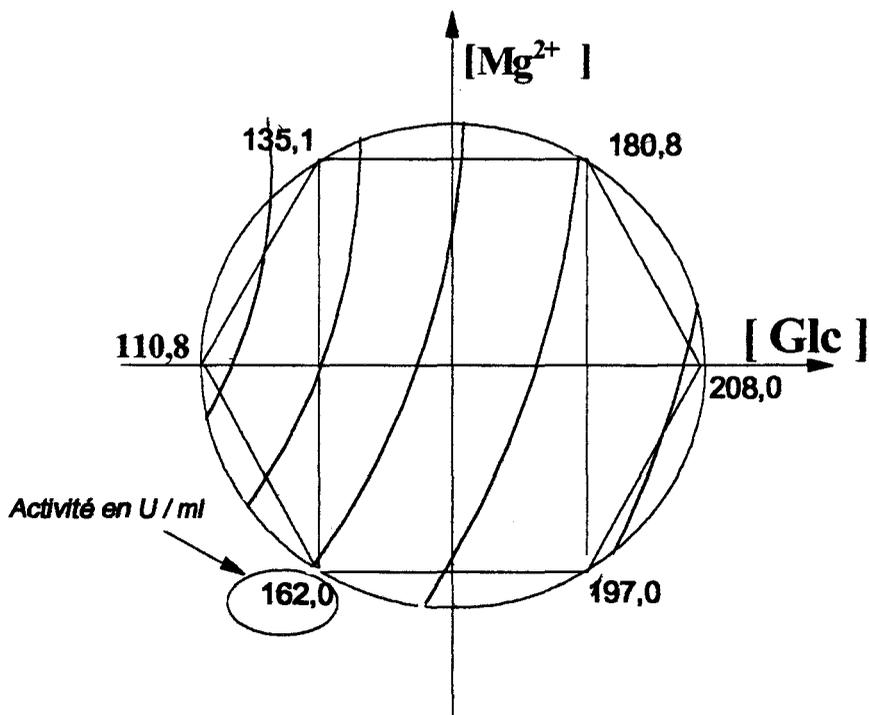


Figure 11. Les courbes d'isoréponses

Cette étude nous a permis, d'une part de montrer que les meilleures concentrations en glucose et en magnésium dans le milieu de culture sont respectivement 7 g/l et 2,5 mM et de dégager, d'autre part, l'équation de second ordre ci-dessous:

$$165,6 + 45,8[\text{Glc}] - 12,6[\text{Mg}^{2+}] - 6,2[\text{Glc}]^2 + 6,3[\text{Mg}^{2+}]^2 + 6,4[\text{Glc}][\text{Mg}^{2+}] = \text{Pectate lyase (U/ml)}.$$

Cette équation permet de prédire la productivité d'*E.coli* HB101(pBT4) en fonction des concentrations de glucose et de magnésium dans le domaine expérimental choisi et dans les conditions précisées.

Pour avoir une idée de l'axe suivant lequel il serait intéressant d'évoluer afin d'obtenir en fonction des concentrations du glucose et du magnésium les productions optimales de pectate lyase par *E. coli* HB101(pBT4), nous allons prendre la dérivée de l'équation ci-dessus en fonction du glucose et du magnésium.

$$\frac{\delta \text{PL}}{\delta [\text{glucose}]} = 45,8 - 12,6[\text{Mg}^{2+}] - 12,4 [\text{Glc}] + 6,3[\text{Mg}^{2+}]^2 + 6,4[\text{Mg}^{2+}]$$

Si nous considérons les coordonnées codées du point D (0,0) qui correspond au centre de l'hexagone régulier de la construction du réseau de Doehlert (1970), la dérivée de PL en fonction du glucose devient

$$\frac{\delta \text{PL}}{\delta [\text{Glucose}]} = 45,8$$

De même si on dérive l'équation en fonction du magnésium, on obtient:

$$\frac{d \text{P L}}{\delta [\text{Magnésium}]} = 45,8[\text{Glc}] - 12,6 - 6,2[\text{Glc}]^2 + 12,6[\text{Mg}^{2+}] + 6,4[\text{Glc}]$$

De même si nous considérons le point D (0,0), la dérivée devient

$$\frac{\delta \text{PL}}{\delta [\text{Magnésium}]} = -12,6$$

Pour obtenir des coordonnées codées, nous allons normaliser les valeurs de

$$\frac{\delta PL}{\delta[\text{glucose}]} = 45,8 \quad \text{et} \quad \frac{\delta PL}{\delta[\text{Magnésium}]} = -12,6$$

$$\text{Valeur normalisée de } \frac{\delta PL}{\delta[\text{Glucose}]} = \frac{45,8}{\sqrt{(45,8)^2 + (-12,6)^2}} = \frac{45,8}{47,5} = \mathbf{0,964}$$

$$\text{Valeur normalisée de } \frac{\delta PL}{\delta[\text{Magnésium}]} = \frac{-12,6}{\sqrt{(45,8)^2 + (-12,6)^2}} = \mathbf{-0,265}$$

Nous obtenons le vecteur u dont les coordonnées en variables codées sont (0,965; -0,265). L'axe de ce vecteur indique théoriquement les régions où l'on devrait se situer pour obtenir les meilleurs niveaux de production de pectate lyase par la cellule recombinée d'*Escherichia coli* HB101(pBT4) en fonction des concentrations du glucose et du magnésium.

IV. ETUDE DE LA STABILITE DU pBT4 DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE.

La stabilité plasmidique est un facteur important dans les procédés biotechnologiques utilisant des micro-organismes recombinés. De nombreux auteurs ont montré que la composition du milieu de culture pouvait affecter la stabilité des plasmides (Slater, 1979; Noack *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1992). Les vecteurs de clonage les plus utilisés en génie génétique et en biotechnologie sont le pBR322 et ses nombreux dérivés (Bolivar *et al.*, 1977). Ces plasmides possèdent une variété de sites de restriction uniques situés à l'intérieur de gènes codant pour des antibiorésistances permettant l'insertion de gènes étrangers et ils sont présents dans la cellule à nombre de copies élevé (Lee et Edlin, 1985). Mais l'inconvénient majeur avec ces plasmides est leur instabilité prononcée en l'absence de pression de sélection.

Nous avons entrepris une étude de la stabilité du pBT4 en présence ou non de tétracycline, d'ampicilline, de glucose et de magnésium en utilisant un plan d'expériences factoriel complet de type 2^4 .

Facteurs	Unités	Niveaux	
		(+1)	(-1)
Tétracycline	µg/ml	10	0
Ampicilline	µg/ml	50	0
Glucose	g/l	5	0
Magnésium	mM	2,5	0

Tableau 16. Les facteurs retenus pour l'étude de la stabilité du pBT4 chez *E. coli* HB101.

Le choix de la tétracycline et de l'ampicilline est dû au fait qu'elles constituent les pressions de sélection dans le milieu de culture. Nous avons également retenu le glucose afin d'étudier l'influence de la source principale de carbone sur la stabilité du plasmide. Quant au magnésium, il a été retenu parce que cet ion divalent semble influencer l'accumulation de la tétracycline à l'intérieur des cellules d'*E. coli* (Albert et Rees, 1956; Izaki et Arima, 1965; Zeew, 1968). Les cellules recombinantes ont été cultivées 24 heures sous agitation et aération en fioles sur les différents milieux de culture du plan d'expériences. Puis des dénombrements ont été réalisés sur gélose avec et sans antibiotiques. Les résultats du dénombrement des colonies avec ou sans antibiotiques exprimés en % de stabilité sont consignés dans le Tableau 17. De même les coefficients du polynôme de régression avec estimation du degré de signification des facteurs et des interactions sont représentés dans le Tableau 18.

En considérant les facteurs et les interactions significatifs, nous pouvons établir l'équation générale de la stabilité du pBT4 chez *E. coli* HB101 en culture

$$63,253 + 23,59[\text{Tc}] + 5,35[\text{Amp}] + 5,28[\text{Glc}] - 4,3[\text{Glc}][\text{Tc}] + 5,49[\text{Tc}][\text{Amp}][\text{Glc}] = \% \text{ de stabilité}$$

L'analyse des résultats expérimentaux (Tableau 18) montre que la présence de la tétracycline dans le milieu de culture, exerce un effet

considérable très significatif dans le sens d'une meilleure stabilité du pBT4. Par contre, l'ampicilline et le glucose exercent des effets moindres par rapport à la tétracycline sur la stabilité du plasmide. En d'autres termes, l'absence de la tétracycline, de l'ampicilline et du glucose du milieu de culture augmenterait l'instabilité du pBT4.

Expériences	Tétracycline	Ampicilline	Glucose	Magnésium	% de stabilité	
					(1)	(2)
1	0	0	0	0	14,2	30
2	10	0	0	0	98,8	87
3	0	50	0	0	40	50
4	10	50	0	0	84,2	90
5	0	0	5	0	52	60
6	10	0	5	0	79,2	82
7	0	50	5	0	44,3	65
8	10	50	5	2,5	99	97
9	0	0	0	2,5	13	20
10	10	0	0	2,5	87,2	89
11	0	50	0	2,5	35	40
12	10	50	0	2,5	65,2	87
13	0	0	5	2,5	25,6	87
14	10	0	5	2,5	69,7	40
15	0	50	5	2,5	45	78
16	10	50	5	2,5	99,9	98

Tableau 17. Résultats expérimentaux du dénombrement des colonies en fonction des conditions de culture.

Les facteurs et leurs interactions	Coefficients	Degré de signification
Constante	63,25	
Tétracycline	24,05	***
Ampicilline	5,49	**
Glucose	5,12	*
Magnésium	-3,13	
Tétracycline et Ampicilline	-2,56	
Tétracycline et Glucose	-4,43	*
Tétracycline et Magnésium	0,32	
Ampicilline et Glucose	2	
Ampicilline et Magnésium	1,75	
Glucose et Magnésium	0,25	
Tc, Ampicilline et Glucose	5,55	**
Tc, Ampicilline et Magnésium	-1,45	
Tc, Glucose et Magnésium	1,05	
Amp, Glucose et Magnésium	2,99	
Tc, Amp, Glucose et Magnésium	-1,31	

Tableau 18. Coefficients du polynôme de régression du troisième plan d'expériences avec estimation du degré de signification des facteurs et des interactions Tc: Tétracycline; Amp: Ampicilline.

*** : Significatif à moins de 0,001

** : Significatif entre 0,001% et 0,01

* : Significatif à moins de 0,05

Sachant que la stabilité du pBT4 est une condition très importante dans l'optimisation de la production de la pectate lyase, il nous a fallu choisir les conditions qui augmentent la stabilité du pBT4. Par ailleurs, le magnésium n'a aucun effet sur la stabilité du pBT4. Chez *E. coli*, le magnésium est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à deux systèmes de transport distincts localisés au niveau de la membrane interne (Ball *et al.*, 1977). Sompolinsky et Samra (1972) ont montré que chez *E. coli* K12-W945 et *Staphylococcus aureus* 111, l'incorporation intracellulaire de la tétracycline était fonction de la concentration en magnésium du milieu de culture. Ils ont montré que pour des concentrations de magnésium variant entre 5 et 10 mM, l'accumulation de tétracycline dans ces bactéries augmentait pour ensuite diminuer pour des concentrations variant entre 10 et 40 mM de magnésium. Cette situation nous a amenés à nous demander s'il fallait retenir ou non le magnésium sachant que la tétracycline ne peut être écartée du milieu de culture puisque son effet est très important sur la stabilité du pBT4. Il faut cependant rappeler que dans les études antérieures, nous avons montré que le magnésium exerçait un effet important à la fois sur la production de biomasse et de pectate lyase. Nous avons pris la décision d'inclure le magnésium à son niveau (+1) dans le milieu de culture.

A propos du glucose nos résultats confirment ceux de Noack *et al.* (1981). Ces auteurs ont montré que dans les conditions limitantes de glucose, l'efficacité de la réplication du pBR325 était réduite; ils ont suggéré une explication énergétique: en l'absence de glucose, selon eux, il y aurait limitation en ATP nécessaire à la synthèse de l'ADN faute de précurseurs. Au niveau du plasmide, l'initiation de la réplication se fait alors très mal. Cela conduit à une réduction du nombre de copies du pBR325 et qui, à la longue, se traduit par sa perte complète. La tétracycline exercerait une influence 4 fois supérieure à celle de l'ampicilline. Cette influence plus faible de l'ampicilline pourrait s'expliquer par l'action des β -lactamases produites par les cellules qui dégraderaient l'antibiotique (Dennis *et al.*, 1985).

Cette hypothèse est soutenue par le fait que dans l'étude de la localisation de la pectate lyase recombinante (Tableau 3), nous avons montré qu'*E. coli*

HB101(pBT4) produisait des β -lactamases qui se retrouvent concentrées dans l'espace périplasmique. Ce qui signifierait que la dégradation de l'ampicilline au niveau de l'espace périplasmique l'empêcherait d'exercer efficacement son rôle de pression de sélection comme la tétracycline sur le plasmide recombinant pBT4. En définitive, notre milieu de culture optimisé a la composition présentée dans le Tableau 19. Ce milieu sera alors utilisé pour les cultures d'*E. coli* HB101(pBT4) en fermenteur.

Ingrédients	g/l
Na ₂ HPO ₄	7,3
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
Extrait de caséine	5
Glucose	7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6
Tétracycline	0,01
Ampicilline	0,05
Tampon MOPS	5,3
Thiamine	0,002

Tableau 19. Composition définitive du milieu minimum

III. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'AERATION EN MILIEU MINIMUM.

Les micro-organismes sont très sensibles aux conditions environnementales et cette sensibilité se manifeste par des modifications de la physiologie et du métabolisme cellulaire (Hopking *et al.*, 1987; Iuchi et Lin, 1992). Nous avons cherché à savoir si le gène codant pour la pectate lyase isolée chez la bactérie anaérobie *B. thetaiotaomicron* 217 s'exprimait en

conditions anaérobies ou aérobies sachant qu'*E. coli* est une bactérie anaérobie facultative (Ryan *et al.*, 1989) dont certains gènes sont réprimés ou activés en fonction de l'oxygénation de leur environnement (Spiro, 1991). La culture en fermenteur de 2 litres de la bactérie recombinée, en anaérobiose (en présence de N_2/CO_2), et en aérobiose (en présence d'air), a montré que les meilleures conditions de croissance et de production de la pectate lyase sont réunies en aérobiose (Tableau 20).

Aération	Biomasse (g/l)	Pectate lyase (U/ml)
Anaérobiose	0,32	13,2
Aérobiose	1,1	165

Tableau 20. Niveaux de production de pectate lyase en aérobiose et en anaérobiose pour un débit de 1 vvm.

En présence d'air, les productions de biomasse et de pectate lyase au terme de 16 heures de culture sont respectivement 12 et 4 fois supérieures à celles observées lorsque la cellule est cultivée en présence de N_2/CO_2 . Le plasmide pBT4 étant aussi stable en anaérobiose, le problème se situerait au niveau de l'expression du gène et de la physiologie de la cellule. Alors une bonne croissance cellulaire est aussi une des conditions d'une meilleure production de l'enzyme. La variation du débit d'air dans le fermenteur a montré que la production de biomasse est meilleure avec le débit maximum soit 3 vvm (Tableau 21).

Débit d'air	Biomasse (g/l)	Pectate lyase (U/ml)
1 vvm	1,1	165
2 vvm	1,3	187
3 vvm	1,7	284

Tableau 21. Comparaison des niveaux de pectate lyase en fonction du débit d'air pour une agitation de 350 t/min.

Par ailleurs, pour augmenter le niveau de l'oxygène dissous, nous avons fait varier l'agitation à 350 et 500 t/min (Tableau 22).

Agitation (t/min)	Biomasse (g/l)	Pectate lyase (U/ml)
350	1,7	284
500	1,6	215

Tableau 22. Comparaison des niveaux de production de pectate lyase en fonction de l'agitation pour un débit d'air de 3 vvm.

La formation de mousse est toujours observée à 500 t/min et nécessite l'addition régulière d'antimousse. A 350 t/min, la formation de mousse est quasiment inexistante. De plus, avec les deux agitations, la production de biomasse est quasiment la même, avec une production d'enzyme plus importante à 350 t/min. Huang *et al.* (1990) ont étudié l'effet de l'intensité de l'agitation sur la production de biomasse en milieu minimum dans un fermenteur de 2 litres. Ils ont remarqué qu'une augmentation de la vitesse d'agitation du fermenteur entraînait une réduction de la biomasse cellulaire. Dans notre situation, nous observons aussi une faible diminution de la biomasse produite lorsque l'agitation est augmentée. Nous pensons que cette différence serait due à l'action de l'antimousse ajouté dans le fermenteur qui limite le transfert d'oxygène. Ces résultats montrent que l'oxygénation du milieu de culture et un bon transfert de l'oxygène entre le milieu et les cellules en culture sont des conditions importantes pour l'optimisation de la production de la pectate lyase par la souche d'*E. coli* HB101(pBT4).

En anaérobiose, la bactérie supporte la phosphorylation oxydative en utilisant un certain nombre d'accepteurs terminaux d'électrons (Jones et Gunsalus, 1985; Lin et Kuritzkes, 1987; Poole et Ingledew, 1987). De plus il est observé des changements significatifs dans le métabolisme du carbone. Le cycle de Krebs est modifié en une forme non cyclique par suite de la répression du complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase, du remplacement des succinate et pyruvate déshydrogénases respectivement par la fumarate

réductase et la pyruvate formate lyase (Spiro et Guest, 1991). La faible croissance cellulaire s'expliquerait par l'installation d'un métabolisme fermentatif avec production d'acides, principalement l'acétate, qui inhibent la croissance cellulaire (Landwall et Holme, 1977; Jensen et Carlsen, 1990).

IV. ETUDE DES CINETIQUES DE FERMENTATION.

Au cours de la culture, les conditions environnementales sont soumises à d'incessantes variations. C'est ainsi que les éléments constitutifs du milieu de culture s'épuisent parallèlement à une accumulation de produits du métabolisme s'accompagnant de l'inhibition de la croissance cellulaire. La connaissance des modifications du milieu de culture permettra de pallier à l'épuisement de certains éléments ou d'éliminer les métabolites éventuellement toxiques en vue de prolonger la croissance cellulaire. Avec les conditions d'agitation et d'aération respectivement de 350 t/min et 3 vvm et à pH constant (pH 7,0) et en présence d'antibiotiques (Amp + Tc), nous avons analysé la stabilité structurale et l'évolution du contenu plasmidique au cours de la fermentation (Figure 12) à différents temps de culture (8, 12, 16, 20 et 24 heures).

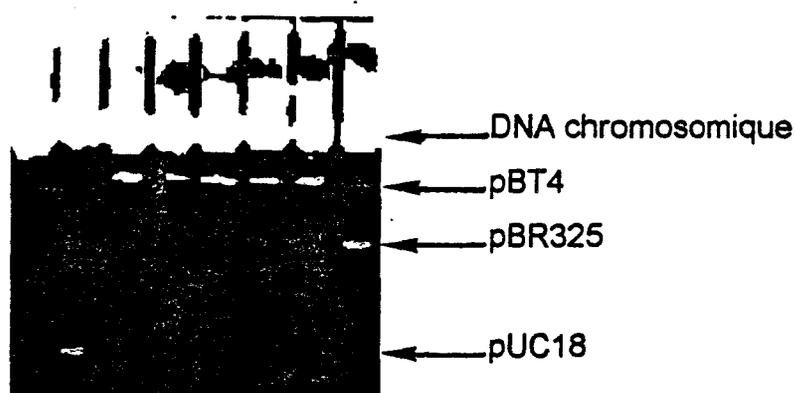


Figure 12. Evolution de la concentration du pBT4 à l'intérieur de la cellule au cours de la fermentation. Les puits 2; 3; 4; 5; 6 contiennent le pBT4 respectivement aux temps 8,12, 16, 20 et 24 heures. Les puits 1 et 7 contiennent respectivement le pBR325 et le pUC18.

Sur cette photo, nous n'observons pas une variation de migration du pBT4 à ces différents temps de culture. Cela montre qu'il n'y a pas d'instabilité

structurale apparente du pBT4 au cours de la fermentation. Ce qui signifierait que toute diminution dans la productivité de la cellule recombinée ne peut être attribuée à une délétion d'une portion du plasmide recombinant. L'analyse par densitométrie des intensités des bandes de migration du pBT4, à ces différents temps de culture, a montré une similitude dans les densités de chacun des puits de migration. Cela démontre une stabilité dans le contenu plasmidique au cours des 24 heures de fermentation. Le matériel génétique étant hors de cause dans une faible production de la pectate lyase, nous nous sommes intéressés à l'étude des cinétiques de fermentation (Figure 13).

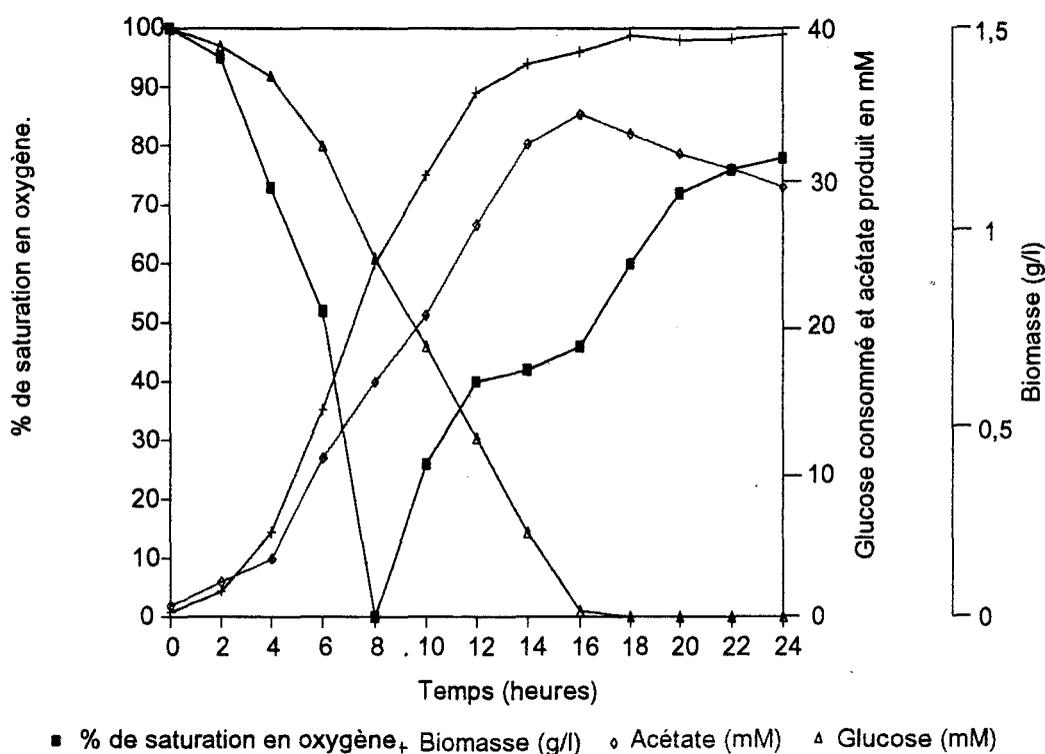


Figure 13. Etude des cinétiques de consommation de l'oxygène dissous, du glucose, de la production de biomasse, et de l'acétate.

Au terme de 8 heures de culture, le niveau de l'oxygène dissous atteint zéro. La totalité du glucose est consommée au terme de 16 heures de culture. Nous observons une production croissante d'acétate présentant un maximum de 2,8 g/l accompagnée d'une inhibition de la croissance. Par ailleurs, la concentration du magnésium demeure pratiquement constante, tandis que celle des ions ammonium devient pratiquement nulle au bout de 18 heures

(Figure 14). Ainsi, la combinaison de la consommation du glucose, de l'oxygène et des sels d'ammonium et de la production de métabolites tels que l'acétate, serait probablement l'une des causes de l'inhibition de la croissance d'*E. coli* HB101(pBT4). En culture aérobie, de nombreux auteurs ont montré que plusieurs souches d'*E. coli* transformées sécrétaient des acides organiques dont l'acétate est quantitativement le plus important (Mori *et al.*, 1979; Pan *et al.*, 1987; Yee et Blanch, 1993).

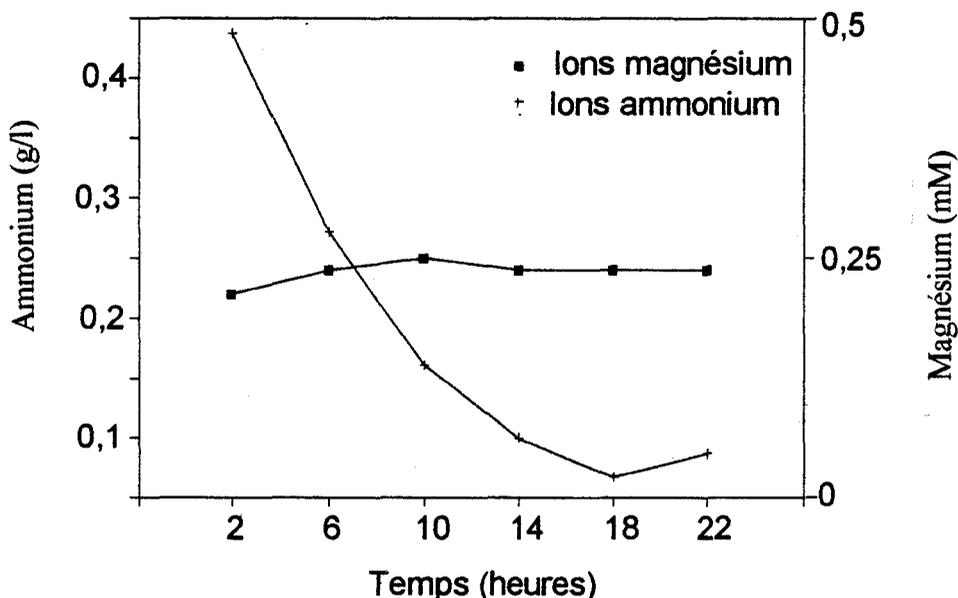


Figure 14. Cinétiques de consommation des ions ammonium et magnésium.

Il a été mentionné une corrélation entre la production d'acétate, la réduction de la croissance cellulaire et la production des protéines recombinantes (Brown *et al.*, 1985; Bech et Carlsen, 1990). La production d'acétate pourrait être attribuée à plusieurs causes pouvant agir individuellement ou en synergie. Il s'agit, par exemple, du déséquilibre entre le métabolisme du glucose et la respiration (Andersen et Meyenburg, 1980), lorsque le flux de carbone à l'intérieur de la cellule est supérieur à la demande cellulaire pour les réactions de biosynthèse (El Mansi et Holms, 1989), lors de la répression des enzymes du cycle de Krebs (Amarasingham et Davis, 1965; Gray *et al.*, 1966), enfin lors du découplage du métabolisme (Smirnova et Oktyabbr'skii, 1985). Dans ces conditions, une optimisation de la production de la pectate lyase en fermenteur passera obligatoirement par la limitation de la production d'acétate au cours de la culture. Il faudra aussi s'assurer qu'aucun substrat important (oxygène,

source de carbone, d'azote etc...) n'est limitant ou ne se retrouve en excès. Nos études ont montré que l'acétate était produit par la cellule transformée même en culture aérée.

Il faut souligner qu'à partir de 16 heures de culture la concentration en acétate du milieu de culture diminue de 0,4 g soit une assimilation de l'ordre de 0,05 g/heure accompagnée d'une production de biomasse de l'ordre de 0,021 g/l en 8 heures. Cette production est de l'ordre de 0,65 g/l de biomasse en moyenne, pour aussi 8 heures de culture, lorsque le glucose est assimilé. Cette réutilisation de l'acétate par la cellule recombinée influence très faiblement la production de biomasse et entraîne une forte réduction de la production de pectate lyase.

	Consommation nette			Production nette	
	(0-4) h	(4-16) h	(16-24) h	(0-16) h	(16-24) h
Glucose (g/l)	0,13	0,54	ND	ND	ND
Acétate (g/l)	ND	ND	0,1	0,17	ND
Biomasse (g/l)	ND	ND	ND	1,35	0,02

Tableau 23 : Consommation et production nettes de glucose, de biomasse ou d'acétate par *E. coli* HB101(pBT4).

Ces résultats confirment ceux de Brown *et al.*, 1985 et de Bech et Carlsen, 1990. Luli et Strohl (1990) ont suggéré une explication de l'inhibition de la production de biomasse et des enzymes par l'acétate; ils l'attribuent essentiellement à une modification du pH intracellulaire due à l'incorporation de la forme protonée de l'acétate. L'acétate peut se trouver en effet sous deux états: la forme ionique (CH_3COO^-) et la forme protonée (CH_3COOH). Cette dernière forme (CH_3COOH) lipophile peut passer à travers les membranes lipidiques et se retrouver à l'intérieur des cellules où elle se dissociera pour libérer les ions H^+ . Sachant que de nouvelles molécules d'acétate continuent de se former, il s'établit un gradient constant d'ions H^+ vers l'intérieur cellulaire qui se traduit par une baisse du pH intracellulaire (Respaske et Adler, 1981). Cette situation va entraîner une intensification des réactions du mécanisme

homéostatique pour réajuster le pH entraînant un découplage du métabolisme général (Smirnova et Oktyabbr'skii, 1988).

VII. ESSAIS DE FED-BATCH

Au cours de l'étude des modifications survenant dans le milieu de culture au cours de la fermentation, nous avons remarqué qu'après 8 h de culture les concentrations de glucose et de sels d'ammonium étaient réduites de moitié. Nous avons pensé que ramener ces concentrations à leur niveau de départ améliorerait la production d'enzyme et de biomasse.

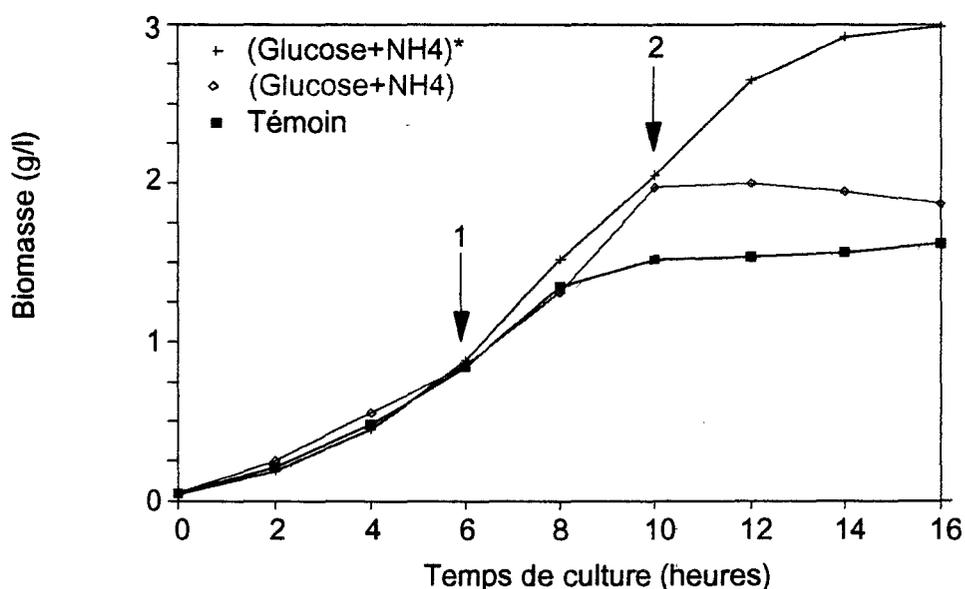


Figure 15. Croissance d'*E. coli* HB101(pBT4) en fonction de l'apport de substrat et de la variation de température. 1 et 2 indiquent respectivement les temps d'addition du mélange (Glucose + NH₄Cl) et la commutation de la température.

Milieux	Biomasse (g/l)	Acétate (g/l)	Pectate lyase (U/ml)
Milieu minimum	1,6	3,3	201
Milieu minimum + (Glucose + NH ₄ Cl)	1,8	5	89
Milieu minimum + (Glucose + NH ₄ Cl) *	3	5,8	96

Tableau 24. Influence de l'addition du mélange (Glucose + NH₄Cl) sur la fermentation d'*E. coli* HB101(pBT4). * indique la fermentation ayant subi une modification de température de 30°C à 37°C.

Les essais réalisés (Figure 15 et Tableau 24), montrent que l'addition du mélange (glucose + NH_4Cl) diminuait la production de l'enzyme de plus de 50% par rapport à la culture témoin. Toutefois, on observe une augmentation de la production de biomasse de 12%. Lorsque, dans ces conditions, la culture après addition du mélange (glucose + NH_4Cl) subit une modification de température (de 30°C à 37°C), il y a une augmentation de 47% de la production de biomasse suivie d'une inhibition de la production de la pectate lyase d'environ 50% par rapport à la culture témoin.

De ces résultats, on peut conclure que l'addition du mélange (glucose + NH_4Cl) dans ces conditions n'est pas une bonne stratégie pour améliorer la production de la pectate lyase. Il semblerait que nous nous trouvions dans des conditions d'excès de glucose ou de substrats tels que l'ammonium entraînant une production plus importante d'acétate par la souche d'*E. coli* HB101(pBT4). Cette hypothèse peut être avancée comme une explication probable de la réduction de la production de pectate lyase. D'autre part, on pouvait s'attendre au fait que la production de biomasse, suite à la variation de température, s'accompagnerait d'une augmentation de la production de pectate lyase. En fait, ce n'est pas le cas. Face à ces différentes observations, confirmant celles de Brown *et al.* (1985), Bech et Calsen (1990) et Yee et Blanch (1993), la stratégie consiste à réduire la production de l'acétate qui constitue un facteur limitant dans l'optimisation de la production de pectate lyase en fermenteur. Plusieurs stratégies peuvent alors être développées: éliminer continuellement l'acétate produit dans le milieu de culture, bloquer la voie métabolique de production de l'acétate ou encore provoquer une réutilisation de l'acétate comme source de carbone par la cellule recombinée. Dans le développement de stratégies devant nous permettre de réduire les concentrations d'acétate des fermenteurs, seules les deux dernières approches seront expérimentées et nous comparerons les résultats obtenus en terme de production de biomasse et de pectate lyase afin de retenir celle qui conviendrait le mieux au but recherché, à savoir l'augmentation de la production de l'enzyme recombinante.

VI. DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES POUR LIMITER LA PRODUCTION D'ACETATE.

De nombreux auteurs ont observé la production et la sécrétion d'acides organiques, parmi lesquels l'acétate est prédominant, durant la culture d'*E. coli* aussi bien en conditions aérobie que qu'en anaérobie, en présence de différentes sources de carbone (Yee et Blanch, 1993). Les conditions physiologiques dans lesquelles on assiste à la production d'acétate chez *E. coli* sont nombreuses et bien connues; ce sont au cours d'une croissance rapide d'*E. coli* en présence d'excès de source de carbone (Hollywood *et al.*, 1976); de la limitation en oxygène (Landwall et Holme, 1977); d'une forte pression partielle en dioxyde de carbone (Pan *et al.*, 1987) et de présence d'ions métalliques (Reiling *et al.*, 1985). Ces situations conduisent à une limitation de la croissance cellulaire d'une part et une réduction de la production des protéines recombinantes chez la cellule transformée d'autre part (Brown *et al.*, 1985; Bech et Calsen, 1990). Dans ces conditions, il convient de développer des stratégies pour limiter ou minimiser la production d'acétate et nous nous sommes intéressés à deux stratégies

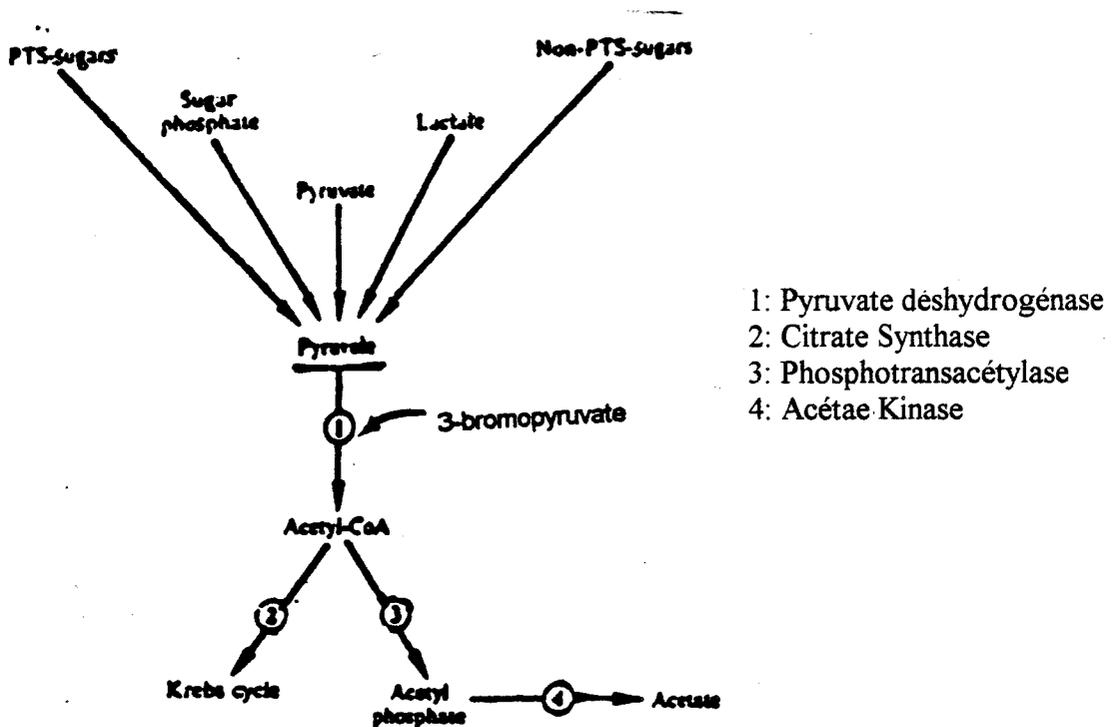


Figure 16. La voie de production de l'acétate à partir du pyruvate chez *E. coli* d'après El-Mansi et Holms (1989)

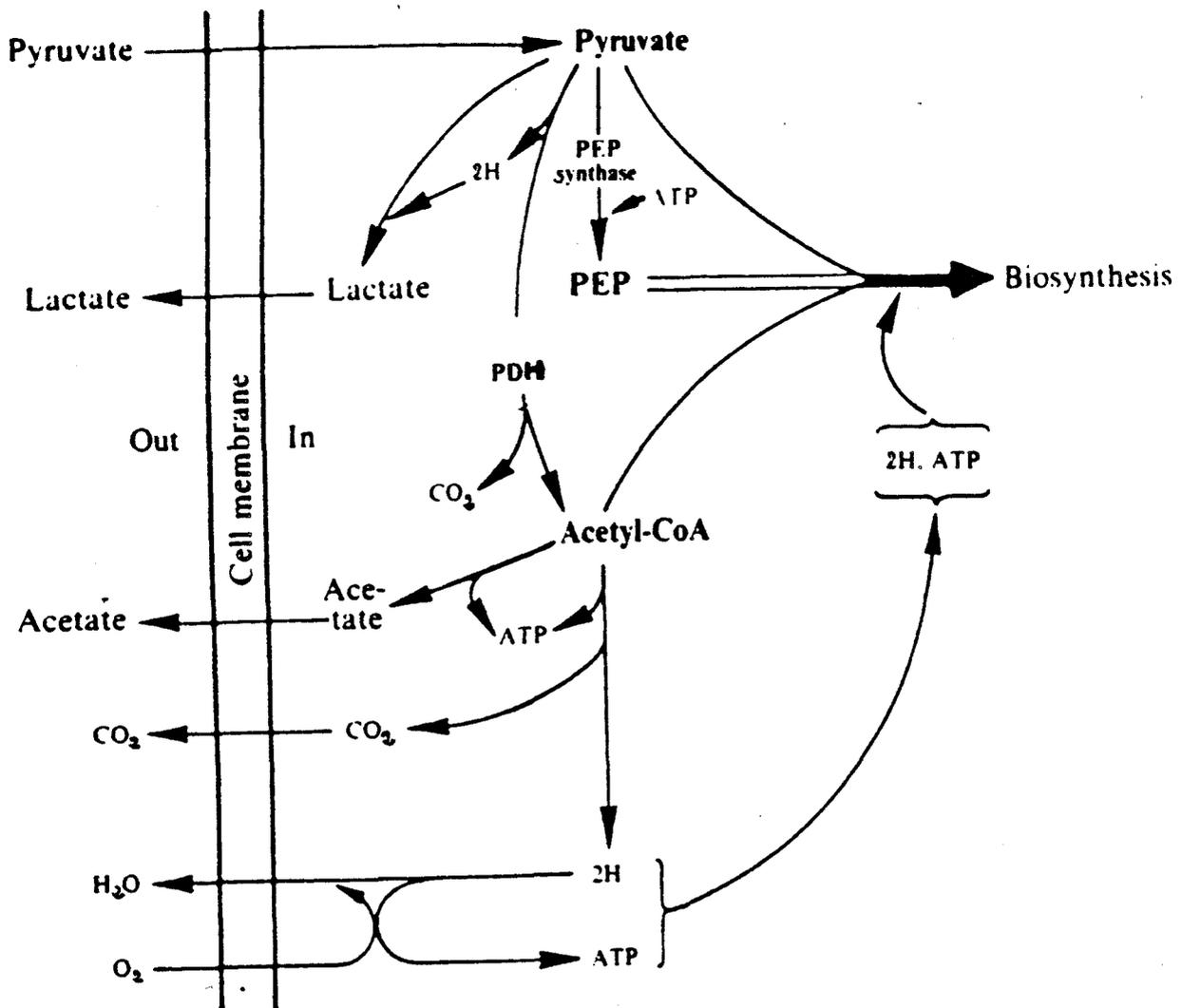


Figure 17. Les différentes étapes de conversion du pyruvate dans la production d'acétate et d'ATP au cours de la croissance d'*E. coli* en présence de pyruvate d'après El-Mansi et Holms (1989).

La première est l'addition de l'extrait de levure dans le milieu de culture. L'extrait de levure permettra à la cellule d'utiliser comme source de carbone l'acétate, réduisant ainsi sa concentration dans le milieu de culture. La deuxième stratégie utilisera le 3-bromopyruvate, un inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase qui est un complexe multi-enzymes constitué de plusieurs copies de trois enzymes: la pyruvate décarboxylase, la lipote acétyltransférase et la dihydrolipoamine déshydrogénase (Lowe et Perham, 1984). La pyruvate déshydrogénase intervient dans la transformation du

pyruvate (Figures 16 et 17) en acétyl-CoA qui est ensuite converti en acétate (El Mansi et Holms, 1989). La pyruvate décarboxylase catalyse la décarboxylation du pyruvate en utilisant comme cofacteur principal la thiamine pyrophosphate. Le bromopyruvate inhibe la sous-unité pyruvate décarboxylase qui a pour conséquence d'inhiber l'ensemble du complexe. Il s'ensuit la suppression de la voie de production de l'acétate. L'utilisation de cette stratégie devrait nous permettre de réduire la concentration de l'acétate dans le milieu de culture.

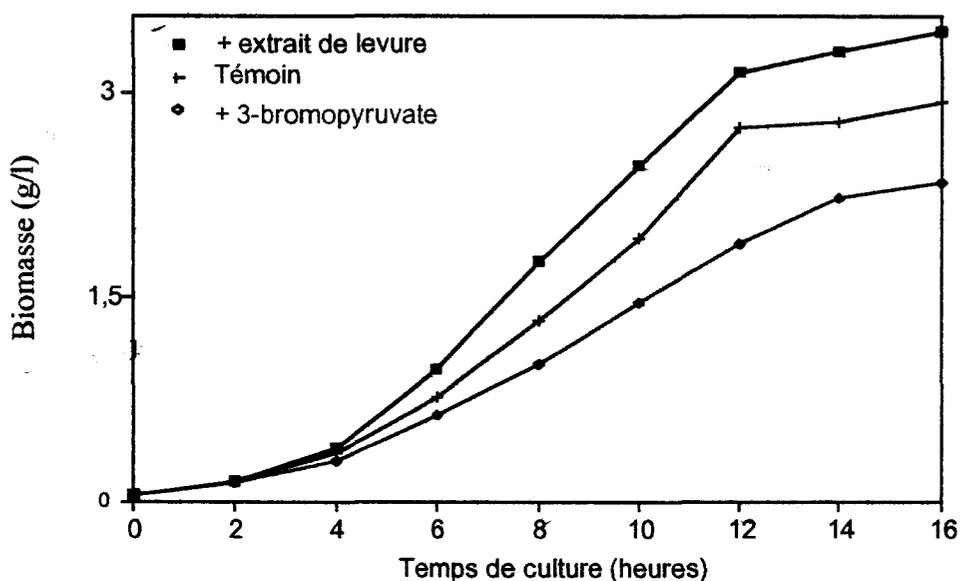


Figure 18. Croissance d'*E. coli* HB101 en présence d'extrait de levure ou du 3-bromopyruvate.

Milieux	Biomasse (g/l)	Acétate (g/l)	Pectate lyase (U/ml)
Milieu minimum	2,9	3,5	380
Milieu minimum + 3-bromopyruvate	2,3	1,2	60
Milieu minimum + Extrait de levure	3,7	1	670

Tableau 25. Influence respective de l'extrait de levure et du 3-bromopyruvate sur la souche d'*E. coli* HB101(pBT4). L'extrait de levure et le 3-bromopyruvate sont apportées respectivement aux concentrations de 1 g/l et 50 mM.

Les résultats résumés dans la Figure 18 et le Tableau 25 montrent que l'extrait de levure entraîne une augmentation de la densité cellulaire et de la production de pectate lyase respectivement de 27% et 71% accompagnée d'une réduction de la production de l'acétate de 83% par rapport à la culture témoin. Le 3-bromopyruvate, par contre, occasionne une réduction à la fois de la densité cellulaire des productions d'acétate et d'enzyme respectivement de 21%, 73% et 84%, toujours par rapport à la culture témoin. Ces résultats montrent que l'extrait de levure s'avère être un élément influent. L'addition de l'extrait de levure à des concentrations même faibles nous éloigne de notre objectif initial à savoir optimiser la production de l'enzyme recombinante en milieu minéral. Plusieurs auteurs (Xiaoli *et al.*, 1990; Nancib *et al.*, 1991) se sont penchés sur la question de savoir comment l'extrait de levure pouvait améliorer les performances de la production d'enzymes recombinantes en fermenteur. Xiaoli *et al.* (1990) dans l'étude de la production de la β -galactosidase par *E. coli* ont montré que l'extrait de levure agissait au niveau de l'initiation de la transcription et de la traduction. Nancib *et al.* (1991) ont montré qu'il a une action synergique entre les vitamines et les autres constituants (organiques et minéraux) de l'extrait de levure sur l'assimilation de l'acétate. L'utilisation du 3-bromopyruvate provoque une réduction de la production de biomasse. Cette réduction serait due à l'inhibition de la voie de production de l'ATP. Cet ATP faisant défaut provoque un ralentissement du métabolisme cellulaire se traduisant par une diminution de la production de biomasse de 20% et de pectate lyase recombinante de 67%.

Finalement des deux stratégies utilisées, il est possible de dire que l'apport d'extrait de levure dans le milieu minimum est souhaitable contrairement au 3-bromopyruvate, bien que nous nous écartions ainsi d'un milieu minimum pour passer à un milieu semi-synthétique. Il est certain que l'extrait de levure présente un avantage sur la production de la pectate lyase en fermenteur par la souche transformée d'*E. coli* HB101(pBT4).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De nombreux gènes appartenant aux micro-organismes anaérobies impliqués dans les phénomènes de virulence et de dégradation des polysaccharides ont fait, ces dernières années, l'objet de transfert chez différentes souches d'*E. coli* (Joncquiert *et al.*, 1991; Gang-Ping Xue *et al.*, 1992; Tierny *et al.*, 1994). Les techniques de clonage de gènes ont augmenté la gamme de produits qu'il est possible de produire à l'aide d'une fermentation industrielle. Elles ont créé la possibilité d'introduire de nouvelles informations génétiques dans les écosystèmes naturels, là où un nouveau produit génétique ou une nouvelle voie métabolique peut avoir un effet considérable, même lorsque le niveau d'expression des gènes est suffisamment limité (Teather, 1985).

Bien sûr après clonage des gènes, il serait intéressant de voir comment améliorer leur niveau de production par la cellule recombinante. C'est dans cette optique que nous avons fait une étude des conditions de culture d'*E. coli* HB101(pBT4) afin d'optimiser la production de pectate lyase. Dans un premier temps nous avons entrepris l'étude de l'optimisation de la composition d'un milieu minimum de culture en nous servant d'expériences factorielles complétées par la méthode d'isoréponse de Doehlert (1970). Nous avons montré que l'extrait de caséine, le glucose et le magnésium agissent en synergie pour augmenter la production de biomasse et de pectate lyase en présence de tampon MOPS, de tétracycline et d'ampicilline. Cette production de biomasse et de pectate lyase est fortement inhibée par l'acétate produite par *E. coli* HB101(pBT4). L'étude des caractéristiques de croissance de différentes souches d'*E. coli* par Luli et Strohl (1990) a fait apparaître que le comportement d'une souche à l'autre souche variait énormément dans les mêmes conditions de fermentation. Ces auteurs ont montré que les souches B et JM105 accumulaient quatre fois moins d'acétate et produisaient trois fois plus de biomasse comparativement à la souche HB101. Il serait peut être intéressant de changer de souche et d'introduire le pBT4 chez les souches d'*E. coli* B ou JM105 afin de comparer leurs niveaux de production de biomasse et de pectate lyase avec ceux de la souche HB101 que nous avons utilisée.

Dans le laboratoire, un gène de *B. thetaiotaomicron* 217 codant pour la pectine méthylestérase a été isolé et cloné chez *E. coli* HB101(pBT3). Comme autre perspective, il serait possible de tester le niveau de production de cette

enzyme lorsque la souche d'*E. coli* HB101(pBT3) est cultivée sur le milieu minimum optimisé afin de savoir si les mêmes facteurs influents sur la production de pectate lyase le sont aussi sur celle de pectine méthylestérase. Les substrats les plus consommés sont le glucose, les sels d'ammonium et l'oxygène combiné de l'aération et de l'agitation, l'addition du mélange (glucose + NH₄Cl) entraîne une diminution de la production de pectate lyase bien qu'il y ait une augmentation de la production de biomasse. L'étude des modifications de l'environnement culturel d'*E. coli* HB101(pBT4) dans ces conditions a montré une forte production d'acétate qui est un inhibiteur potentiel à la fois de la croissance cellulaire (Landwall et Holme, 1977; Mori *et al.*, 1979; Luli et Strohl, 1990) et de la production des protéines recombinantes par les cellules (Jensen et Carlsen, 1990). Deux approches différentes, l'une utilisant le 3-bromopyruvate et l'autre l'extrait de levure ont été appliquées pour réduire l'acétate dans le fermenteur. Seul l'extrait de levure semble le mieux répondre à nos besoins. Nous avons montré que l'extrait de levure entraînait une réduction de l'acétate et une augmentation de la production de biomasse d'*E. coli* HB101(pBT4) et de pectate lyase. Il semblerait que l'extrait de levure favorise l'assimilation de l'acétate par la cellule recombinée (Nancib *et al.*, 1991). Alors, il serait intéressant d'analyser les éléments contenus dans l'extrait de levure qui confèrent à la cellule recombinée cette nouvelle propriété de métaboliser efficacement l'acétate dans le sens d'une meilleure production de biomasse et de pectate lyase.

Ce travail nous a permis d'augmenter la production de la pectate lyase par *E. coli* HB101(pBT4) par paliers successifs. Nous sommes partis d'une production inférieure à 10 U/ml de culture pour aboutir à 152 puis à 210 U de pectate lyase par millilitre de culture en Erlenmeyer agité à l'aide de plans d'expériences complémentaires (Box-Wilson, 1951 et Doehlert, 1970). En fermenteur, nous sommes arrivés à produire 670 U/ml de l'enzyme recombinante en favorisant l'assimilation l'acétate par *E. coli* HB101(pBT4). En définitive nous sommes arrivés, en agissant uniquement sur les conditions de culture, à multiplier par environ 67 les performances de la cellule recombinée.

BIBLIOGRAPHIE

Noting
325 202-21

- Aiba, S., Nagai, S. and Nishzawa, Y.** 1976. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: A perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1001-1016.
- Aiba, S. and Koizumi, J.** 1984. Effects of temperature on plasmid stability and penicillinase productivity in transformant of *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:1023-1031.
- Aiba, S., Zhang, M., Ohnishi, M. and Koizumi, J.** 1986. Production of α -amylase in transformant of *Bacillus stearothermophilus*: Improvement of recombinant plasmid that can be used at higher temperature. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:978-982.
- Albersheim, P. Neukon, H. and Deuel, H.** 1960. Splitting of pectin molecules in natural solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **90**:45-47.
- Albert, A. and Rees, C.W.** 1956. Avidity of tetracycline for the cations of metals. *Nature* **177**:433-434.
- Allen, S.P., Polazzi, J.O., Gierse, J.K. and Easton, A.M.** 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:6938-6947.
- Amarsingham, C. J. and Davis, B.D.** 1965. Regulation of α -ketoglutarate deshydrogenase formation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **240**:3664-3668.
- Andersen, K.B and Meyenburg, K.V.** 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* limited by respiration? *J. Bacteriol.* **144**:114-123.
- Arima, K. and Izaki, K.** 1963. Accumulation of oxytetracycline relevant to its bactericidal action in the cells of *Escherichia coli*. *Nature* **200**:192-193.
- Bailey, M.J. and Pessa, E.** 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**:266-271.
- Ball, P.R., Chopra, I. and Eccles, S.J.** 1977. Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**:1500-1507.
- Barras, F. Thurn, K.K. and Chatterje, A.K.** 1987. Resolution of four pectate lyases structural genes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**:319-325.
- Bauer, S. and Shiloach, J.** 1974. Maximal exponential growth rate and yield of *Escherichia coli* obtainable in bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **16**:933-914.

- Bauer, S. and Ziv, E.** 1976. Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **18**:81-84.
- Bech, E.J. and Carlsen, S.** 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli* : expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnol. Bioeng.* **36**:1-11.
- Bissanger, H.** 1981. Substrate specificity of pyruvate deshydrogenase complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **25**:8115-8122.
- Bocquet, J.** 1988. Généralités sur les micro-organismes. Dans *Biotechnologie*. Troisième édition. Edit. Scriban, R. Lavoisier, Paris., pp. 13-65.
- Boe, L., Gerdes, K. and Molin, S.** 1987. Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **169**:4646-4650.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greenes, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W, Crosa, J.H. and Falkow.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
- Box, G.E.P and Wilson, K.G.** 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J.R.Soc. Ser B* **13**:1-45.
- Brock, T.D.** 1962. Effects of magnesium ion deficiency on *Escherichia coli* possible relation to the mode of action of novobiocin. *J. Bacteriol.* **84**:679-682.
- Brock, T.D. and Madigan, M.T.** 1988. Growth and its control. in *Biology of micro-organisms*. Fifth edition. Prentice-Hall. International edition.
- Brown, S.W., Meyer, H.P. and Fiechter, A.** 1985. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**:5-9.
- Brownlie, L., Stephenson, J.R and Cole, J.A.** 1990. Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* (pAT153). *J. Gen. Microbiol.* **136**:2471-2480.
- Canivez, O.** 1990. Les bactéries anaérobies vers les nouvelles voies métaboliques. *Biofutur* **86**:22-29.
- Caunt, P., Impoolsup, A. and Greenfield, P.F.** 1989. The effect of oxygen limitation on stability of recombinant plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **11**:5-10.

- Chatterjee, A.K., Buchanan, G.E., Behrens, M.K. and Starr, M.P.** 1979. Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia* and *Klebsiella* species. *Can. J. Microbiol.* **25**:95-102
- Cheah, U.E., Weigand, W.A. and Stark, B.C.** 1987. Effects of recombinant plasmid size on cellular process in *Escherichia coli*. *Plasmid* **18**:127-134.
- Chiang, C.S. and Bremer, H.** 1988. Stability of pBR322-derived plasmids. *Plasmid* **20**:207-220.
- Cloud, P.** 1983. La biosphère. Pour la Science. Novembre:138-150.
- Collmer, A. Schoedel, C., Roeder, D.L. and Ried J.** 1985. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase. *J. Bacteriol.* **161**:913-920.
- Collmer, A. and Keen, N.T.** 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**:387-409.
- Courrieu, G.** 1975. Contribution à l'étude des problèmes de mesure du transfert de l'oxygène en fermentation; réalisation d'un régulateur automatique de la concentration en oxygène dissous. Thèse de Docteur Ingénieur. Dijon.
- Cunnigham, P.R. and Clark, D.P.** 1986. The use of suicide substrates to select mutants of *Escherichia coli* lacking enzymes of alcohol fermentation. *Mol. Gen. Genet.* **205**:487-493.
- Da Silva, A.N. and Bailey, J.E.** 1986. The theoretical growth yield estimates for recombinant cells. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:741-747.
- De Meo, M., Laget, M., Phan-Tan-Luu, R., Mathieu, D. and Dumenil, G.** 1985. Applications des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. *Bio-Sciences* **4**:99-102.
- Dennis, K., Srienc, F. and Bailey, J.E.** 1985. Ampicillin effects on five recombinant *Escherichia coli* strains: Implications for selection pressure design. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1490-1494.
- Diaz-Ricci, J.C., Hitzmann, B., Rinas, U. and Bailey, J.E.** 1990. Comparative studies of glucose catabolism by *Escherichia coli* grown in a complex medium under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnol. Prog.* **6**:326-332.
- Dinçbas, V., Hotençsu, A. and Camurdan, A.** 1993. Plasmid stability in immobilized mixed cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **9**:218-220.



- Doehlert, H.** 1970. Uniform shell designs. *Appl. Stat.* **19**:231-239.
- Donnelly, P.K. and Crawford, D.L.** 1988. Production by *Streptomyces viridosporus* T7A of an enzyme which cleaves aromatic acids from lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2237-2244.
- Dumenil, G., Mattei, G., Sergent, M., Bertrand, J.C. Laget, M and Phan-Tan-Luu, R.** 1988. Application of Doehlert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:405-409.
- Dwivedi, C.P., Imanaka, T. and Aiba, S.** 1981. Instability of plasmid-harboring strain of *Escherichia coli* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **24**:1465-1468.
- Eagle, H.** 1971. Buffer combinations for mammalian cell culture. *J. Bacteriol.* **60**:17-28.
- Eggen, R.I.K., Geerling, A.C.M., Boshoven, A.B.P. and De Vos, W.N.** 1991. Cloning, sequence analysis, and functional expression of the acetyl coenzyme A synthetase gene from *Methanotherx soehngeni* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:6383-6389.
- El Alami, N., Boquien, C.Y. and Corrieu, G.** 1992. Batch cultures of recombinant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in stirred fermentor. Effect of plasmid content on bacterial growth and on genetic stability in pure cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:358-363.
- El-Mansi, E.M.T. and Holms, W.H.** 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2875-2883.
- Evans, W.C.** 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:289-317.
- Favey, S.** 1991. Etude de la pectate lyase de point isoélectrique acide, PLa et d'une homoprotéine PecX de la souche 3937 d'*Erwinia chrysanthemi*. Thèse de doctorat. Université de Paris XI, Orsay.
- Fayet, O. and Prere, M.F.** 1987. Method for localization of cloned DNA fragments on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **169**:5641-5647.

- Fiksdal, L., Maki, J.S., Lacroix, S.J. and Staley, J.T.** 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:148-150.
- Forsberg, C.W., Crosby, B. and Thomas, D.Y.** 1986. Potential for manipulation of the rumen fermentation through the use of recombinant DNA technics. *J. Anim. Sci.* **63**:310-325.
- Frittrang, A.K., Deising, H. and Mendgen, K.** 1992. Characterization and partial purification of pectinesterase, a differentiation-specific enzyme of *Uromyces Viciae-fabae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2213-2218.
- Fujii, M. and Kawamura, Y.** 1985. Synergic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:260-265.
- Galvez-Marisca, A. and Lopez-Munnguia, A.** 1991. Production and characterization of dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:327-331.
- George, H.A., Powell, A.L., Dahlgren, M.E., Herber, W.K., Maigetter, R.Z., Burgess, B.W, Stirdivant, S.M., Greasham, R.L.** 1992. Physiological effects of TGF α -PE40 expression in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 437-445.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B and Molin, S.** 1986. Novel type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3116-3120.
- Gill, C. O. and Phillips, D. M.** 1985. The effect of media composition on the relationship between temperature and growth rate of *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* **2**:285-290.
- Gong, J., Lo, R. Y. C. and Forsberg, C. W.** 1989. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of cellodextrinase gene from *Bacteroides succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:132-136.
- Goupy, J.** 1988. La méthode des plans d'expériences: Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats. Editeur Dunod. Paris.
- Gradel, C.M. and Dehority, B.A.** 1972. Fermentation of isolated pectin from forages by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **23**:332-340.

- Gray, C.T., Wimpenny, J.W.T. and Mossman, M.R.** 1966. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **117**:33-41.
- Griffoll, M., Casellas, M., Bayona, J.M. and Solanas, A.M.** 1992. Isolation and characterization of fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidizing and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2910-2917.
- Gu, M.B., Jung, K.H., Park, M.H., Shin, K.S. and Kim, K.H.** 1989. Production of HBsAg by growth rate control with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch. *Biotechnol. Lett.* **11**:1-4.
- Guiney, D.G., Hasegawa, P. and Davis, C.E.** 1984. Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: Differential expression of antibiotic resistance phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7203-7205.
- Harmon, J. Svoronos, S.A. and Lyberatos, G.** 1987. Adaptive steady-state optimisation of biomass productivity in continuous fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:335-344.
- Henry, K.L, Davis, H.R. and Taylor, A.L.** 1990. Continuous recombinant bacterial fermentations utilizing selective flocculation and recycle. *Biotechnol. Prog.* **6**:7-12.
- Herendeen, S.L., Van Bogelen, R.A. and Neudhardt, F.C.** 1979. Levels of proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**:185-194.
- Hollywood, N. and Doelle, H.W.** 1976. Effect of specific growth rate and glucose concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture. *J. Gen. Microbiol.* **103**: 353-358.
- Hopkins, D., Betenbaugh, M. and Dhurjati, P.** 1987. Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *Escherichia coli* containing plasmid pKN401. *Biotechnol. Bioeng.* **19**:85-91.
- Huang, J., Dhulstre, P., Thomas, D. and Barbotin, J.N.** 1990. Agitation rate on plasmid stability in immobilized and free-cell continuous culture of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**:933-939.

- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H. and Robert-Baudouy, J.** 1992. Environmental conditions effect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **174**:7807-7818.
- Hungate, R.E.** 1985. Anaerobic biotransformation of organic matter from bacteria in nature. Vol. 1, edited by Leadbetter, E.R. and Poindexter, J.S. Plenum Publishing Corporation.
- Iijima, S., Kai, K., Mizutani, S. and Kobayashi, T.** 1986. Effects of nutrients on α -amylase production and plasmid stability in fed-batch culture of recombinant bacteria. J. Chem. Tech. Biotechnol. **36**:539-546.
- Iuchi, S. and Lin, E.C.C.** 1992. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**:3972-3980.
- Jauneau, A., Morvan, C., Fenyo, J.C. and Demarty, M.** 1988. Pectate lyase production by *Bacillus subtilis* in membran bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. **29**:234-238.
- Jayarama, S., Bennett, R.B. and Gunasekaran, M.** 1992. Influence of nutritional factors on growth and hydrolytic enzyme production in *Nocardia asteroides*. Microbios **70**:151-161.
- Jensen, N.S. and Canale-Parola, E.** 1985. Nutritionally limited pectinolytic bacteria from human intestin. Appl. Environ. Microbiol. **50**:172-173.
- Jensen, N.S. and Canale-Parola, E.** 1986. *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov. two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. **52**:880-887.
- Jensen, E.B. and Carlsen, S.** 1990. Production of recombinant human growth hormon in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. Biotechnol. Bioeng. **36**:1-11.
- Jones, H.M. and Gunsalus, R.P.** 1985. Transcription of *Escherichia coli* fumarate reductase genes (*frdABCD*) and their coordinate regulation by oxygen, nitrate, and fumarate. J. Bacteriol. **164**:1100-1109
- Jones, P.G., Van Boegelen, R.A and Neidhardt, F.C.** 1987. Induction of proteins response to low temperature in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**:2092-2095.

- Joncquiert, J.C., Béchet, M., Tierny, Y., Courtois, J., Dubourguier, H.C. and Guillaume, J.B.** 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of dextranase genes from *Bacteroides thetaiotaomicron*. FEMS Microbiol. Lett. **84**:273-278.
- Jung, G. Denèfle, P. , Mayaux, J.F.** 1988. High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin 1-b. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. **139**:129-146.
- Kane, J.F. and Hartley, D.L.** 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. **6**:95-101.
- Kapralek and Jecmen, P.** The structural stability of an expression plasmid bearing a heterologous cloned gene depends on whether this gene is expressed or not. Biotechnol. Lett. **14**:251-256.
- Karbassi, A and Luh, B.S.** 1979. Some characteristics of endo-pectate lyase produced by thermophilic *Bacillus* isolated from olives. J. Food Sci. **44**:1156-1161.
- Keen, N.T., Dahlbeck, D. , Staskawicz, B. and Besler, W.** 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **168**:595-606.
- Khosravi, M., Ryan, W., Wester, D.A. and Stark, B.** 1990. Variation of oxygen requirement with plasmid size in recombinant *Escherichia coli*. Plasmid **23**:138-143.
- Kim, B.G.** 1990. A structured, segregated model for genetically modified *Escherichia coli* cells and its use for prediction of plasmid stability. Biotechnol. Bioeng. **36**:581-592.
- Kim, J.Y and Ryu, D.D.Y.** 1991. The effects of plasmid content, transcription efficiency, and translation efficiency on the productivity of a cloned gene protein in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. **38**: 1271-1279.
- Kirk, K.T., Croan, S., Tien, M., Muthag, K.E. and Farrell, L.R.** 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of mutant strain. Enzyme Microbiol. Technol. **8**:27-32.

- Kisaalita, W.S, Slininger, P.J. and Bothast, R.J.** 1993. Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**:750-755.
- Kleinman, M., Evans, I.H. and Beran, E.A.** 1988. Sodium phosphate enhancement of starch hydrolysis by a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett. **10**:313-315.
- Kobayashi, T., Mizutani, S., Mori, H., Shimuzu, S. and Sakagushi, K.** 1983. High density cultivation of *Escherichia coli* containing a hybrid plasmid derived from *Thermus thermophilus*. Proc. Pac. Chem. Eng. Congr. **4**:145-150.
- Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H.** 1991. High-expression of a target gene and high-stability of the plasmid. Appl. Biochem. Biotechnol. **27**:145-162.
- Konno, H. and Tsumuki, H.** 1991. An exopolygalacturonase from rice shoots. Phytochemistry **30**:2115-2118.
- Kotarski, S.F. and Salyers, A.A.** 1984. Isolation and characterization of outer membrane of *Bacteroides thetaiotaomicron* grown on different carbohydrates. J. Bacteriol. **158**:102-109.
- Kravtchenko, T.P., Voragen, A.G.J. and Pilnik, W.** 1992. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. Carbohydr. Polym. **18**:17-25.
- Kumar, P.K.R., Maschke, H.E., Friehs, K. and Shügerl, K.** 1991. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. TIBTECH **9**:279-284.
- Laing, E. and Pretorius, I.S.** 1992. Synthesis and secretion of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* regulated by different combinations of bacterial and yeast promoter and signal sequences. Gene **121**:35-45.
- Landwall, P. and Holme, T.** 1977. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. J. Gen. Microbiol. **103**:345-352.
- Lee, C.W., Gu, M.B. and Chang, H.N.** 1989. High-density culture of *Escherichia coli* carrying recombinant plasmid in membrane cell recycle fermentor. Enzyme Microb. Technol. **11**:49-54.

- Lee, S.B. and Bailey, J.E.** 1984. Analysis of growth rate effects on productivity of recombinant *Escherichia coli* populations using molecular mechanism models. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:66-73.
- Liao, C.H.** 1989. Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* **19**:1677-1683.
- Lim, H.C., Chem, B.J. and Christopher, C.** 1977. An analysis of extended and exponential fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **19**:425-433.
- Lin-Chao, S. and Koizumi, J.** 1984. Effect of temperature on plasmid stability and penicillinase productivity in transformant of *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:1026-1031.
- Lin, E.C.C. and Kuritzkes, D.R.** 1987. Pathways for anaerobic electron transport. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Vol.I. Edited by Neidhart, F.C., pp. 201-221. American Society for Microbiology.
- Lin, K.W., Patterson, J.A and Ladisch, M.R.** 1985. Anaerobic fermentation: microbes from ruminants. *Enzyme Microbiol. Technol.* **7**:98-107.
- Lingappa, V.R., Chaidez, J., Yost, S. and Hedgpeth, J.** 1984. Determinants for protein localization: β -lactamase signal sequence direct globin across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:456-460.
- Lints, F.** 1981. Génétique. Office International de librairie Bruxelles, technique et documentation, Paris.
- Lison, L.** 1968. Statistique appliquée à la biologie expérimentale: la planification de l'expérience et l'analyse des résultats. Gauthiers-Villars, Paris.
- Lowe, P.N. and Perham, R.N.** 1984. Bromopyruvate as an active-site-directed inhibitor of the pyruvate deshydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **23**:97-104.
- Luli, W.G. and Strohl, W.R.** 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1004-1011.
- Lunn, C.A., Takahara, M. and Inouye, M.** 1986. Secretion cloning vector for guiding the localization of proteins in vivo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **125**:59-74.

- Lusk, J.E., William, R.J.P. and Kennedy, E.** 1968. Magnesium and the growth of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **243**:2618-2624.
- Lusk, J.E. and Kennedy, E.** 1969. Magnesium transport in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **244**:1653-1655.
- Madawar, D.B. and Mithal, B.M.** 1986. Effect of pectin on anaerobic digestion of cattle dung. Biotechnol. Bioeng. **28**:624-626.
- Maddox, I.S. and Richert, S.H.** 1977. Use of response surface methodology for the rapid optimization of microbiological media. J. Appl. Bacteriol. **43**:197-204.
- Marston, F.A.O.** 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized and enzyme activity of *Escherichia coli* DH5 α . Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**:54-60.
- Martinez, M.J., Alconada, M.T., Guillen, F., Vazquez, C. and Reyes, F.** 1991. Pectic activities from *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*: purification and characterization of an exopolygalacturonase. FEMS Microbiol. Lett. **81**:145-150.
- Mateles, R.I. and Battat, E.** Continuous culture used for media optimisation. Appl. Microbiol. **28**:901-905.
- Mathieu, R.E. and Phan-Tan Luu, R.** 1980. Software Nemrod, L.P.R.A.I., Marseille.
- McCarthy, R.E. and Salyers, A.A.** 1986. Evidence that polygalacturonic acid may play a major source of carbon and energy for colonic *Bacteroides thetaiotaomicron* species. Appl. Environ. Microbiol. **52**:9-16.
- McCarthy, R.E., Kotarski, S.F. and Salyers, A.A.** 1985. Location and characteristics of enzymes involved in breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. **161**:493-499.
- Meacock, P.A. and Cohen, S.N.** 1980. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. Cell **20**:529-542.
- Miyazaki, Y.** 1991. Purification and characterization of endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. Agric. Biol. Chem. **55**:25-30.

- Molin, S., Klemm, P., Poulsen, L.K., Biehl, H., Gerdes, K, and Anderson, P.** 1987. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Bio/Technology*. **5**:1315-1317.
- Moran, F., Nusuno, S. and Starr, M.P.** 1968. Extracellular and intracellular polygacturonic acid trans-eliminase of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**:298-306.
- Morgan, S.L. and Deming, S.N.** 1974. Simplex optimisation of analytical chemical methods. *Anal. Chem.* **44**:1170-1181.
- Mori, H. Yano, T., Kobayashi, T. and Shimuzu, S.** 1979. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J. Chem. Eng. Jap.* **12**:313-319.
- Nancib, N., Branlant, C and Boudrant, J.** 1991. Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *J. Industr. Microbiol.* **8**:165-170.
- Nandev, P.K., Irwin, N., Thompson, B.G. and Gray, M.R.** 1993. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:666-670.
- Neidhardt, F.C. , Bloch, P.L and Smith, D.F.** 1974. Culture media for enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**:736-747.
- Nelson, D.L. and Kennedy, E.P.** 1972. Transport of magnesium by repressible and nonrepressible system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:1091-1093.
- Neu, H.C. and Heppel, L.A.** 1964. The release of ribonuclease into the medium when *Escherichia coli* cells are converted to spheroplasts. *Biochem. Biophys. Rev. Commun.* **14**:109-112.
- Nicaud, J.M., Mackman, N. and Holland, I.B.** 1986. Current status of secretion of foreign proteins by micro-organisms. *J. Biotechnol.* **3**:255-270.
- Noack, D., Roth, M., Geuther, R., Müller, G., Undisz, K., Hoffmeir, C. and Gaspar, S.** 1981. Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in *Escherichia coli* K12 strain grown in- chemostat. *Mol. Gen. Genet.* **184**:121-124.

- Ogden, K.L., Davis, R.H. and Taylor, A.L.** 1992. An adjustable expression system for controlling growth rate, plasmid maintenance and culture dynamics. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:1027-1038.
- Ohara, H., Hiyama, K. and Yoshida, T.** 1992. Kinetic study on pH dependence on growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:403-407.
- Osborne, J.M. and Dehority, B.A.** 1989. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2247-2250.
- Paktar, A. and Seo, J.H.** 1992. Yeast in batch and fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:103-109.
- Pan, J.G., Rhee, J.S. and J.M. Lebeault.** 1987. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **9**:89-94.
- Park, S.H. and Pack, M.Y.** 1986. Cloning and expression of a *Bacillus* cellulase gene in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **8**:725-728.
- Park, S., Ryu, D.D.Y. and Kim, J.Y.** 1990. Effect of cell growth rate on the performance of two-stage continuous culture system in recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **36**:493-505.
- Park, S., and Ryu, D.D.Y.** 1992. Analysis of plasmid instability by the difference in colony size. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:185-188.
- Patterson, J.A.** 1989. Prospects for establishment of genetically engineered micro-organisms in the rumen. *Enzyme Microbiol. Technol.* **11**:187-189.
- Pazlarova, J., Baig, M. and Votruba, J.** 1984. Kinetic of α -amylase production in batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis* with caseinate as nitrogen source and starch as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **20**:331-334.
- Perreto, R., Favaron, F., Bettini, V., De Lorenzo, G., Marini, S. Alghisi, P. Cervone, F. and Bonfante, P.** 1992. Expression and localization of polygalacturonate during the out growth of lateral roots in *Allium porum* L. *Planta* **188**:164-172.
- Philippe, J.** 1967. Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie. Edité par Masson et Cie. Paris.

- Polizeti, M.L.M.T., Jorge, A.J. and Terenzi, H.F.** 1991. Pectinases production by *Neurospora crassa*: Purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1815-1823.
- Poole, R. and Ingledew, W.J.** 1987. Pathways of electrons oxygen. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Vol. I. Edited by Neidhardt, F.C., pp. 170-200. American Society for Microbiology.
- Pressey, R.** 1991. Polygalacturonase in tree pollens. *Phytochemistry* **30**:1753-1755.
- Prevot, A.R., Turpin, A. and Kaiser, P.** 1967. Les bactéries anaérobies. Dunod. Paris.
- Ragsdale, S.W., Lyungdahl, L.G. and Vatanian, D.D.V.** 1983. Isolation of carbon monoxide deshydrogenase from *Acetobacterium woodi* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. *J. Bacteriol.* **155**:1224-1237.
- Rambouts, F.M. and Pilnik, W.** 1978. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Proc. Biochem.* **8**:9-13.
- Ravelomanana, R., Guirud, P.J. and Galzy, P.** 1986. Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa beans. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**:230-233.
- Reiling, H.E., Laurila, H. and Fiechter, A.** 1985. Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *J. Biotechnol.* **2**:191-206.
- Repaske, D.R. and Adler, J.** 1981. Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemostatic response to certain attractants and repellents. *J. Bacteriol.* **145**:1196-1208.
- Ried, J.L. and Collmer, A.** 1987. Construction and characterization of *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. *Molec. Plant-microb. Interact.* **1**:32-38.
- Rocha, E.R., Uzeda, M. and Brock, J.M.** 1991. Effect of ferrous iron chelator on growth of *Bacteroides fragilis* under anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**:45-50.
- Ryan, W., Parelukar, S.J. and Stark, B.** 1989. Expression of β -lactamase by *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes. Effect of pH, phosphate and dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* **34**:309-319.

- Saito, T., Kato, K., Maeda, S., Suzuki, T., Shiba, S., Iijima, S. and Kobayashi, T.** 1992. Overproduction of thermostable β -galactosidase in *Escherichia coli*, its purification and molecular structure. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:12-16.
- Sakoda, H. and Imanaka, T.** 1990. A new way of stabilizing recombinant plasmids. *J. Ferment. Bioeng.* **69**:75-78.
- Salyers, A.A., Balascio, J.R. and Palmer, J.R.** 1982. Breakdown of xylan by enzymes from human colonic bacteria. *J. Food Biochem.* **6**:39-55.
- Sargent, M.G.** 1968. Rapid fixed-time assay for penicillinase. *J. Bacteriol.* **95**:1493-1495.
- Sasson, A.** 1985. Les biotechnologies: Défis et promesses. Sextant 2. UNESCO.
- Sayadi, M.N., Barbotin, J.N. and Thomas, D.** 1989. Effect of environmental growth conditions on plasmid stability, plasmid copy number, and catechol 2,3-dioxygenase in activity in free and immobilized *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**:801-808.
- Schink, B. and Zeikus, J.G.** 1982. Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. *J. Gen. Microbiol.* **128**:393-404.
- Schweder, T., Schmidt, I., Hermann, H., Neubauer, P., Hecker, M. and Hofmann, K.** 1992. An expression vector system providing plasmid stability and conditional suicide of plasmid-containing cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:91-93.
- Seo, J.H. and Bailey, J.E.** 1985. On growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1668-1674.
- Seo, J.H. and Bailey, J.E.** 1986. Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1590-1594.
- Seo, J.H., Löffler, A.I. and Bailey, J.E.** 1988. A parametric study of cloned fusion protein expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **32**:725-730.
- Sergent, C.C., Lesgards, G. and Phan-Tan-Luu, R.** 1991. Application de la méthodologie de la recherche expérimentale à la mise en évidence des interactions entre la pectine de pomme, les ions calcium et le cholestérol. *Analysis* **19**:167-174.

Seyrig, J.A., Naveau, S., Gonzales, R. et Petit, R. Pectines. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **7**:1031-1037.

Shiloach, J. and Bauer, S. 1975. High-yield growth of *Escherichia coli* at different temperatures in bench scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:227-239.

Shoemaker, N.B., Anderson, K.L, Smithson, S.L., Wang, G. and Salyers, A.A. 1991. Conjugal transfer of shuttle vector from the human colonic anaerobe *Bacteroides uniformis* to the ruminal anaerobe *Prevotella ruminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2114-2120.

Shoham, Y. and Demain, A.L. 1991. Kinetics of loss of recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:927-935

Siegel, R. and Ryu, D.D. 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPL23trAl in *Escherichia coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:227-239.

Siessere, V., Fonsceca, M.J.V. and Said, S. 1992. Extracellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*: Separation and regulatory aspects. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1801-1805.

Simon, L.D., Randolph, B., Irwin, N. and Binkowski, G. 1983. Stabilization of proteins by bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2059-2062.

Smirnova, G. and OKtyabr'skii, N.O. 1988. Effect of activity of primary proton pumps on growth of *Escherichia coli* in the presence of acetate. *Microbiology (URSS)* **57**:557-559.

Smirnova, G. and Oktyabr'skii, N.O. 1985. Influence of acetate on the growth of *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology (URSS)* **54**:205-209.

Smith, E., Elsa, V., J.D. and Van Veen, J.A. 1992. Risks associated with the application of genetically modified in terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **88**:263-278.

Smith, M.R., Hugenholtz, J., Mikoczi, P., Ree, D.E., Bunch, A.W. and De Bont, J.A.M. 1992. The stability of lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**:7-12.

- Smith, M.W. and Neidhardt, F.C.** 1983. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **154**:336-343.
- Sompolinsky, D. and Samra, Z.** 1972. Influence of magnesium and manganese on some biological and physical properties of tetracycline. J. Bacteriol. **110**:468-476.
- Son , K.H., Jong, H. and Kim, J.H.** 1987. Effect of temperature on plasmid stability and expression of cloned cellulase gene in recombinant *Bacillus megaterium*. Biotechnol. Lett. **9**:821-824.
- Spiro, S. and Guest, J.R.** 1991. Adaptative responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. TIBS **16**:310-314.
- Spök, A., Stubenrauch, G., Schörgendorfer and Schwab, H.** 1991. Molecular cloning and sequencing of pectinesterase gene from *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol. **137**:131-140.
- Squire, C.H., Heefner, D.L., Evans, R.J., Kopp, B.J. and Yarus, M.J.** 1984. Shuttle plasmids for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. **159**:465-470.
- Stewart, V.** 1982. Requirement of *Fnr* and *NarL* fonctions for nitrate reductase expression in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. **151**:1320-1325.
- Stueber, D. and Bujard, H.** 1982. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. EMBO J. **11**:1399-1404.
- Summers, D.K.** 1991. The kinetics of plasmid loss. TIBTECH **9**:273-278.
- Summers, D.K. and Sherratt, D.J.** 1989. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell **36**:1097-1103.
- Summers, R.J., Boudreaux, D.P. and Srinivasan, V.R.** 1979. Continuous cultivation for apparent optimization of defined media for *Cellulomonas* sp. and *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. **38**:66-71.
- Swenson, R.M.** 1986. Rationale for identification and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Rev. Infect. Dis. **8**:809-813.
- Tempest, D.W. and Hunter, J.R.** 1965. Magnesium-limited growth of *Aerobacter aerogenes* in chemostat. J. Gen. Microbiol. **39**:355-366.

- Temsah, M., Bertheau, Y. and Vian, B.** 1991. Pectate lyase fixation and pectate disorganization visualized by immunocytochemistry in *Saintpaulia ionantha* infected by *Erwinia chrysanthemi*. Cell Biology International Report 15:611-620.
- Tierny, Y.** 1992. Clonage et expression chez *Escherichia coli* de gènes de *Bacteroides thetaiotaomicron* impliqués dans la dégradation des pectines. Thèse de doctorat "Sciences de la vie et de la santé", Université des Sciences et Technologies de Lille. N° d'ordre 852.
- Tierny, Y., Béchet, M., Joncquiert, J.C., Dubourguier, H.C. and Guillaume, J.B.** 1994. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of genes encoding pectate lyase and pectin methylesterase activities from *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Appl. Bacteriol. sous presse
- Tissières, A., Watson, J.D., Schelessinger, D. and Hollingworth, B.R.** 1959. Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 1:221-233.
- Tolentino, G.J and San, K.Y.** 1988. Plasmid maintenance and gene expression of a recombinant culture under aerobic and anaerobic conditions. Biotechnol. Lett. 10:373-376.
- Ueno, S., Myaa, M., Ohashi, Izumiya, M. and Kusaka, I.** 1987. Secretory enzyme production and conidation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid-culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:273-276.
- Wang, H.Y., Cooney, C.L. and Wang, D.I.C.** 1977. Computer-aided baker's yeast fermentations. Biotechnol. Bioeng. 19:69-86.
- Warnes, A. and Stephenson, J.R.** 1986. The insertion of large pieces of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids. Plasmid 16:116-123.
- Webb, M.** 1949. The influence of magnesium on cell division. The effect of magnesium on the growth of bacteria in simple chemically defined media. J. Gen. Microbiol. 3:418-420.
- Wong, T.Y.** Effect of calcium on sugar transport in *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol. 59:89-92.
- Xiaoli, L., Robbins, J.W., Taylor, K.B.** 1990. The production of recombinant β -lactamase in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. J. Industr. Microbiol. 2:181-187.

- Xu, F.F., Pearce, L.E. and Yu, P.L.** 1990. Molecular cloning and expression of proteinase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 and construction of a new lactococcal vector pFX1. *Arch. Microbiol.* **154**:99-104.
- Xue, G.P., Orpin, C.G., Gobijs, K.S., Aylward, J.H. and Simpson, G.D.** 1992. Cloning and expression of multiple cellulase cDNAs from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1413-1420.
- Yamane, K., Suzaki, H., Hirotsani, M., Ozawa, H. and Nisizawa, K.** 1970. Effect of nature of supply of carbon sources on cellulase formation in *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Biochem.* **67**:9-18.
- Yee, L. and Blanch, H.W.** 1993. Defined media optimization for growth recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:221-230.
- Yoshida, F., Yamane, T. and Nakamoto, K.I.** 1973. Hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. *Biotechnol. Bioeng.* **15**:257-270.
- Yoshida, A., Izuta, M., Ito, K., Kamio, Y. and Izaka, K.** 1991. Cloning and characterization of pectate lyase III gene of *Erwinia carotovora* Er. *Agric. Biol. Chem.* **55**:933-940.
- Zabriniski, D.W. and Arcuri, E.J.** 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant micro-organisms. *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**:706-717.
- Zabriniski, D.W., Wareheim, D.A. and Polansky, M.** 1987. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*. *J. Industr. Microbiol.* **2**:87-95.
- Zeeuw, J.R.** 1968. Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **95**:498-506.