

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. de Biologie

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

en

Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement
par

Isabelle DENANTES-VERDIER

le 12 octobre 2000

ÉTUDE DES POTENTIALITÉS INDUSTRIELLES DE
TETRAHYMENA THERMOPHILA BIII :
PRODUCTION EN MASSE ET CONTRIBUTION A LA
CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE

Directeur de thèse : Stéphane BOUQUELET

Jury :

S. BOUQUELET	Président
J.C. CAILLIEZ	Rapporteur
P. DEBEIRE	Rapporteur
B. CABANES	Examineur
J. DE CONINCK	Examineur
J.P. HORNEZ	Examineur



ERRATA

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

page 17 : 6e ligne du schéma de croisement : lire « B-2079VI » au lieu de « B-2079IV »
page 37, § II.2.2., 2e ligne : lire "oxygène"
page 40, § II.3.2., 3e ligne : lire "requérant"
page 44, 8e ligne : lire "...les mécanismes"

MATÉRIEL ET MÉTHODES

page 69 , §I.342 : lire « ensemencement »
page 75, §II.1.3.2. lire « Homogénéiseur »
page 88,§II.5.8. : lire « soit au... »

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

page 132, 2e ligne : lire « ...notamment comparées à celles en polypropylène, moins hydrophiles ».
p.135, §IV, 1ere ligne : lire "Cette étape..."
page 155, §IV3161, 15e ligne : lire « ...très utilisé en industries agro alimentaires »
page 168, figure 54 : lire « la lettre indiquée »
page 173, §IV.3176, 8e ligne : lire « atteint »
page 181 , §IV.312, 8e ligne : lire « correspondant »

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

page 187, 26e ligne : lire « optima »
page 188, 25e ligne : lire « suggérant »
page 189, 16^e ligne: lire « A ce titre... »
page 190, 3e ligne : lire « spécificité »
7e ligne : lire « molécules »
9e ligne : lire « s'intéresse »
24e ligne : lire « il s'agit »



AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Fermentations de l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille (ISA) d'une part, et au Laboratoire de Glycobiologie des Bifidobactéries de l'unité de recherche associée au CNRS de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I d'autre part.

Qu'il me soit permis de rendre hommage à la mémoire de Monsieur le Professeur André Verbert, récemment disparu, qui fut directeur de cette unité de recherche, et à son accueil chaleureux au « C9 ».

J'exprime toute ma reconnaissance à

Monsieur Bruno Cabanes

Monsieur Jean-Charles Cailliez

Monsieur Philippe Debeire

Monsieur Jean-Pierre Hornez

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à remercier

le Professeur Stéphane Bouquelet

pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse et accueillie dans son groupe. L'ambiance studieuse et chaleureuse qui y règne m'a permis de surmonter des moments de doute survenus au cours de ces sept années. Ses compétences et sa rigueur scientifiques m'ont aidé à mener à bien ce travail, mais aussi à enrichir ma formation d'enseignant.

Je tiens également à remercier

Pascal Codron, pour m'avoir accueillie à l'ISA,

Patrice Halama, pour m'avoir accueillie au Laboratoire de Biotechnologie des
Microorganismes,

Joëlle De Coninck, responsable de l'Unité des Fermentations, pour la qualité de son
suivi de la partie microbiologie de ce travail,

Vincent Dumortier, pour m'avoir initiée aux dosages enzymatiques nécessaires au
suivi des fermentations.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude envers

Valérie Conseil

Jean-Charles Cailliez

Catherine Braun-Breton

Jihad Albani

Florent Duyme

Loïc Penet

Daniel Dive

pour la collaboration scientifique que nous avons entretenue, et pour leurs conseils.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du "207"

Eliane Aissi,

Colette Brassart,

Frédéric Krjewinski,

pour leur aide spontanée et leur sympathie

Un merci tout particulier à

Caroline Deweer

Françoise Dhaynaut

Pascal Dourlens,

Brigitte Jacquier

Bertrand Leclercq

Fadila Lalaoui

Caroline Portois

Elisabeth Richez

Sigrid Saison

Ainsi qu'à tout le personnel administratif et pédagogique de la Faculté Libre des Sciences, de Tecobio , de l'ISA et des COMES,

pour leur amitié et leur gentillesse

Je dédie ce travail à

Laurent,

merci pour ta patience et ton soutien de tous les jours

Nos fils, Basile, Gaspard, Ulysse et Roméo,

merci aussi pour votre patience,

Et même votre impatience car si souvent manifestée avec tendresse!

Mes parents,

Christophe, Pascale, Mady et Rébecca, sans oublier les beaux-frères et belles-sœurs, Luc, Pascal, Catherine, Guillaume et Mathilde,

Nicole,

Et toute la famille,

Nos amis

pour nombre d'entre vous, *Tetrahymena* est devenu plus qu'un mot à consonnance ...
latine ou lointaine!

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

ARTICLES

INDUSTRIAL MEDIA AND FERMENTATION PROCESSES FOR IMPROVEMENT
GROWTH AND PROTEASES PRODUCTION BY *TETRAHYMENA THERMOPHILA* BIII
Joëlle De Coninck, Stéphane Bouquelet, Vincent Dumortier, Florent Duyme and **Isabelle
Verdier-Denantes**

J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2000, 24, 285-290.

MODELLING *TETRAHYMENA THERMOPHILA* GROWTH AND PROTEASE
PRODUCTION

J. De Coninck, S. Bouquelet, V. Dumortier, **I. Verdier-Denantes**, and F. Duyme

J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (sous presse)

COMMUNICATION ORALE

CULTIVATION OF CILIATED PROTOZOA WITH INDUSTRIAL MEDIA AND
CONDITIONS : A NEW METABOLITES SOURCE ?

De Coninck J., Bouquelet S., Dumortier V., Leclercq B., **Verdier I.**

10th International Congress of Protozoology, July 1997, Sydney.

Publiée dans Eur. J. Protistol., 34 (3), 1998

POSTERS

MAITRISE DE LA CROISSANCE DE *TETRAHYMENA THERMOPHILA* SOUCHE BIII
ET CARACTERISATION D'ENZYMES D'INTERET INDUSTRIEL.

Verdier-Denantes I., Bouquelet S., Dumortier V., De Coninck J.,

Congrès G.P.L.F., 12/15 Mai 1994, Nice.

CAN PROTOZOA BE A METABOLITE SOURCE ?

Verdier-Denantes I., De Coninck J.

7th European Congress of Biotechnology, Feb. 19-21, 1995, Nice.

ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AIA	acide iodo-acétique
ARN	acide ribonucléique
BAPNA	N- α -benzoyl- <i>para</i> -nitroanilide
CDM	milieu chimiquement défini
DE	dextrose équivalent
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP	degré de polymérisation
DTT	dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
E64	L-trans-époxy succinyl-leucylamido(4-guanido) butane
KD	kilodalton
K _m	constante de Michaelis-Menten
MES	2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid
MOPS	3-[N-morpholino] propane sulfonic acid
MYE	milieu composé de lait écrémé et extrait de levure
PBS	tampon phosphate salin
PM	population maximale
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
PPYS	milieu composé de protéose peptone, extrait de levure et solution saline
Pyr-PheLeu-Na	pyroglutamyl-phénylalanine-leucine-nitroanilide
SAB	sérum albumine bovine
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide - dodécylsulfate de sodium
TG	temps de génération
TRIS	tri-hydroxyméthyl aminométhane
V _m	vitesse maximale
vvm	volume d'air par volume de milieu par minute
YEG	milieu composé d'extrait de levure et de glucose
YEM	milieu composé d'extrait de levure et de solubles de maïs
YEP	milieu composé d'extrait de levure et solubles de pomme de terre
YEX	milieu composé d'extrait de levure et de Glucidex®

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION	3
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I / PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE <i>TETRAHYMENA</i>	7
I.1. LES PROTISTES	7
I.2. SYSTÉMATIQUE DE <i>TETRAHYMENA</i>	7
I.3. BIOTOPE	9
I.4. NUTRITION	11
I.5. MORPHOLOGIE	11
I.5.1. Morphologie externe	11
I.5.2. Morphologie interne	11
I.5.2.1. Les vacuoles digestives	13
I.5.2.2. Le système nucléaire	15
I.6. REPRODUCTION	15
I.7. OBTENTION DE SOUCHES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES	17
I.8. PHYSIOLOGIE ET NUTRITION DE <i>TETRAHYMENA</i>	19
I.8.1. Besoins nutritionnels	19
I.8.1.1. Besoins en azote	19
I.8.1.1.1. Acides aminés	19
I.8.1.1.2. Précurseurs d'acides nucléiques	21
I.8.1.2. Besoins en vitamines	21
I.8.1.3. Besoins en éléments minéraux	21
I.8.1.4. Besoin en glucides	23
I.8.1.5. Besoins en lipides	24
I.8.1.6. Facteurs stimulants	24

I.8.2. Modes d'assimilation des nutriments	25
I.8.2.1. La membrane plasmique	25
I.8.2.2. Les vacuoles digestives	27
<i>I.8.2.2.1. Ingestion des protéines</i>	27
<i>I.8.2.2.2. Ingestion du fer et du cuivre</i>	28
I.8.2.3. La digestion exocellulaire	28
<i>I.8.2.3.1. Les enzymes exocellulaires</i>	28
<i>I.8.2.3.2. Enzymes liées à la surface membranaire</i>	33
<i>I.8.2.3.3. Conséquences de l'activité enzymatique exocellulaire</i>	33
II / OUTILS CULTURAUX POUR LA PRODUCTION EN MASSE DE <i>TETRAHYMENA</i>	35
II.1. EXIGENCES DE <i>TETRAHYMENA</i> LIÉES A LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE	35
II.2. PARAMÈTRES PHYSIQUES AGISSANTS SUR LA CROISSANCE DE <i>TETRAHYMENA</i>	36
II.2.1. Température	36
II.2.2. pH	37
II.2.3. Oxygénation	38
II.2.4. Agitation	38
II.2.5. Particules en suspension	39
II.2.6. Densité de l'inoculum initial	39
II.3. CULTURE EN MASSE DE <i>TETRAHYMENA</i>	39
II.3.1. Procédés généraux récents de fermentation	39
II.3.2. Application à la culture en masse de <i>Tetrahymena</i>	40
II.4. CONCLUSION	43

III / POTENTIALITÉS DE <i>TETRAHYMENA</i> EN BIOTECHNOLOGIE	44
III.1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL	44
III.1.1. Études toxicologiques	44
III.1.2. Études en biologie cellulaire	47
III.2. PRODUCTION DE MÉTABOLITES	48
III.2.1. Acides gras et hormones	48
III.2.2. Enzymes	49
III.2.2.1. Variété d'enzymes	49
III.2.2.2. Activité enzymatique	49
III.2.2.3. Production enzymatique	51
III.2.2.4. Enzymes de <i>Tetrahymena</i>	51
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I / MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	63
I.1. LE MICRO-ORGANISME	63
I.2. LES MILIEUX DE CULTURE	63
I.2.1. Milieu semi-synthétique : PPYS	63
I.2.2. Milieux complexes	64
I.2.2.1. Milieu MYE	64
I.2.2.2. Milieu YE amélioré	64
I.2.2.2.1. Milieu YEG	65
I.2.2.2.2. Milieu YEX	65
I.2.2.2.3. Milieu YEP	65
I.2.2.2.4. Milieu YEM	66
I.3. CONDITIONS GÉNÉRALES D'EXPÉRIMENTATION	66
I.3.1. Conservation	66
I.3.2. Cultures mères pour les inoculations	66

I.3.3. Déterminations préliminaires de paramètres de croissance en flacons	67
I.3.3.1. Détermination de la composition optimale du milieu MYE	67
I.3.3.2. Détermination du pH optimal de culture	67
I.3.3.3. Détermination de la température optimale de culture	67
I.3.4. Cultures en fermenteur	69
I.3.4.1. Fermenteur de 2L	69
I.3.4.2. Préparation de l'inoculum	69
I.3.4.3. Inoculation	70
I.3.4.4. Conditions expérimentales	70
I.4. TECHNIQUE DE DÉNOMBREMENT ET DÉTERMINATION DU TEMPS DE GÉNÉRATION	70
I.5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RÉSULTATS	71
II / TECHNIQUES UTILISÉES POUR LES ÉTUDES DE PRODUCTION ET DE CARACTÉRISATION ENZYMATIQUE	73
II.1. PRÉPARATION DU MATERIEL ENZYMATIQUE	73
II.1.1. Préparation du surnageant de culture	73
II.1.1.1. Centrifugation	73
II.1.1.2. Microfiltration tangentielle	73
II.1.2. Concentration des surnageants de culture et éluats de chromatographie	74
II.1.2.1. Ultrafiltration tangentielle	74
II.1.2.2. Ultrafiltration sous courant d'azote	74
II.1.3. Extraction cellulaire	74
II.1.3.1. Cycles de congélation/décongélation des cellules	74
II.1.3.2. Homogénéiseur Potter	75
II.1.3.3. Traitement par les ultra-sons	75

II.2. MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES	76
II.2.1. Dosage des protéines	76
II.2.1.1. Principe	76
II.2.1.2. Réactifs	76
II.2.1.3. Mode opératoire	76
II.2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)	76
II.2.3. Coloration des protéines	77
II.2.4. Mise en évidence d'une activité protéasique par gélatine SDS-PAGE (conditions non dénaturantes)	77
II.3. DOSAGES ENZYMATIQUES	77
II.3.1. Activités glycosidasiques	77
II.3.1.1. Principe	77
II.3.1.2. Réactifs	78
II.3.1.3. Mode opératoire	78
II.3.1.4. Expression de l'activité	78
II.3.2. Activité protéasique	78
II.3.2.1. Sur des substrats naturels	78
<i>II.3.2.1.1. Principe</i>	78
<i>II.3.2.1.2. Réactifs</i>	79
<i>II.3.2.1.3. Mode opératoire</i>	79
<i>II.3.2.1.4. Expression de l'activité</i>	81
II.3.2.2. Sur des substrats synthétiques	81
<i>II.3.2.2.1. Principe</i>	81
<i>II.3.2.2.2. Réactifs</i>	81
<i>II.3.2.2.3. Mode opératoire</i>	82
<i>II.3.2.2.4. Expression de l'activité</i>	82
II.3.3. Activité hexokinasiq	82

II.3.3.1. Principe	82
II.3.3.2. Réactifs	82
II.3.3.3. Mode opératoire	83
II.3.3.4. Expression de l'activité	83
II.4. ISOLEMENT DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES	85
II.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	85
II.4.2. Techniques chromatographiques	85
II.4.2.1. Chromatographie sur hydroxyapatite-ultrogel	85
II.4.2.2. Gel filtration	85
II.5. ÉTUDE DES PROTÉASES	86
II.5.1. Détermination du point isoélectrique par chromatofocalisation	86
II.5.2. Détermination de la stabilité au pH	86
II.5.3. Détermination du pH optimal	86
II.5.4. Détermination de la stabilité à la température	87
II.5.5. Détermination de la température optimale	87
II.5.6. Détermination des Km et Vmax	87
II.5.7. Action d'effecteurs sur les activités enzymatiques	87
II.5.8. Influence de l'urée	88
II.5.9. Recherche de modifications conformationnelles de l'hémoglobine par spectrométrie d'émission en fluorescence	88
RÉSULTATS	
I / PRODUCTION EN MASSE DE <i>TETRAHYMENA</i>	91
I.1. CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE DE <i>T. THERMOPHILA</i>	91
I.1.1. Etude de la croissance de <i>T. thermophila</i> sur différents milieux	91
I.1.2. Détermination de la composition optimale du milieu MYE	93
I.2. PARAMETRES DE CULTURE	95

I.2.1. Influence du mode de culture : changement d'échelle	95
I.2.2. Détermination du pH optimum de culture	97
I.2.3. Détermination de la température optimale de culture	99
I.3. DISCUSSION	99
II / PRODUCTION ENZYMATIQUE EN FERMENTEUR	103
II.1. RÉCUPÉRATION DU SYSTÈME CELLULAIRE ET ENZYMATIQUE : COMPARAISON ENTRE CENTRIFUGATION ET MICROFILTRATION	103
II.1.1. Bilans cellulaire et enzymatique	105
II.1.2. Conclusion	107
II.2. INFLUENCE DU MILIEU SUR LA PRODUCTION ENZYMATIQUE : CINETIQUES DE PRODUCTION ENZYMATIQUE	107
II.2.1. Activité protéasique	109
II.2.2. Activités glycosidasiques	109
II.3. DISCUSSION	113
III / AMÉLIORATION DE LA CULTURE ET DE LA PRODUCTION D'ENZYMES EN FERMENTEUR	115
III.1. INFLUENCE DE LA REGULATION DU pH	115
III.1.1. Croissance cellulaire	117
III.1.2. Cinétique de production d'activité protéasique	118
III.2. INFLUENCE DE LA REGULATION DE L'OXYGENE	119
III.2.1. Effet sur la croissance cellulaire	121
III.2.2. Effet sur la cinétique de production d'activité protéasique	121
III.3. INFLUENCE DU COUPLE AÉRATION/AGITATION	122
III.3.1. Plan d'expérience	123

III.3.2. Résultats	123
III.3.3. Discussion	125
III.4. CULTURE EN CONTINU AVEC COUPLAGE A UNE UNITE DE MICROFILTRATION	127
III.4.1. Cinétique de croissance cellulaire	129
III.4.2. Cinétique de détection de l'activité hexokinase et des protéines	129
III.4.3. Cinétique de détection d'activité protéasique	129
III.4.4. Discussion	131
IV / CARACTÉRISATION PARTIELLE DES ACTIVITÉS PROTÉASIQUES	135
IV.1. LOCALISATION DES PROTÉASES	136
IV.1.1. Cycles de congélation/décongélation des cellules	136
IV.1.2. Traitement aux ultrasons	137
IV.1.3. Discussion	139
IV.2. PURIFICATION PARTIELLE	141
IV.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	141
IV.2.2. Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite	141
IV.2.3. Gel filtration	143
IV.3. CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS PROTÉASIQUES	143
IV.3.1. Propriétés enzymatiques	143
IV.3.1.1. pH optimal	145
<i>IV.3.1.1.1. Sur hémoglobine</i>	145
<i>IV.3.1.1.2. Autres substrats</i>	147
<i>IV.3.1.1.3. Conclusion</i>	147
IV.3.1.2. Stabilité au pH du système enzymatique	149

IV.3.1.3. Température optimale	149
IV.3.1.4. Stabilité à la température du système enzymatique	151
IV.3.1.5. Détermination des paramètres cinétiques : constante d'affinité (Km) et vitesse maximale (Vm)	151
<i>IV.3.1.5.1. Hémoglobine</i>	151
<i>IV.3.1.5.2. N-α-benzoyl-DL-argininine-para-nitro-anilide (BAPNA)</i>	153
IV.3.1.6. Influence des effecteurs	155
IV.3.1.6.1. Effecteurs spécifiques des protéases	155
IV.3.1.6.2. Effecteurs enzymatiques	159
IV.3.1.6.3. Influence du zinc	163
IV.3.1.7. Influence particulière de l'urée	167
<i>IV.3.1.7.1. Influence de la concentration en urée ajoutée au substrat - Influence de la nature du substrat</i>	167
<i>IV.3.1.7.2. Influence combinée du zinc et de l'urée ajoutés au substrat</i>	167
<i>IV.3.1.7.3. Influence de la concentration en urée ajoutée au substrat et à l'enzyme</i>	167
<i>IV.3.1.7.4. Dégradation de l'activité protéasique À pH 4,5 par l'urée et récupération par dialyse</i>	169
<i>IV.3.1.7.5. Recherche de modifications conformationnelles de l'hémoglobine par le spectre d'émission en fluorescence</i>	171
<i>IV.3.1.7.6. Conclusion</i>	173
IV.3.2. Étude de la spécificité de substrat	173
IV.3.2.1. Substrats naturels	175
IV.3.2.2. Substrats synthétiques	179
IV.3.3. Détermination des paramètres physico-chimiques	179
IV.3.3.1. Masse moléculaire	179
IV.3.3.2. Point isoélectrique	181
CONCLUSION GÉNÉRALE	185
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193
ANNEXES	215
PUBLICATIONS	245

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les avancées en recherche fondamentale et appliquée et les besoins des industries agro-alimentaires et pharmaceutiques nécessitent de plus en plus l'emploi de nouveaux outils de transformation. Les bactéries, moisissures et levures ont été largement utilisées pour anticiper ou pour répondre à ces attentes. Les protozoaires (eucaryotes inférieurs, comme les champignons) ont quant à eux été souvent ignorés dans le domaine des biotechnologies. Pourtant, des débouchés sont possibles, car, en tant qu'organismes hautement différenciés, ils offrent un intérêt comme modèle de substitution pour des recherches en toxicologie ou en nutrition (en remplacement des essais sur des organismes supérieurs) ainsi que dans le domaine de l'environnement. De plus, ils produisent une grande diversité d'enzymes à des stades de maturation supérieurs à celles synthétisées par les procaryotes.

Tetrahymena constitue sans conteste l'un des protozoaires les plus étudiés. Depuis une dizaine d'années en effet, diverses souches de *Tetrahymena* ont été essayées avec succès pour la production en fermenteur sur milieu complexe. Parallèlement à ces études sur la production de biomasse, la valorisation de ces fermentations par la recherche de métabolites présentant un intérêt industriel a été effectuée. Munro (1985) a fait une revue des potentialités enzymatiques de différents protozoaires. La richesse et la diversité des enzymes et notamment des hydrolases ont été soulignées (protéase, glycosidase, lipase, ou nucléase). Une évolution dans l'utilisation de *Tetrahymena* comme outil biotechnologique concerne l'amélioration de souches par transformation génétique, avec le double objectif de mieux comprendre la physiologie d'excrétion des souches et de produire des métabolites pour les exploiter.

Créée en 1990, l'Unité de Microbiologie des fermentations de l'I.S.A. a pour objectifs d'étudier la physiologie microbienne et en particulier l'adaptation des microorganismes à des conditions de culture industrielles. Les travaux antérieurs ont porté sur les améliorations des milieux de culture afin de les rendre simples et peu coûteux, permettant une production au stade pilote industriel. Des enzymes ont été mises en évidence. Le travail de thèse d'Ethuin (1993) a porté sur la mise au point de ces milieux d'une part, et a permis de montrer qu'il n'existe pas d'autre part, de corrélation entre le caractère *vac-* d'une souche mutée de *Tetrahymena* et l'excrétion d'activités enzymatiques, en particulier de protéases.

Nous avons poursuivi ces travaux, avec trois objectifs différents. Le premier était de produire en grandes quantités ce protozoaire et d'optimiser les paramètres de sa culture en masse :

- par le choix du milieu de culture industriel le plus performant et le plus économique possible, puis par une amélioration de ce milieu ;
- par une adaptation des paramètres physico-chimiques à des conditions industrielles en fermenteur.

Le second objectif était d'étudier la production de deux types d'activités enzymatiques (glycosidasique et protéasique), choisies pour leurs débouchés industriels, en fonction du milieu de culture, et de préciser leur cinétique d'apparition afin d'améliorer leur récupération.

Le troisième objectif a concerné le choix d'une activité enzymatique (les protéases) et sa caractérisation.

Avant d'aborder les résultats obtenus, nous exposerons l'état des connaissances actuelles concernant le genre *Tetrahymena*.

ÉTUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

PROTISTA (Haeckel, 1866)
(êtres unicellulaires eucaryotes)

Phylum : Ciliophora (Doflein, 1901)

Sub-phylum : Hypostomata (Schewiakoff, 1896)

Classe : Oligohymenophorea (De Puytorac et coll., 1974)

Sous-classe : Hymenostomatia (Delage et Hérouard, 1896)

Ordre : Hymenostomatida (Delage et Hérouard, 1896)

Sous-ordre : Tetrahymenina (Fauré-Fremiet em. Corliss, 1956)

Famille : Tetrahymenidae (Corliss, 1952)

Genre : Tetrahymena (Furgason, 1940)

Espèces : - pyriformis (Erhenberg 1830, Lwoff 1947)

- thermophila (Nanney et Mc Coy, 1976)

Figure 1 : Place systématique de *Tetrahymena thermophila*
(De Puytorac *et al.*, 1987)

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I / PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE *TETRAHYMENA*

I.1. LES PROTISTES

Les premières cellules eucaryotes apparues sur Terre (vieille alors de 2 milliards d'années) sont les Protistes. Pendant 1 milliard d'années, ils ont été, avec les bactéries (Procaryotes), les seuls êtres vivants à peupler la planète.

Actuellement, les Protistes représentent un phylum, dans le cadre étroit de leur unicellularité. De nouvelles niches sont apparues avec le développement des organismes pluricellulaires, d'où une diversification selon De Puytorac et *al.* (1987) en :

Flagellés
Amibes
Schizozoïde de Sporozoaire
Ciliés
Spores

Tous les Ciliés, à un stade au moins de leur cycle biologique, portent des cils.

I.2. SYSTÉMATIQUE DE *TETRAHYMENA* (figure 1)

Dans la classification des Ciliés, basée essentiellement sur l'infrciliature, le genre *Tetrahymena* appartient à l'ordre des Hyménostomes et à la sous classe des Holotriches. Les ciliés holotriches sont les plus simples et les plus primitifs. Ils sont généralement recouverts de cils non différenciés en membranelles ou cirres. Les Holotriches sont les Ciliés les plus évolués des Hyménostomes. Leur bouche s'ouvre souvent au fond d'un cytopharynx avec une ciliature orale complexe constituée par des peniculi ou par des membranelles. Ces dernières sont au nombre de quatre chez les *Tetrahymena*. Dans l'ordre des Hyménostomes, les genres *Glaucoma* et *Colpidium* sont très proches des *Tetrahymena*. Plus de 15 espèces de *Tetrahymena* sont actuellement connues.

Dans la classification actuelle des *Tetrahymena*, on distingue les complexes *pyriformis*, *rostrata* et *patula* qui diffèrent surtout par leur infrciliature. Chaque complexe regroupe des espèces asexuées (sans micronucleus) et des espèces sexuées.

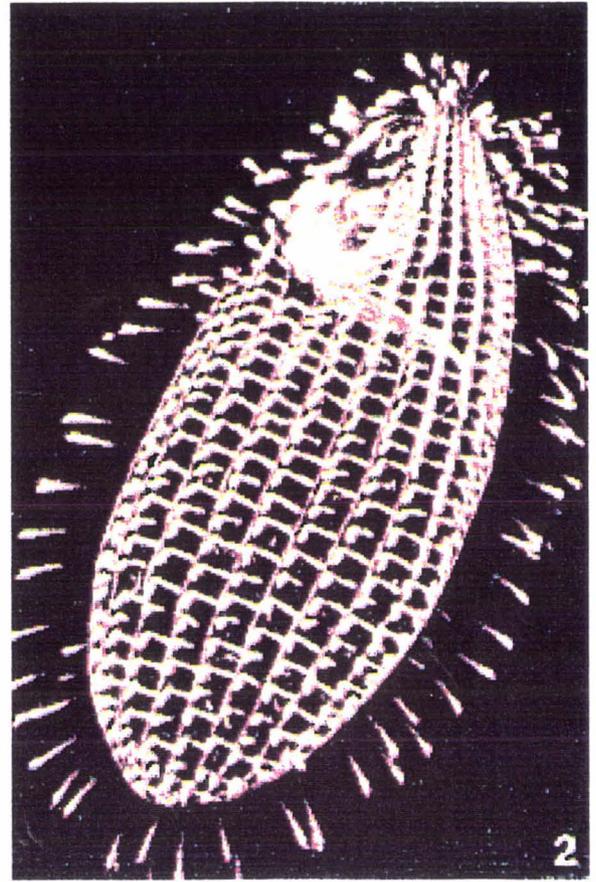


Figure 2 : Vue générale de *Tetrahymena* sp

A gauche : x 1500 - Laboratoire de Microbiologie des Fermentations, ISA, LILLE

A droite : x 2800, appareil ciliaire marqué à l'antitubuline, microscopie confocale, cliché de A. Fleury, Laboratoire de biologie cellulaire, Faculté de Paris XI, Orsay

Chaque espèce sexuée d'un complexe est en réalité un ensemble de souches qui peuvent se conjuguer sexuellement et étaient regroupées auparavant sous le terme de *Syngen*. Ainsi, *Tetrahymena thermophila*, l'une des espèces de *Tetrahymena* les plus étudiées actuellement et celle qui fait l'objet de notre travail est le nom actuel d'une espèce sexuée du complexe *pyriformis* qui était désignée auparavant par le terme *T. pyriformis Syngen 1*. Mais même actuellement la classification et le nom attribué à chaque espèce et souche prêtent à confusion. On rencontre couramment dans les publications des noms différents pour la même espèce ou souche.

Les espèces les plus étudiées d'un point de vue génétique (facilité d'obtention et de sélection de mutants, Suhr-Jessen et Orias, 1979) appartenaient auparavant au *Syngen 1*. *T. thermophila* a une tolérance unique pour les hautes températures, d'où sa désignation spécifique. Les procaryotes thermophiles peuvent certes supporter usuellement des températures plus élevées, mais la capacité de tolérer 40°C est considérée comme bonne chez un eucaryote (Nanney et Mc Coy, 1976). Citons d'autres espèces ayant déjà fait l'objet d'applications :

- *T. pyriformis* GL : modèle physiologique et biochimique du genre (premier cilié obtenu en culture axénique, Lwoff, 1923)
- *T. rostrata* : objet d'études pour la culture en masse et production d'acide γ -linoléinique (Saliba, 1984)

En 1940, Furgason (1940) crée le genre *Tetrahymena*. Il s'avère rapidement que ce sont les Ciliés les plus faciles à cultiver en milieu stérile. En 1953, Corliss (1953) parvient à séparer les différents genres et crée la famille des *Tetrahymenidae*. En 1976, Nanney et Mc Coy (1976) font de *Tetrahymena thermophila* une espèce à part entière

I.3. BIOTOPE

Tetrahymena est un organisme d'eau douce largement distribué sur l'ensemble du globe. Dépendant vis à vis de nombreux facteurs écologiques tels que la température, la salinité, le pH, la lumière, la teneur en oxygène dissous, cette espèce colonise des milieux aussi divers que des flaques temporaires, des mares, des lagunes voire des sources thermales chaudes. (De Puytorac *et al.*, 1987).

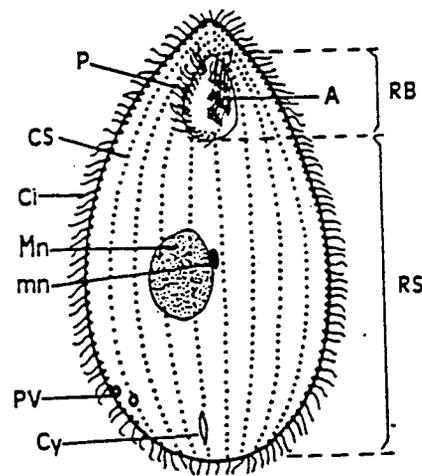


Figure 3 : Schéma d'une vue générale de *Tetrahymena* (d'après De Puytorac *et al.*, 1987)

A : organes adoraux. Ci : cils. CS : cinétie somatique. Cy : cytoprocte. Mn, mn : macro, micronoyau. PV : pore de la vacuole pulsatile. RB : région buccale. RS : région somatique. P : organelle paroral ou membrane ondulante.

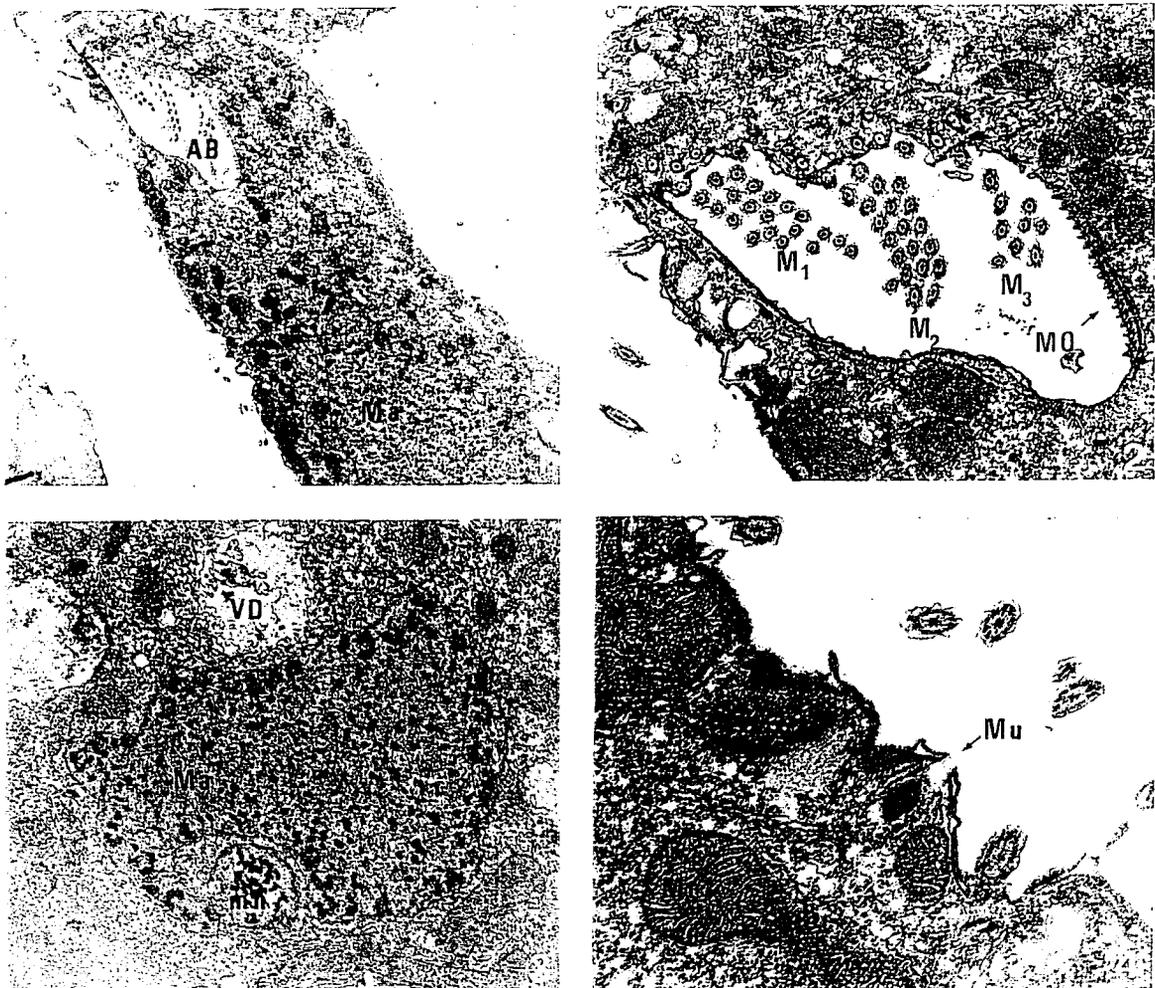


Figure 4 : Structure interne de *Tetrahymena thermophila*

(1) x 3000, AB : appareil buccal, Ma : macronoyau. (2) Appareil buccal, x10000, M1, M2, M3 : membranes adoraux, MO : membrane ondulante, (3) x 8500, mn : micronoyau, VD : vacuole digestive. (4) x 24000, Mt : mitochondrie, Mu : mucocyste. Clichés de D. Dive, Unité INSERM 42, V. d'Ascq

I.4. NUTRITION

Dans la nature ce cilié essentiellement bactériophage, secondairement histophage (peut être un parasite facultatif de larves de chironomes ou un endoparasite obligatoire du tube digestif des escargots et des limaces (De Puytorac *et al.*, 1987)) est capable dans une certaine mesure d'utiliser la matière organique dissoute : il s'intègre dans la chaîne trophodynamique détritivore où son rôle régulateur des populations bactériennes paraît essentiel à l'équilibre des biotopes où il vit.

I.5. MORPHOLOGIE

I.5.1. Morphologie externe (figure 2, page 8)

Les *Tetrahymena* sont de taille variable (30 à 50 μm). Tous les cils sont issus des cinétosomes ou granules basaux (appelés blépharoplastes) qui sont réunis par un ensemble fibrillaire, le cinétodesme. Les cinétosomes sont disposés en files longitudinales antéro-postérieures et chaque rangée ciliaire porte le nom de cinétie. Des cils buccaux fusionnent pour former une membrane ondulatoire parorale et trois membranelles adorales (ce qui est à l'origine du nom *Tetrahymena*). Certains composés tels que la sérotonine, les catécholamines (Castrotrad *et al.*, 1988), ou encore le calcium (Renaud *et al.*, 1987) stimulent la régénération des cils.

Les *Tetrahymena* se nourrissent par passage à travers la membrane et par ingestion des particules ou des proies figurées (phagotrophie). Les particules sont entraînées vers une invagination de la surface ou péristome, au fond de laquelle se trouve l'ouverture buccale proprement dite ou cytostome qui se prolonge à son tour par un canal, le cytopharynx. Les particules ou les "proies" ingérées sont englobées dans une petite vacuole digestive ou gastriole. Après digestion, les déchets sont éliminés en un point fixe de la paroi ectoplasmique, le pore anal ou cytoprocte (Blum et Greenside, 1976).

Il semble que le phénomène d'endocytose et d'évacuation présentent une périodicité pour des cellules alimentées ou non (Ricketts, 1971).

I.5.2. Morphologie interne

Dans l'endoplasme, on observe d'autres organites cellulaires importants et bien caractéristiques des ciliées en général (figures 3 & 4).

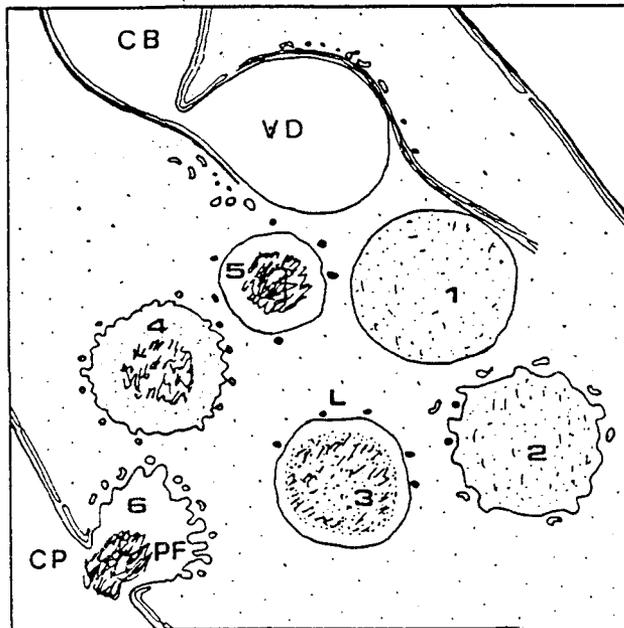


Figure 5: Appareil digestif de *Tetrahymena*
(d'après NILSSON, 1979)

Une vacuole digestive (VD) en formation est ouverte sur la cavité buccale (CB). La VD néoformée (1) est sphérique et quitte la région de cytostome. La vacuole diminue de taille et le contenu intravacuolaire se concentre. Les lysosomes (L) fusionnent avec la vacuole et il se forme un halo caractéristique (3). Ensuite, une partie du contenu vacuolaire est soustraite sous forme granulaire par micropynocytose (4). La vacuole est entourée de lysosomes (5) et montre que les hydrolases vont être recyclées. Les éléments non digérés sont excrétés sous forme de pelote fécale (PF) au niveau du cytoprocte (CP) (6).

I.5.2.1. Les vacuoles digestives (figure 5)

La nourriture ingérée ne passe pas directement dans le cytoplasme mais dans des vacuoles. Ces organites se forment au fond du cytopharynx puis s'individualisent.

Après fusion avec des lysosomes pour former des phagolysosomes, la nourriture est exposée aux enzymes hydrolytiques. Il se passe des cycles de changement à l'intérieur de la vacuole menant à la digestion de l'aliment et à l'éventuel rejet de résidus non digérés (Elliott et Clemmons, 1966). La micropinocytose au niveau de la membrane vacuolaire fait que les aliments digérés sont transportés dans le cytoplasme. Les résidus non digérés restent dans la vacuole et sont agglomérés sous forme d'une pelote fécale qui sera rejetée au niveau du cytoprocte. Plusieurs vacuoles peuvent fusionner avant egestion et donc plusieurs pelotes fécales sont alors expulsées en une seule fois (figure 5, Nilsson, 1977).

Par ailleurs, *Tetrahymena* possède des vacuoles autophagiques qui apparaissent en phase stationnaire de croissance ou sous l'effet d'un stress. Le processus de digestion de ces vacuoles aboutit à la destruction de matériel ribosomal, mitochondrial et nucléaire et du réticulum endoplasmique.

La séquence des évènements impliqués dans la digestion est commune à la plupart des protozoaires hétérotrophes. Les mécanismes d'alimentation et de digestion sont traités dans l'ouvrage de Nisbet (1984).

Les vacuoles présentent une activité rythmique et servent de pompe osmotique, rejetant l'eau absorbée par le cytoplasme hypertonique ou celle qui a pénétré dans la cellule au moment de l'ingestion des aliments (Rifkin, 1973).

Les enzymes lysosomales sont des hydrolases acides. Certaines de ces enzymes peuvent être excrétées. Nielsen et Villadsen (1985) ont montré que l'activité exocellulaire de la RNase, DNase, de l' α et de la β -glucosidase provient de l'expulsion vacuolaire. En effet, les vacuoles pulsatiles jouent aussi un rôle excréteur et déversent leur contenu en dehors par un ou plusieurs pores fixes préexistants qui sont au nombre de deux dans le complexe *pyriformis*. La position de ces pores est aussi utilisée pour la classification des *Tetrahymena*.

Nielsen et Villadsen (1985) ont aussi suggéré que la phosphatase acide est localisée dans les lysosomes qui fusionnent avec les vésicules de pinocytose. Cette enzyme serait donc excrétée dans le milieu de culture par pinocytose.



Figure 6 : Division cellulaire de *T. pyriformis* (x 1000)

(A) : avant la division. (B) : fin de l'édification de l'appareil buccal du futur ophiste. (C) : fin de la stomatogenèse et début de la séparation des deux cellules filles. Clichés de A. Achbarou, Unité INSERM 42, V. d'Ascq

I.5.2.2. Le système nucléaire (figures 3 et 4, page 10)

Tetrahymena se différencie des cellules animales classiques par une autre structure particulière. Comme tous les protozoaires ciliés, elle possède un double appareil nucléaire comprenant :

- un micronoyau diploïde correspondant à la lignée germinale des eucaryotes supérieurs. Il n'intervient activement que lors de la reproduction sexuée. Il contient peu d'ARN et pas de nucléole. Lors de la division cellulaire, il subit une mitose vraie avec le même matériel génétique distribué entre les cellules filles ;
- un macronoyau polyploïde (40nm) - c'est l'amplification d'une structure micronucléaire ; il correspond à la lignée somatique des eucaryotes supérieurs. Riche en ARN, il contient de nombreux nucléoles. C'est au travers de ce noyau que s'expriment les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la cellule.

Bien que la division du macronoyau conduise à une répartition inégale de l'ADN, sa valeur moyenne se conserve dans un clone grâce à des systèmes de régulation (Madireddi *et al.*, 1994).

Au cours d'une croissance synchrone, il a été montré que les quantités d'ADN, d'ARN et des protéines cellulaires doublent au cours d'un cycle cellulaire. L'ARN et les protéines cellulaires augmentent de façon continue (Phillips et Lloyd, 1978).

Quelques espèces de *Tetrahymena* (*pyriformis*, *elliotti*, *furgasoni*, *lwoffii*) sont dépourvues de micronoyau et sont donc incapables de se reproduire par conjugaison.

I.6. REPRODUCTION

Dans des conditions favorables, les souches asexuées et sexuées de *Tetrahymena*, et des ciliés en général se reproduisent par fission binaire. La souche GL de *T. pyriformis* originellement isolée par Gelei et Lwoff est entretenue ainsi depuis 1923 (figure 6).

Le cycle cellulaire se déroule, comme dans toute cellule eucaryote, en quatre phases, que reflète bien l'évolution des macromolécules intracellulaires au cours du cycle (figure 7, page 16). Généralement le micronoyau se divise en premier. La durée du cycle cellulaire est influencée par de nombreux facteurs qui seront détaillés lors de l'examen des conditions de culture.

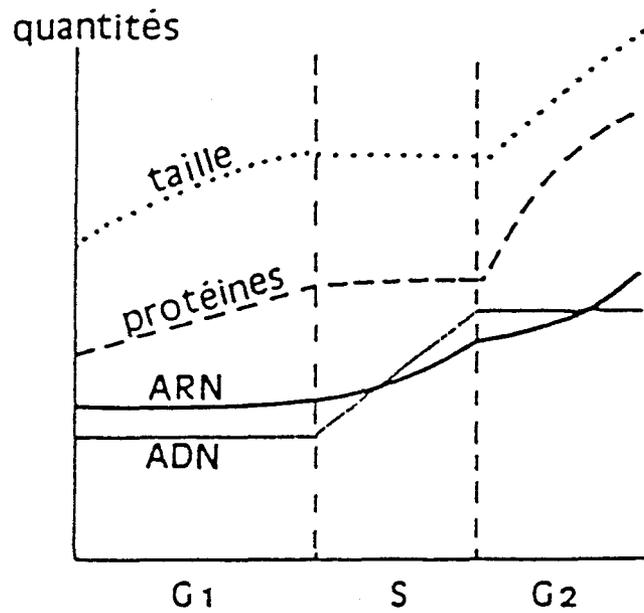


Figure 7 : Evolution de la taille de la cellule, des teneurs en ARN, ADN et protéines au cours du cycle cellulaire chez *T. pyriformis*. La phase D n'est pas représentée. D'après De Puytorac *et al.* (1987)

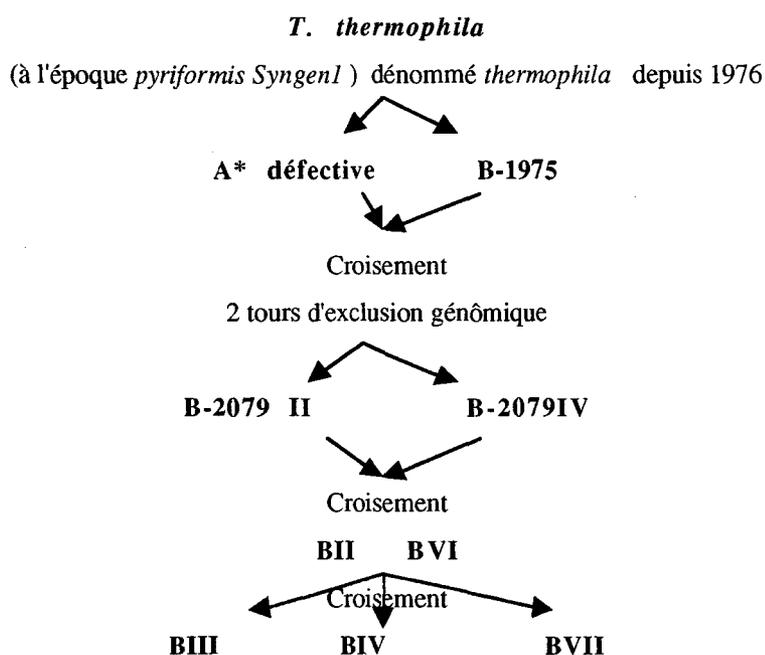
C'est dans des conditions défavorables, en particulier en cas de manque de nourriture, qu'apparaît la reproduction sexuée.

Deux souches sexuées (ayant un micronucléus) appartenant à la même espèce ou *Syngen* peuvent se reproduire par conjugaison (figure 8, page 18), avec échange réciproque d'informations génétiques. L'infaciliature et l'appareil buccal se différencient en cours de conjugaison, puis se redifférencient juste avant que les cellules ne se séparent. Au sortir de la conjugaison, la multiplication végétative peut reprendre jusqu'à la conjugaison suivante.

I.7. OBTENTION DE SOUCHES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

A partir des souches dites « innées », il a été possible d'obtenir des souches modifiées par les techniques combinées de l'exclusion génomique et des croisements. Si nous prenons l'exemple de la souche BIII de *Tetrahymena thermophila*, la désignation BIII désigne la souche comme membre de la famille "innée" B des souches qui expriment le type III. L'origine de cette famille est décrite par Nanney *et al.* (1955). Van Bell et Williams (1983) ont décrit l'obtention de la souche B-III (schéma ci-dessous) : Les souches B-2079-II et B-2079-VI ont été obtenues par deux tours d'exclusion génomique (Allen, 1967). Au premier tour la souche B-1975 a été croisée avec la souche déficiente A*. Les exconjugants d'une simple paire ont été recroisés au second tour, donnant les caryonides isogéniques BII et BVI.

Après plusieurs années en culture les souches BII et BVI ont été croisées et les souches progéniques BIII, BIV et BVII ont été isolées.



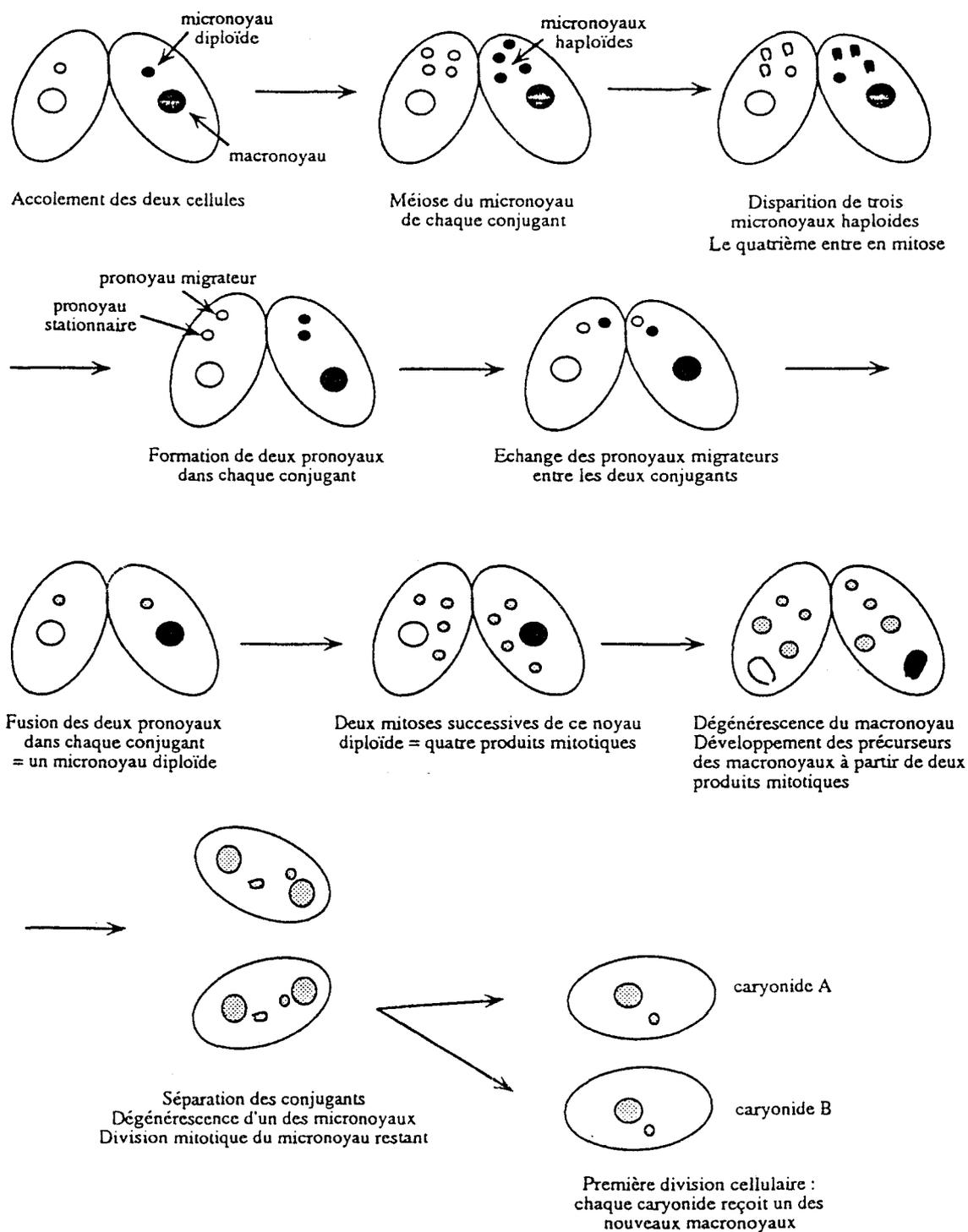


Figure 8 : Les étapes de la conjugaison chez *Tetrahymena* (d'après Hill, 1972)

De nombreux clones sont BIII. Nous n'avons pas ici l'intitulé complet mais par exemple si celui-ci était B1868 III, on pourrait en déduire que la souche est issue de la 18ème génération d'accouplement et que le croisement qui a produit cette souche a été réalisé en 1968. Dans leur récente revue, Nanney et Simon (2000) retracent l'histoire de l'évolution des différentes souches de *Tetrahymena*. Orias *et al.* (2000) ont publié une revue des souches intéressantes de *Tetrahymena* ainsi que les modalités pratiques de leur culture et de leur maintenance

I.8. PHYSIOLOGIE ET NUTRITION DE *TETRAHYMENA*

I.8.1. Besoins nutritionnels

Les substances indispensables à la croissance de *Tetrahymena* sont généralement connues et plusieurs milieux de culture complètement artificiels ont été proposés. Ces milieux doivent contenir les vitamines, les éléments minéraux, les dix acides aminés et les précurseurs d'acides nucléiques (Elliott, 1973 ; Hill, 1972) présentés ci-après.

I.8.1.1. Besoins en azote (tableau 1, page 20)

I.8.1.1.1. Acides aminés

Les besoins en acides aminés de *Tetrahymena* sont similaires à ceux des animaux ; comme eux, *Tetrahymena* n'utilise que les L acides aminés.

En général les acides aminés essentiels pour un groupe sont ceux qui nécessitent le schéma enzymatique le plus élaboré pour leur biosynthèse. Les acides aminés peuvent être fournis sous forme libre ou sous forme peptidique et protéique (milieux complexes).

Evans et Witty (1979) ont montré que la croissance de *Tetrahymena* se ralentit quand la quantité d'histidine, d'isoleucine, de leucine ou de phénylalanine est en excès par rapport aux autres acides aminés.

A de faibles concentrations en acides aminés, la croissance de *Tetrahymena* peut être stimulée par l'addition à un milieu synthétique d'hémine ou de phospholipides (Christensen *et al.*, 1992).

Les protéines ont une valeur nutritionnelle plus élevée sous forme dénaturée que sous forme native chez *Tetrahymena* (Viswanatha et Liener, 1956 ; Orias et Rasmussen, 1979).

Hunter *et al.* (1981) ont montré que la croissance de *Tetrahymena* dans des milieux contenant des peptides de grande taille (30-50 kDa) est plus importante.

Tableau 1 : Acides aminés et précurseurs d'acides nucléiques indispensables à la croissance de *Tetrahymena* (d'après Hill, 1972)

	Composés actifs dans le remplacement* ou la diminution du besoin	Composés inhibiteurs* ou inactifs dans le remplacement du besoin	Remarques
Acides aminés			
Arginine	Citrulline, ornithine, proline		En présence d'un excès de sérine, conversion accrue de l'arginine en ornithine
Thréonine			En présence de suffisamment d'acide folique, synthèse de sérine à partir de thréonine
Méthionine	Cystine, homocystine	N-lauryl-DL-méthionine*, choline, DL-méthionine*, vitamine B12	Transporteur membranaire commun à la phénylalanine. Protège <i>Tetrahymena</i> contre les radiations UV
Valine		Analogues hydroxylés	Dégradation de la valine en succinyl CoA
Leucine	α -cétisocaproate*, N-acétyl*-, N-propionyl* et N-butyryl-L-leucine*	L-lauryl*-et N-salicyl-L-leucine* α -hydroxycaproate	Forte induction du mécanisme d'ingestion par les acides aminés neutres hydrophobes
Isoleucine	Acide β -méthyl- α -cétovallérique*	Acide β -méthyl- α -hydroxyvallérique	
Lysine			Seul acide aminé essentiel à ne pas être un inhibiteur de croissance quand sa concentration est élevée
Histidine	Carnosine*(= β -anayl-L-histidine) imidazololactate	Imidazole	Un manque en histidine avant le début de la synthèse d'ADN empêche la division cellulaire et réduit de 20% l'augmentation en ADN.
Tryptophane		Acide indole 3 pyruvique N-acétyl-tryptophane	Même remarque que pour l'histidine L'indole, produit de dégradation du tryptophane est toxique pour <i>Tetrahymena</i> .
Phénylalanine	Analogue cétonique et tyrosine		
Précurseurs d'acides nucléiques			
Purines : guanine	guanosine*, guanosine monophosphate* adénine, hypoxanthine	xanthine, acide urique	Pas d'incorporation de formate ou de glycine dans les purines. L'hypoxanthine produit final du catabolisme des purines, est excrétée.
Pyrimidines : uracile	uridine*, uridine monophosphate*	cytosine, thymine, thymidine, thymidine monophosphate, acide orotique, 5-méthylcytosine,	L'uracile, produit final du catabolisme des pyrimidines est excrété
cytidine	cytidine monophosphate*	5-méthyluridine, 5-méthyl-déoxycytidine	

I.8.1.1.2. Précurseurs d'acides nucléiques

Tetrahymena ne peut croître sans une source externe de purine. Toutes les enzymes de la voie de synthèse *de novo* qui aboutit à la production d'inosine monophosphate (IMP) manquent, ainsi que celles qui convertissent l'IMP en guanosine monophosphate (GMP). La guanine est un élément indispensable. Elle est efficace aussi bien sous la forme de base libre que de nucléoside ou de nucléotide. Elle peut subvenir à elle seule à tous les besoins en purine.

Tetrahymena présente un besoin strict en pyrimidine. L'uracile peut à elle seule le satisfaire au contraire de la thymine ou de la cytosine (tableau 1).

La dépendance de *Tetrahymena* vis-à-vis des bases puriques et pyrimidiques en fait un organisme intéressant pour l'étude du métabolisme grâce à l'action inhibitrice ou non d'analogues de ces bases (Hill, 1972).

I.8.1.2. Besoins en vitamines (tableau 2, page 22)

Orias et Rasmussen (1977) remplacent dans le milieu de culture, l'acide folique par l'acide folinique, cela pour éviter des problèmes de solubilisation liés à l'acide folique.

Evans (1979) n'observe pas d'altération dans la croissance de *Tetrahymena* quand il réduit la concentration du mélange complet de vitamines. Par contre, lorsque les vitamines sont testées une à une, seule l'augmentation de la concentration en nicotinamide provoque une réduction significative de la croissance. Cette observation a trouvé une application directe dans les tests sur la valeur nutritionnelle d'un aliment puisqu'elle permet de baisser la quantité de vitamines dans le milieu de façon à éviter des concentrations élevées néfastes de niacine provenant de l'échantillon sur la croissance de *Tetrahymena*.

I.8.1.3. Besoins en éléments minéraux (tableau 2, page 22)

L'enrichissement en fer du milieu à base de protéose peptone entraîne une croissance bien meilleure de *T. pyriformis* GL et DIII (Rasmussen et Orias, 1976). Cet élément et le cuivre se révèlent indispensables pour certains mutants de *T. thermophila* dont la phagocytose est déficiente. Par rapport à la souche dont ils dérivent, il est nécessaire d'apporter 25 fois la concentration usuelle de ces deux éléments pour que ces mutants puissent croître. Ces mêmes auteurs montrent que la mixture des métaux à l'état de trace peut être remplacée par des sels de Fer et de Cuivre sans conséquences néfastes. D'autre part, l'apport de fer peut se faire sous forme d'hème (Suhr-Jessen et Rasmussen, 1982), les substances héminiques ne gênant en rien la croissance de *Tetrahymena* (Ethuin *et al.*, 1992 ; Ethuin, 1993).

Tableau 2 : Vitamines et éléments minéraux indispensables à la croissance de *Tetrahymena* (d'après Hill, 1972)

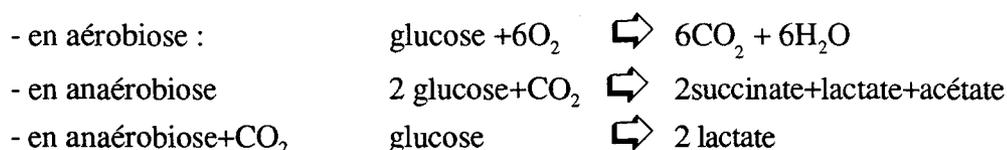
	Composés actifs dans le remplacement* ou la diminution du besoin	Remarques
Vitamines		
Lipoate (ou acide thiocitique)	acétate	Nécessaire à la formation d'acétyl CoA à partir de pyruvate. Si le lipoate est en quantité suboptimale il y a accumulation de pyruvate, d' α -cétoglutarate et d'a-céto-isocaproate en quantité suffisante pour être létales. Il intervient dans la décarboxylation oxydative d' α -céto-acides.
Thiamine		Elle intervient dans la décarboxylation d'a-cétoglutarate. La cellule utilise moins de thiamine s'il ne lui est pas nécessaire de transformer le pyruvate en acétate.
Riboflavine Pyridoxal Pyridoxamine Pantothénate		Les deux produits sont également actifs.
Folate	acide folinique*, thymidine, desoxycytidine, glycine, acide para-aminobenzoïque, créatine, vitamine B12	Meilleur que la pantothéine, la pantothéine phosphate et que le CoA. En concentration optimale seulement, il empêche l'inhibition de la croissance par les sulfonyle urées.
Niacine		Souvent cofacteur dans de nombreuses réactions métaboliques tel que l'hydroxylation de Phé, Tyr, Trp et des stérols. Impliqué dans la désaturation des acides gras.
		Le tryptophane même en concentration élevée ne peut la remplacer. L'iproniazide, analogue de la niacine, inhibe la croissance et la respiration du cilié.
Éléments minéraux		
Phosphore		Assimilé sous forme de phosphate L'entrée d'orthophosphate dépendrait de l'énergie libérée par la glycolyse Le glucose, le fructose, le mannose et le D-glyceraldéhyde augmentent l'accumulation d'orthophosphate tandis que l'acétate la diminue et que le pyruvate, l'éthanol et des glucides non métabolisés n'augmentent pas son entrée dans la cellule.
Potassium		Le cilié maintient en ions K ⁺ un niveau interne élevé par rapport aux ions Na ⁺ et au milieu extracellulaire.
Magnésium		Besoin démontré par l'ajout d'oxalate ou de citrate qui lient fortement les ions Mg ⁺⁺
Manganèse		
Zinc		
Molybdène		
Fer		Stimule la croissance chez <i>T. pyriformis</i> Indispensable pour certains mutants

Tetrahymena peut s'adapter à un milieu de pression osmotique très variable, allant de l'eau douce à saumâtre et jusque des conditions de salinité équivalentes à 65% de l'eau de mer (Hill, 1972). Sur une culture, environ 2% des cellules tolèrent le choc osmotique causé par une forte concentration en NaCl. Un pourcentage plus élevé de cellules peut s'adapter à des conditions hypertoniques, si l'augmentation de concentration se fait graduellement. Ces cellules sont capables de maintenir bas leur niveau interne de sodium.

I.8.1.4. Besoin en glucides

Bien que *Tetrahymena* présente un métabolisme des glucides semblable à celui des mammifères, il s'en distingue en possédant le cycle du glyoxylate pour la conversion des lipides en glucides et en n'utilisant pas le glucose comme première source d'énergie. En effet, dans des conditions appropriées de pH et d'acides aminés, la croissance de *Tetrahymena* dans un milieu exempt de glucides est similaire à celle effectuée en présence de glucides. Le glucose est surtout incorporé dans le glycogène et une très faible partie est utilisée dans la synthèse de lipides et de protéines via la glycolyse et le cycle de Krebs. Mais le glycogène peut être synthétisé aussi à partir de lipides et d'acides aminés (néoglycogénèse). Cette dernière voie dépend de la teneur en oxygène et des constituants du milieu de culture.

Suivant les conditions d'aération du milieu, la glycolyse produit différentes molécules (Hill, 1972) :



En anaérobiose et en l'absence de glucose dans le milieu de culture, c'est le glycogène qui est dégradé.

Le métabolisme énergétique, dans des conditions aérobies, semble dépendre de l'utilisation des lipides, protéines, ainsi que de la présence de substrats extracellulaires. La respiration est bien plus stimulée par de simples acides gras que par des substances glucidiques.

Cependant les glucides sont indispensables à une production optimale de cellules (Hellung-Larsen, 1988 ; Kiy et Tiedtke, 1992). En milieu synthétique cependant, les sources de glucides peuvent limiter les vitesses de croissance de *Tetrahymena* (Robert et Morse, 1980). Dans le cas d'une dilution de milieu synthétique, la croissance et la multiplication deviennent étroitement dépendants du glucose (Szablewski *et al.*, 1991).

I.8.1.5. Besoins en lipides

Tetrahymena pyriformis peut se développer en absence de lipides tant dans un milieu complexe que synthétique (Hill, 1972). Mais sa croissance peut être augmentée par addition d'acides gras, de phospholipides ou de stérols (Schousboe et Rasmussen, 1994 ; Christensen *et al.*, 1993) ; Rasmussen et Dive (1980) ont montré que certains phospholipides étaient de puissants stimulateurs de croissance, tant sous forme définie comme l' α -céphaline commerciale (phosphatidyl éthanolamine) que sous forme de mélange complexe (asolecithine, produit issu de lavages répétés à l'acétone de lécithine commerciale contenant approximativement des proportions égales de lécithine, céphaline et phosphatidyl inositol, et une petite proportion de phytosphingosine). Cette action est particulièrement nette avec les milieux synthétiques.

I.8.1.6. Facteurs stimulants

Tetrahymena produit et relargue dans le milieu de culture des molécules " signal ", appelées facteurs de croissance, qui doivent être présentes au dessus d'un certain seuil avant que la prolifération cellulaire n'ai lieu ; ce seuil de concentration est en relation avec la densité initiale de l'inoculum, et il a été montré l'existence d'une densité cellulaire critique de 750 cellules/ml. En dessous de ce seuil, les cellules de *Tetrahymena* meurent après quelques heures en phase stationnaire (Christensen *et al.*, 1994)

Toutefois, il a été démontré que des cellules inoculées à des densités de 250 cellules/ml ou moins pouvaient croître exponentiellement si certains "stimulants" lui étaient fournis, tels que :

- hémine et phospholipides : avec *T. thermophila*, quand ces substances sont ajoutées aux concentrations respectives de 7,5 μ moles/l et 50 μ g/l, à un milieu synthétique, le nombre de doublement de la population peut être multiplié jusqu'à un facteur 2 selon la concentration des acides aminés (entre 10 et 300 μ M) (Christensen *et al.*, 1992 ; Christensen *et al.*, 1996). Les auteurs attribuent cet effet stimulant au maintien grâce à ces substances d'un flux adéquat d'énergie dans des conditions défavorables (faible densité cellulaire par exemple).
- insuline : la présence d'insuline bovine à la concentration de 10^{-6} M dans un milieu synthétique limite la mortalité des cellules de *T. pyriformis* et améliore même leur prolifération par une diminution de 50% du temps de latence (Christensen, 1993 ; Christensen *et al.*, 1996). Cet effet n'est pas observé sur un milieu complexe tel que PPYS, le milieu jouant probablement lui-même le rôle de stimulant. L'auteur propose comme explication une interaction entre cette substance et des récepteurs dans la membrane plasmique responsable de la transmission du signal. À de faibles concentrations cellulaires,

l'insuline se substituerait aux facteurs endogènes en quantité alors insuffisante, évitant non seulement la mort des cellules mais stimulant aussi leur croissance.

I.8.2. Modes d'assimilation des nutriments

Les substances nutritives nécessaires à la croissance de *Tetrahymena* pénètrent dans la cellule grâce à différents organelles (Rasmussen, 1976). Il s'agit :

- des vacuoles digestives, visibles au microscope optique et contenant des particules de taille supérieure à 0,2 μm
- des vésicules pinocytiques de très petite taille
- de la membrane plasmique qui contient des sites de transport actif prépondérants devant les phénomènes diffusionnels.

Il convient de souligner l'importance du rôle des enzymes exocellulaires dans la nutrition de cet organisme (Florin-Christensen *et al.*, 1990).

La figure 9 (page 26) résume les connaissances acquises à ce jour sur les différentes voies d'assimilation que nous détaillerons ci-après.

I.8.2.1. La membrane plasmique

Diverses études mettent en évidence le rôle non négligeable de la membrane plasmique. Hoffmann *et al.* (1971) ont montré l'existence de systèmes de transport communs à plusieurs acides aminés. Les sites d'entrée des dipeptides diffèrent de ceux des acides aminés libres (Rasmussen et Zdanowski, 1980).

Les vitamines et éléments minéraux pénètrent dans la cellule via la membrane plasmique à condition d'être fournis en grandes quantités pour ce qui concerne le fer, le cuivre et l'acide folinique (Tiedtke *et al.*, 1988 ; Rasmussen et Orias, 1976).

Ces observations sont capitales car elles permettent de conclure, par l'étude de mutants thermodépendants *vac-* (dépourvus de vacuoles) que l'appareil oral et les vacuoles digestives ne sont pas indispensables à la croissance de *Tetrahymena*, ce qui lui donne la qualité de phagotrophe facultatif (Orias et Rasmussen, 1976).

Il faut noter que certains peptides, de petite taille, sont des agents de liaison quand ils sont utilisés en concentrations très faibles (micro ou nano M) ce qui prouve l'existence de récepteurs de liaison en surface des cellules (Leick, 1992).

Concernant la localisation de l'absorption membranaire, la surface cellulaire se décompose en trois régions : les sacs parasomaux, la membrane des cils et la cavité buccale.

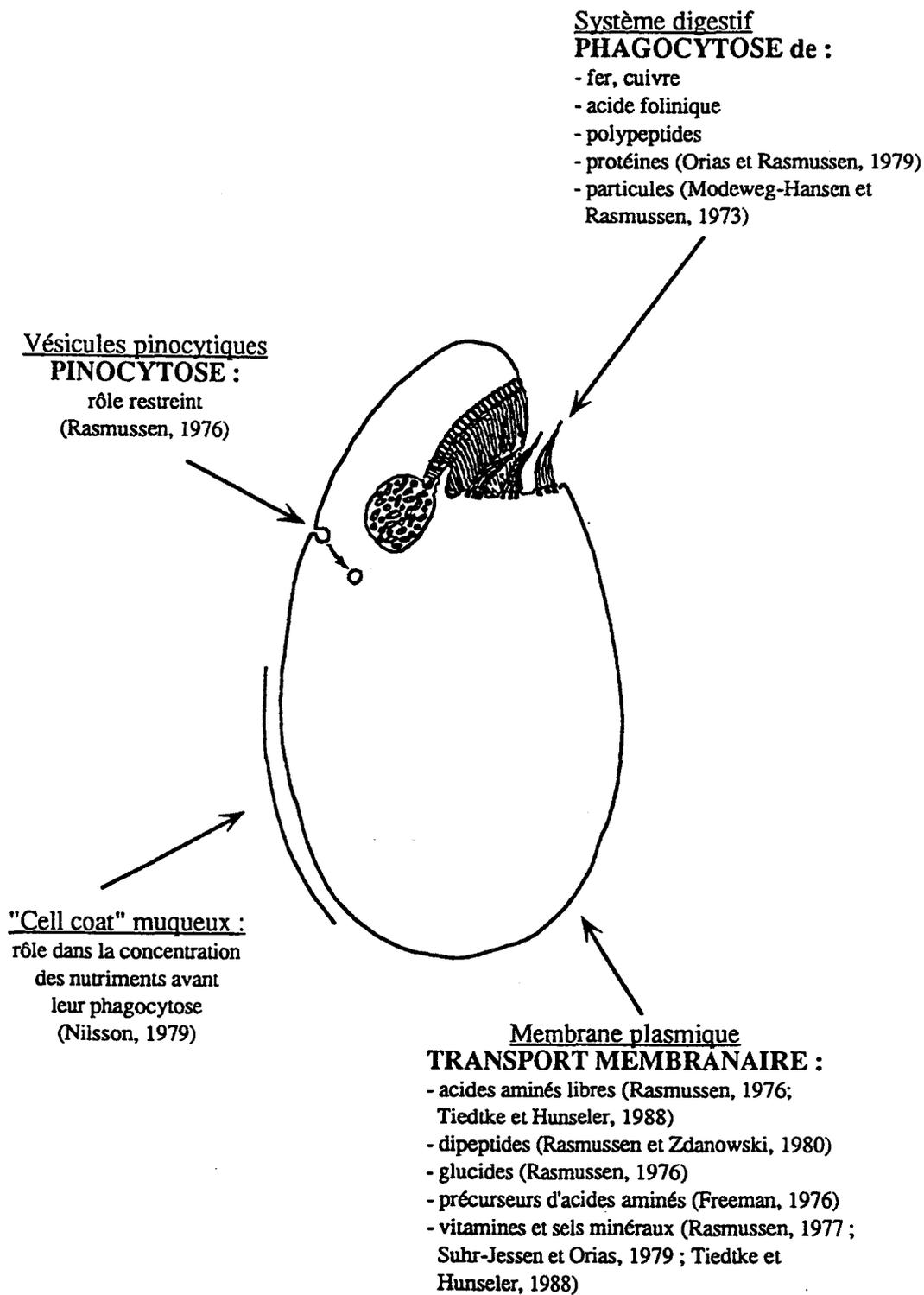


Figure 9 : Représentation schématique des différentes voies d'assimilation chez *Tetrahymena*

La quasi-totalité de la surface cellulaire est soulignée par des vésicules larges, aplaties et limitées par une membrane : ce sont les sacs parasomaux. Il est peu probable que les nutriments empruntent cette voie pour atteindre le cytoplasme car elle nécessite la traversée de deux unités membranaires. Toutefois, cette hypothèse proposée par Orias et Rasmussen (1976) pourrait être rediscutée à la lumière des connaissances actuelles sur la structure des sacs parasomaux qui communiquent à la fois avec le milieu extracellulaire, intracellulaire et entre eux (De Puytorac *et al.*, 1987).

Les cils présentent une seule unité membranaire mais leur base n'est pratiquement occupée que par les cinétosomes, ce qui rendrait difficile le passage des nutriments transportés. Par contre, les membranes orales et cytopharyngiennes sont de meilleures candidates. Cette hypothèse est attrayante puisqu'elle laisse libre le reste de la surface cellulaire pour une organisation structurale plus complexe (Orias et Rasmussen, 1976).

Concernant ces cils, plusieurs travaux ont montré que *Tetrahymena* subit une attraction vers les acides aminés, les peptides et les protéines. Par contre, il subit une répulsion de la part d'un certain nombre de composés organiques. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse que les cellules ont élaboré des récepteurs spécifiques pour détecter des substances biochimiques telles que des peptides, alors que des composés chimiques organiques et des ions minéraux agirait plus directement sans user de ces récepteurs spécifiques. Leick *et al.* (1994) ont par exemple montré, par l'emploi d'un inhibiteur de chémoattraction, le cycloheximide, que *Tetrahymena* possède une mémoire à court terme durant son adaptation à un milieu, ce qui revêt une certaine importance pour sa capacité de migration vers une substance nutritive :

en effet, des inversions d'orientation des cils surviennent à certains intervalles de temps et sont à l'origine d'un arrêt de la migration cellulaire. Puis les cellules poursuivent leur migration vers la substance. En présence de cycloheximide, un inhibiteur puissant de la chémoattraction, la suppression de l'inversion ciliaire induite par la substance attractante est abolie, les cellules deviennent insensibles à la substance.

I.8.2.2. Les vacuoles digestives

I.8.2.2.1. Ingestion des protéines

Orias et Rasmussen (1979), travaillant sur le mutant NP1 *vac-*, ont montré que les cellules sauvages se développent normalement en présence d'albumine native ou coagulée comme seule source d'acides aminés, ce qui n'est pas le cas du mutant. L'appareil oral serait donc la seule voie d'accès des protéines.

Viswanatha et Liener (1956), ainsi que Orias et Rasmussen (1979) ont montré qu'un système de concentration des protéines dans l'appareil oral serait plus efficace vis-à-vis des protéines dénaturées.

Nilsson (1979) et Orias et Rasmussen (1979) soulignent par ailleurs que sans un système de concentration des éléments nutritifs, le volume de milieu ingéré dans les vacuoles digestives au cours d'un cycle cellulaire n'est pas suffisant pour subvenir aux besoins de la cellule.

La capacité du système oral à concentrer du milieu de culture et des particules nutritives permet donc à la cellule d'assimiler les quantités de nutriments nécessaires à son bon développement.

1.8.2.2.2. Ingestion du fer et du cuivre

Rasmussen et Orias (1976) montrent que l'appareil oral joue un rôle beaucoup plus important dans le cas du Fer et du cuivre que le système membranaire : grâce à la compétition entre les ions H^+ et l'ion métallique pour le groupe donneur d'électrons du ligand, l'abaissement du pH augmenterait la concentration du Fer " libre " et le rendrait disponible pour les mécanismes de transport situés sur la membrane de la vacuole digestive (Rasmussen et Orias, 1976).

Par ailleurs, Suhr-Jessen et Orias (1982) ont démontré que c'est l'entrée du complexe fer-citrate qui est grandement facilitée par la vacuole digestive. L'ajout de citrate sert à chélater le fer et à solubiliser les précipités qui se formeraient sans lui et qui introduiraient une source de variabilité de la croissance de culture à culture. L'emploi de citrate évite cet inconvénient.

1.8.2.3. La digestion exocellulaire

Nous avons vu que *Tetrahymena* peut réaliser de deux façons différentes l'assimilation des nutriments :

- membrane plasmique : nutriments de faible masse moléculaire
- vacuoles digestives : digestion de bactéries, particules ou molécules de masse moléculaire élevée.

Florin-Christensen *et al.* (1990) ont montré que la membrane plasmique joue aussi un rôle dans la digestion de substrats organiques complexes, grâce à l'exocytose d'hydrolases acides, qui peuvent soit rester fixées sur la membrane, soit être libérées dans le milieu extérieur.

1.8.2.3.1. Les enzymes exocellulaires

Les enzymes lysosomales sont présentes dans toutes les cellules animales, y compris chez *Tetrahymena* et l'ensemble des Ciliés. Mais ces enzymes sont aussi présentes dans le milieu

extracellulaire de cette cellule. Cela fut considéré de prime abord comme une conséquence inévitable de l'exocytose des lysosomes secondaires autrement dit de l'évacuation des vacuoles digestives contenant encore des enzymes actives (Florin-Christensen *et al.*, 1989). Le rôle de ces enzymes va probablement consister à dégrader de grosses molécules nutritionnelles en unités solubles plus petites pour les transporter à travers la membrane plasmique. Von Figura et Hasilik (1986), Gabel *et al.* (1983) ont montré l'importance du rôle des enzymes lysosomales chez les eucaryotes supérieurs par l'étude de dysfonctionnements cellulaires d'origine lysosomale.

Parmi les protozoaires vivant à l'état libre (Munro, 1985) deux seulement sécrètent des enzymes exocellulaires, *Acanthamoeba castellanii* et *Tetrahymena pyriformis* & *thermophila*. *A.castellanii* sécrète de la N-acétyl-muraminidase, enzyme lui permettant de lyser les parois bactériennes. D'après Dickie et Liener (1962a, 1962b), ainsi que Nilsson (1979), *Tetrahymena* relargue plusieurs glycosidases en grandes quantités, de la DNase, de la RNase, une phosphatase et de petites quantités de protéase. De plus *Tetrahymena* sécrète une enzyme bactériolytique capable de dégrader les parois des Streptocoques (Vick *et al.*, 1979). Enfin, des phospholipases à activité hémolytique ont plus récemment été mises en évidence (Florin-Christensen *et al.*, 1985).

La quantité d'hydrolases secrétées varie avec l'âge de la culture. Ainsi, les cultures jeunes relarguent de grandes quantités d' α -glucosidase et de RNase et un peu de phosphatase. En vieillissant, la libération de phosphatase acide augmente, celle d' α -glucosidase aussi et la ribonucléase diminue (Rothstein et Blum, 1974b).

En général les enzymes exocellulaires sont stables dans le temps : pour deux échantillons à deux densités cellulaires différentes incubés à deux températures différentes (28°C et 37°C), il n'y a pas de perte d'activité sur 6 h pour aucune des 7 enzymes observées (Nielsen et Villadsen, 1985).

Quel est le mécanisme d'excrétion de ces enzymes dans le milieu ?

Hohman et Bowers (1984) ont étudié le mécanisme de sécrétion des hydrolases lysosomales chez *A. Castellanii*. Ce processus est énergie dépendant et ne concerne pas les autres protéines cellulaires. Les hydrolases secrétées peuvent être séparées en deux groupes sur la base de leur cinétique de sécrétion : l'un est sécrété à environ 15% de l'activité cellulaire par heure et l'autre à environ 5%. À l'intérieur de la cellule cependant, les hydrolases lysosomales se trouvent presque exclusivement dans les lysosomes secondaires, où les hydrolases présentent un attachement à la membrane pH-dépendant. La sécrétion d'hydrolase n'est pas le résultat de la fusion des lysosomes secondaires avec la membrane plasmique puisque les contenus solubles et particuliers ne sont pas relargués à la même vitesse. Ces données suggèrent aux auteurs que les hydrolases secrétées sont captées dans des vésicules navettes bouclant un cycle entre les

Tableau 3 : Enzymes synthétisées par *Tetrahymena* (d'après Munro, 1985)

	Exocellulaire	Intracellulaire
Enzyme		
phosphodiesterase	x	
phospholipases	x	
phosphatase acide	x	
désoxyribonucléase		x
ribonucléase	x	
glucosaminidase	x	
β -N-acétyl-D-hexoaminidase		x
N-acétyl muramidase	x	
α -amylase	x	
β -galactosidase		x
α -glucosidase	x	
β -glucosidase	x	
α -mannosidase		x
protéase	x	
ribozyme		x

lysosomes secondaires et la surface cellulaire. La membrane interne et le contenu de ces vésicules montrent une variation de pH sensible quand, suite à la fragmentation des lysosomes, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique. Ce rapide changement de pH et l'attachement des hydrolases à la membrane sous contrôle du pH expliqueraient l'hétérogénéité des cinétiques de sécrétion d'hydrolase.

Chez *Tetrahymena*, les études sur le mode d'excrétion des enzymes ont été réalisées en parallèle chez une souche sauvage et chez une souche mutante, celle-ci étant :

- soit bloquée dans la formation de vacuoles (*vac -*) (Nielsen et Villadsen, 1985)
- soit bloquée dans la sécrétion d'enzymes lysosomales (*sec -*) mais capable de former et de libérer des vacuoles digestives (ou phagolysosomes) (Hunseler *et al.*, 1987, Kiy *et al.* 1993, Banno *et al.*, 1993))

ce qui permet de savoir si les enzymes exocellulaires sont excrétées par ces vacuoles.

Le tableau 3 présente l'ensemble des enzymes lysosomales identifiées ainsi que leur origine intracellulaire ou exocellulaire.

Kiy *et al.* (1993) ont proposé, après étude de l'activité des enzymes lysosomales dans différentes fractions subcellulaires de *Tetrahymena thermophila*, un modèle général de répartition des enzymes lysosomales (figure 10, page 32) en trois pôles différents, déterminant la destination des enzymes (intracellulaire, liées à la membrane ou libérées dans le milieu). Si Blum et Rothstein (1977) avaient émis l'hypothèse d'une libération des hydrolases par le cytoprocte en même temps que des débris cellulaires, Tiedtke *et al.* (1984) ont montré plus tard que cette libération d'enzyme se faisait sans relargage de composants intracellulaires d'une part, et était stimulée par la présence de cations divalents en général et plus spécifiquement de calcium dans le milieu extracellulaire, d'autre part. Pour compléter des résultats, Tiedtke *et al.* (1988) ont mis en évidence l'indépendance entre la sécrétion d'hydrolases d'une part, et d'autre part les principaux processus de recyclage des membranes, à savoir l'égestion de vacuoles digestives et la libération de mucocystes. En effet ces deux phénomènes peuvent se produire sur un mutant bloqué dans la sécrétion d'hydrolases, suggérant ainsi que la sécrétion d'hydrolases acides n'est pas un effet secondaire du recyclage de la membrane.

Le schéma proposé par Kiy *et al.* (1993) précise celui proposé par Müller (1972) qui, par centrifugation en gradient de densité d'homogénats cellulaires, avait mis en évidence une distribution bimodale pour toutes les enzymes lysosomales. Les deux populations distinctes de vésicules étaient désignées comme lysosomes à basse et haute densité ; Müller avait considéré la

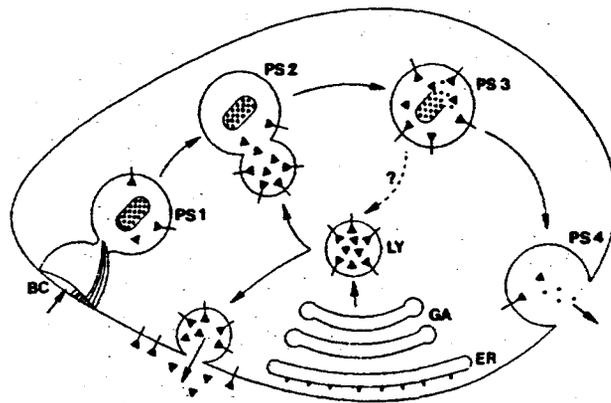


Figure 10 : Représentation schématique des voies de production de l'activité enzymatique lysosomale (d'après Kiy *et al.*, 1993)

Les enzymes lysosomales synthétisées dans le réticulum endoplasmique (ER) passent à travers l'appareil de Golgi (GA), formant des vésicules lysosomales (LY). Elles peuvent fusionner avec les phagosomes se formant (PS1) à partir de la cavité buccale (BC) pour former des phagolysosomes (PS2 et PS3), dont les contenus sont expulsés après digestion (PS4). Alternativement, les LVs peuvent fusionner avec la membrane plasmique, libérant des enzymes solubles dans leur environnement, ou leur donnant la possibilité de rester liées à la membrane.

sous-population “ haute densité ” comme la source des enzymes sécrétées. Ethuin *et al.* (1992) ne trouvent pas de corrélation entre l’absence de vacuoles digestives et l’excrétion de différentes activités enzymatiques. Banno *et al.* (1993) ont montré, concernant la sécrétion d’ α -glucosidase, que la déficience du mutant est due à une certaine altération de la membrane qui empêcherait la fusion de la membrane lysosomale avec les vésicules sécrétrices.

Bencsath *et al.* (1993) ont montré qu’un champ électrique et des impulsions électriques produisaient des augmentations significatives quoique variables dans l’activité β -D-hexoaminidase de *Tetrahymena thermophila*.

1.8.2.3.2. Enzymes liées à la surface membranaire

L’origine des activités hydrolytiques à la surface des cellules de *Tetrahymena* est inconnue ; certaines pourraient être liées à des protéines membranaires amenées à la surface par des vésicules exocytiques, d’autres pourraient être retenues à la surface cellulaire après leur excrétion dans le milieu extracellulaire (Tiedtke et Rasmussen, 1989). Plusieurs auteurs ont mis en évidence de telles activités. Zdanowski et Rasmussen (1979) ont observé une activité peptidasique dans le cytoplasme et à la surface externe de la cellule, suggérant que le rôle de la surface membranaire dans l’ingestion des nutriments a été jusqu’alors sous-estimée.

Tiedtke (1983) montre qu’une N-acétyl- β -hexoaminidase, probablement d’origine lysosomale, est uniformément répartie sur toute la surface cellulaire, ce qui est prouvé par des études sur des mutants *vac-*. Il attribue à cette enzyme une possible digestion extracellulaire de N-acétyl-chitinoligosaccharides. Enfin, Florin-Christensen *et al.* (1989) signalent une glucosidase et une phosphodiesterase liées à la membrane. Il est possible que les vésicules exocytiques transportent les hydrolases libres ou liées aux récepteurs membranaires. Le complexe récepteur-enzyme serait incorporé dans la membrane cellulaire, et une dissociation ultérieure de ce complexe contribuerait à la quantité d’enzymes libérées (Florin-Christensen *et al.*, 1989).

Ces observations nous montrent qu’il existe dans les vésicules membranaires des enzymes liés et d’autres non liés. Il reste à montrer le caractère sélectif de la libération d’enzymes dans le milieu extracellulaire (Munro, 1985).

1.8.2.3.3. Conséquences de l’activité enzymatique exocellulaire

De récentes études combinant l’utilisation de mutants d’une part et de milieux nutritifs synthétiques d’autre part, ont montré que ces enzymes exocellulaires jouent des rôles cruciaux et

jusqu'ici mal appréciés dans l'utilisation de nutriments et par conséquent dans l'écologie de ces cellules.

Les enzymes libres ou liées à la membrane sont actives envers les substrats exocellulaires. Les exoenzymes liées à la surface membranaire ne sont pas diluées dans le milieu environnant et libèrent des produits avec une concentration locale élevée à proximité de la surface cellulaire (Florin-Christensen *et al.*, 1989). Ceci est d'importance pour mieux comprendre l'écologie de *Tetrahymena*. Florin-Christensen *et al.* (1990) ont mis en évidence le rôle déterminant des hydrolases acides dans l'utilisation de nutriments complexes (grains de blé) en travaillant en parallèle sur une souche sauvage (CU399) et un mutant MS1 bloqué dans la sécrétion d'hydrolases acides. Ils ont ainsi montré que ces hydrolases permettent aux cellules sauvages d'utiliser les nutriments issus d'un grain de blé autoclavé et d'atteindre de fortes densités de population si la concentration en ions H⁺ est favorable (pH = 5,5). Les cellules mutantes, qui ne libèrent pas d'hydrolases acides dans le milieu ou à la surface membranaire, ne peuvent se multiplier, sans doute parce qu'elles ne peuvent hydrolyser les nutriments fournis par le grain de blé. On notera que les cellules de type sauvage et les cellules mutantes savent filtrer la nourriture en suspension dans le milieu et former des vacuoles digestives.

Depuis les années 1970, il est connu que les phospholipides de la surface membranaire de *Tetrahymena* sont en majorité des phosphonolipides très résistants à l'hydrolyse enzymatique. La phospholipase C exocellulaire a une activité hémolytique et il est possible qu'elle agisse *in vivo* sur les phospholipides de la membrane de *Tetrahymena* (Florin-Christensen *et al.*, 1986). Ceci aurait pour conséquence un enrichissement en phosphonolipides de la membrane. Dans l'hypothèse d'une coopération entre différentes phospholipases, la résistance des phosphonolipides à l'hydrolyse enzymatique explique comment ces organismes peuvent construire une membrane plasmique stable, à travers un mécanisme qui fait intervenir la dégradation des phospholipides. Florin-Christensen *et al.* (1986) suggèrent que chez *Tetrahymena* les phosphonolipides jouent un rôle de protection à la fois contre ses propres phospholipases excrétées et contre les phospholipases excrétées par les autres cellules. Les phospholipases de *Tetrahymena* les rendent capables de détruire leurs compétiteurs et leurs prédateurs sans se nuire à eux-mêmes.

De façon générale, la digestion extracellulaire est probablement bénéfique pour les ciliés coprophages ou nécrophages, ainsi que pour les protozoaires vivant dans des environnements riches en nutriments. Chez les protozoaires parasites, les enzymes extracellulaires jouent un rôle important en augmentant leur capacité à envahir leurs hôtes et à en digérer les tissus. En revanche, pour la plupart des espèces vivant à l'état libre, l'importance de la sécrétion enzymatique n'est pas évidente. En effet, ne s'agrégeant que rarement en grand nombre, leurs enzymes excrétées sont immédiatement diluées et ont donc peu d'effets (Rothstein et Blum, 1974b). Il a cependant été montré qu'un grand nombre de *Tetrahymena* pouvait aboutir à la lyse d'un prédateur tel qu'une amibe (Munro, 1985).

II / OUTILS CULTURAUX POUR LA PRODUCTION EN MASSE DE *TETRAHYMENA*

II.1. EXIGENCES DE *TETRAHYMENA* LIEES A LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE

Un milieu destiné à la culture en masse de *Tetrahymena* et en particulier à une utilisation industrielle doit :

- d'une part contenir dans des proportions suffisantes tous les éléments pour permettre une croissance très rapide, ainsi que l'obtention en phase stationnaire d'une population très élevée
- d'autre part être bon marché, standard et facilement disponible en grande quantité.

Ce milieu doit être stérilisable et ne pas renfermer d'éléments minéraux ou organiques susceptibles d'influencer défavorablement la croissance du protozoaire. Il doit être facile à préparer et doit permettre en fin de culture une séparation facile du cilié du reste du milieu.

Suite à l'étude des besoins nutritifs de *Tetrahymena*, nous savons que ce milieu doit apporter :

- une source d'acides nucléiques
- une source d'acides aminés essentiels
- une source de sels minéraux
- une source de vitamines.

L'extrait de levure est considéré pour le moment comme une des meilleures sources d'acides nucléiques et de vitamines.

Différentes sources d'acides aminés ont été testées. La plus connue est la protéose peptone utilisée par Plesner *et al.* (1964) dans le milieu PPYS (Proteose Peptone Yeast extract, Salt solutions). Ce milieu est couramment utilisé dans des études ne nécessitant pas une connaissance exacte de la composition du milieu de culture, mais son coût est assez élevé. Dive *et al.* (1986), comparant 10 peptones, ont montré que la peptone viande-foie peut remplacer à moindre prix la protéose peptone, avec une bonne croissance.

L'utilisation d'un hydrolysate d'hémoglobine décolorée (Dive *et al.*, 1989) permet une meilleure reproductibilité du milieu car la composition en acides aminés de l'hémoglobine est déterminée génétiquement. La pauvreté en isoleucine de l'hémoglobine est compensée par l'extrait de levure ; le milieu donne des résultats similaires au milieu de référence (PPYS).

Saliba *et al.* (1983) ont proposé un milieu simple et peu coûteux. La protéose peptone et les solutions salines du milieu PPYS ont été remplacées par du lait écrémé (milieu MYE). Le temps

de génération obtenu sur deux espèces de *Tetrahymena* est aussi bon qu'avec le PPYS, moins cher et plus facile à préparer. Ce milieu a été utilisé par Gosselin *et al.* (1989) pour produire de l'acide γ -linoléique avec *T. rostrata* à grande échelle.

Diverses sources azotées ont été testées par Tonon (1985) et Cailleret-Ethuin *et al.* (1998) dans le même but de remplacer le PPYS (produits de la pêche, sous-produits protéiniques végétaux et sous-produits laitiers) : lait écrémé et bas-beurre s'avèrent les meilleures sources d'acides aminés. Il est à noter que *Tetrahymena* utilise préférentiellement les peptides par rapport aux sucres (Hill, 1972, Ethuin, 1993).

Hellung-Larsen (1988) a montré que l'ajout de glucose à un milieu à base de proteose peptone augmente la concentration cellulaire maximale.

Plus récemment, Kiy et Tiedtke (1992) ont repris le milieu de Saliba *et al.* (1983) et ont montré que plus la concentration en glucose dans des cultures de *Tetrahymena thermophila* est élevée, plus la phase stationnaire est longue. De plus ils montrent que plus la concentration initiale en lait écrémé est élevée, plus la population maximale est élevée. Enfin ils postulent que le temps de génération très faible obtenu lors de leurs essais est dû partiellement à la nature particulière des protéines du milieu (pH <7,0). Cette idée a pour support le fait que les cellules cultivées dans un milieu à base de lait écrémé ont un grand nombre de vacuoles. De plus l'activité de la protéase extracellulaire, conduisant à une prédigestion des protéines peut contribuer à l'excellente croissance de *Tetrahymena* sur ce milieu. Ces observations et conclusions rejoignent celles de Saliba (1983) sur l'intérêt du milieu à base de lait.

Ethuin *et al.* (1992), travaillant dans cette optique ont proposé, suite à une étude réalisée sur *T. thermophila* SJ180 (mutant vac-) et *T. pyriformis* GL, un milieu composé uniquement d'extrait de levure et de glucose.

Parmi les espèces cultivées à l'échelle semi-industrielle, on trouve *T. rostrata* (Saliba, 1984), *T. pyriformis*, sur boue activée (Ayerbe, 1980) ; dans ce dernier cas l'auteur avait pour objectif de produire des protéines d'organismes unicellulaires à des fins nutritionnelles.

II.2. PARAMETRES PHYSIQUES AGISSANT SUR LA CROISSANCE DE TETRAHYMENA

II.2.1. Température

Selon les souches et les espèces de *Tetrahymena*, la température optimale va de 28 à 40°C. La limite inférieure tolérée semble être de 7°C. Les températures supérieures tolérées vont de 34°C pour *T. pyriformis* à 44°C pour *T. thermophila* (Hill, 1972).

Les cellules sont sensibles aux écarts de température. Il est donc nécessaire d'observer un temps d'adaptation lorsque l'on change de température de culture.

L'explication de l'adaptation aux températures extrêmes est à trouver dans la modification des phospholipides membranaires : la température aurait un effet sur le rapport acides gras saturés/acides gras insaturés des glycérophospholipides. L'addition de dérivés d'acides nucléiques ou de phospholipides dans un milieu chimiquement défini augmente de plusieurs degrés la température maximale tolérable (Conner et Stewart, 1976).

Le changement de température ne semble pas altérer le temps relatif de chaque étape du cycle cellulaire. Ainsi, malgré une grande variation des temps de génération, les différentes phases gardent les mêmes proportions (Elliott, 1973). Enfin, la température a un effet sur les périodes de reproduction chez *T. thermophila* (Perlman, 1973).

II.2.2. pH

L'évolution du pH durant la croissance dépend des constituants du milieu et du taux d'échange gazeux. Un manque d'oxygène entraîne une acidification largement contrebalancée par la formation d'ammoniaque, produit d'excrétion de *Tetrahymena* (Hill, 1972). En final donc le pH augmente. La présence d'oxygène abaisserait non seulement le taux de dégradation du glucose mais en plus elle favoriserait l'oxydation des cétoacides formés par désamination des acides aminés plutôt que leur fermentation en divers acides (Elliott, 1973). L'évolution du pH n'est pas un facteur limitant de la vitesse de croissance dans la mesure où il se situe dans la fourchette correcte. Prescott (1958) a montré sur *T. geleii* que la vitesse de croissance n'est réduite que de 5% tout au plus si le pH ne va pas au delà de 7,6.

Par contre, une augmentation excessive du pH (>7,5) diminue la population cellulaire en phase stationnaire (Suzuki *et al.*, 1993). C'est l'ammoniaque, produit azoté le plus excrété, qui est responsable de l'élévation du pH dans le milieu PPYS et qui cause une mort prématurée des cellules. La phase stationnaire est alors relativement courte. Par contre si l'on régule le pH pour qu'il ne dépasse pas 7,0, on augmente le rendement cellulaire d'environ 25% sans pour autant influencer la vitesse de croissance (Saliba 1984). Par ailleurs, quand le milieu au lait écrémé est supplémenté en glucose, la respiration est en partie inhibée et il se forme du succinate, du lactate et de l'acétate qui contrebalancent l'effet de l'ammoniaque, évitant que le pH ne dépasse la valeur critique (Saliba, 1984). C'est pourquoi le glucose devient inutile dans le milieu au lait si la régulation de pH est assurée par ailleurs (Kiy et Tiedtke, 1992). Ces observations confirment donc celles de Saliba (1984) exposées plus haut.

II.2.3. Oxygénation

Hofmann et Cleffmann (1981) ont montré que des concentrations en oxygène inférieures à 3mg/l réduisent sensiblement la vitesse de croissance d'une culture de *Tetrahymena*. Au delà de ce seuil, une augmentation de l'apport en oxygène a peu d'effet sur la densité cellulaire atteinte. Ceci est confirmé par les travaux de Berline *et al.* (1982) qui ont étudié l'influence du transfert d'oxygène sur des cultures de *Tetrahymena* en fermenteur : les cellules entrent en phase stationnaire de croissance lorsque l'oxygène est épuisé. *Tetrahymena* arrive donc à croître lorsque la concentration en oxygène est faible, alors qu'en présence du gaz pur, on observe une mortalité élevée. Avec une faible disponibilité en oxygène et un rapport volume de milieu/volume du récipient accrue, *Tetrahymena* accumule du glycogène (Elliott, 1973) et diminue sa croissance (Saliba, 1984). Les cultures jeunes (2 jours) consomment davantage d'oxygène que les cultures âgées (7-8 jours). Il existe une grande ressemblance entre des cellules sous-alimentées en oxygène et des cellules de cultures en fin de phase stationnaire. Leurs principales caractéristiques sont :

- une dégénérescence d'un grand nombre de mitochondries
- la présence de grandes vacuoles autophagiques remplies de débris
- une augmentation éphémère du nombre de gouttelettes lipidiques
- la formation de corps de fusion nucléolaires
- la diminution de la consommation d'oxygène et des enzymes de la respiration.

Dans les deux cas, le métabolisme de la cellule a changé de telle façon que les réserves de la cellule puissent alors subvenir aux besoins de l'organisme. Il est à noter également que l'oxygène, le dioxyde de carbone et l'ammoniac ont une influence sur les réserves lipidiques de *Tetrahymena*. Pendant la phase exponentielle de croissance, le palmitate est seulement incorporé dans les phospholipides, puis pendant la phase stationnaire, dans les glycérides et lipides exempts de phosphore. Durant cette phase en effet, l'incorporation de palmitate dans l'acide 2-aminoéthyl-phosphonique, composant membranaire, est en effet plus faible (Hill, 1972 ; Elliott, 1973).

II.2.4. Agitation

Ses effets sont liés à l'oxygénation ; une agitation circulaire de cultures en flacons augmente les temps de doublement. D'après Hoffmann et Cleffmann (1981), la concentration en oxygène ne peut être seule responsable de la réduction du taux de croissance puisque des cultures non agitées poursuivent leur croissance à un taux constant à des concentrations d'oxygène pour

lesquelles des cultures agitées sont déjà en phase stationnaire, Des modifications morphologiques des cellules ont par ailleurs été observées (Hellung-Larsen et Lyhne, 1992).

II.2.5. Particules en suspension

Rasmussen et Kludt (1970) ont constaté que le temps de division de 5 h sur milieu témoin passe à 44 h sur un milieu filtré sur membrane de porosité 0,22 μm . Les auteurs pensent que le filtre retiendrait entre autres des précipités de fer ou d'aluminium qui auraient un effet stimulant sur la multiplication de *Tetrahymena*. Rasmussen et Modeweg-Hansen (1973) ont montré qu'il est probable que l'effet des particules consiste à induire la formation de vacuoles digestives chez *Tetrahymena*, sans lesquelles la multiplication cellulaire et la croissance sont très lentes (albumine dénaturée par la chaleur ou particules de taille identique et inertes telles que polystyrene, dextran). Ils ont ajouté ces particules à de la proteose-peptone stérilisée par filtration.

II.2.6. Densité de l'inoculum initial

La densité de l'inoculum initial de *Tetrahymena* dans un milieu chimiquement défini (CDM) va déterminer l'aptitude des cellules à la croissance exponentielle. En dessous de 750 cellules/ml, les cellules n'atteignent pas cette phase exponentielle et meurent dans les 20 heures. L'addition de certains facteurs stimulants de la croissance évoqués plus haut, peut retarder la mort des cellules et même leur permettre de démarrer dans un délai dépendant de l'intensité du signal, c'est à dire de la concentration du facteur. Cela implique que l'expression d'un facteur de croissance autocrine puisse être nécessaire aux cellules pour croître, et que les facteurs stimulants activent la production de ce facteur, ou abaissent le seuil de densité cellulaire nécessaire à son action ; il est devenu ainsi possible d'abaisser le seuil à 250 cellules/ml (Wheatley *et al.*, 1993), puis à 1 cellule/ml avec un CDM additionné d'insuline 10^{-6} M mis au point récemment par Hagemester *et al.* (1999).

II.3. CULTURE EN MASSE DE *TETRAHYMENA*

II.3.1. Procédés généraux récents de fermentation

Les processus de fermentation récents nécessitent l'utilisation de technologies de séparation afin de retirer la biomasse de la phase liquide contenant les métabolites et produits secondaires

- soit pour valoriser cette biomasse et donc la récupérer en bon état,
- soit pour valoriser des métabolites.

De telles séparations liquide-solide sont souvent difficiles à mener et à transposer à grande échelle, en particulier pour la récupération de métabolites purs ; dans ce cas de figure précis, les méthodes traditionnelles comme la centrifugation et la filtration totale perdent tout leur intérêt. Voilà pourquoi de nombreux procédés mettant en oeuvre la microfiltration ou l'immobilisation des cellules ont été mis au point ces dernières années, d'abord appliqués à la culture de bactéries et de levures, puis à celle de protozoaires. De plus, en continu, le couplage à un module de microfiltration permet, outre un recyclage et une concentration des cellules, d'éliminer des métabolites secondaires pouvant nuire à la croissance (Anderson *et al.*, 1984). Dhulster *et al.* (1984) ont étudié l'immobilisation de cultures d'*E. coli* recombinées génétiquement dans des billes de carraghénane. La croissance des cellules à la périphérie des billes malgré le manque de support serait due à la limitation de la diffusion des nutriments et de l'oxygène. Ce phénomène entraînerait une concentration des cellules en périphérie de manière à atteindre les éléments nécessaires à leur croissance.

Les contraintes liées à l'utilisation du procédé de microfiltration tangentielle, telles que pression et vitesse d'alimentation qui contrôlent directement le flux et le niveau de récupération d'enzyme, ont été étudiés par Le et Atkinson (1985) sur des bactéries : l'adsorption non spécifique des protéines aux débris cellulaires pourrait affecter l'efficacité de la séparation. Les autres facteurs pouvant avoir une influence sur la séparation sont la force ionique et le pH.

Cheng-Kang *et al.* (1993) ont cherché à palier au problème de colmatage en injectant des bulles d'air dans le flux devant être filtré, ce qui gênerait la formation d'une sous-couche de cellules sur la membrane et donc augmenterait le flux. Il semble que cette technique soit plus efficace avec certaines cellules, et surtout plus efficace en ultrafiltration (concentration de métabolites) qu'en microfiltration. Des dispositifs utilisant deux cartouches à membrane de filtration ont été utilisés pour recycler la biomasse. Uribe Larrea *et al.* (1990) utilisent des membranes en céramique. Hellenbroich *et al.* (1999) ont comparé quant à eux des procédés de décantation et de sédimentation des cellules après immobilisation de celles-ci par maintien à basse température. Ce dernier préserve davantage l'intégrité des cellules.

II.3.2. Application à la culture en masse de *Tetrahymena*

L'utilisation de techniques de culture en masse comme la fermentation ou l'immobilisation de cellules de protozoaires, en particulier de *Tetrahymena*, est restée peu courante jusqu'aux années 1980. Dans les études requérant une quantité importante de cellules de *Tetrahymena*, les chercheurs ont longtemps utilisé plutôt les cultures en fioles, agitées ou non, avec un apport d'air

stérile (Nielsen et Villadsen, 1985 ; Hofmann et Cleffmann, 1981). Mais ces conditions de culture ne permettaient pas de recueillir des quantités importantes de cellules que réclamaient de nombreux domaines de recherche comme l'étude de la sécrétion et la caractérisation d'enzymes, l'amélioration de l'obtention de produits de bioconversion (Bamdad, 1992), les études comportementales ou cytogénétiques (Wheatley *et al.*, 1994).

Saliba (1984), travaillant sur *Tetrahymena rostrata*, a amélioré les résultats observés en fioles (8.10^5 à 10^6 cellules/ml), en le cultivant en fermenteur de 20 litres. La combinaison de la régulation de pH à la technique de fed-batch lui permet de multiplier par trois cette densité cellulaire. En outre, le fait de démarrer la culture à un pH de 5,5 réduit de 25% le temps de génération et les cellules peuvent être récoltées dans les 24h suivant l'inoculation. Le passage du volume de culture de 20 à 100 litres donne des résultats comparables, ce qui a permis à Gosselin (1989) de montrer que la production d'acide γ -linoléique par *Tetrahymena* était envisageable à l'échelle industrielle. Ethuin (1993) a mesuré l'influence des conditions de culture en batch sur la croissance de différentes souches de *Tetrahymena thermophila*, avec notamment des souches sauvages et des souches mutées dont l'appareil digestif n'était plus fonctionnel (absence de vacuoles digestives : souches vac-). Les résultats obtenus ont permis d'améliorer les conditions de culture et ont montré également qu'il était possible de faire croître en fermenteur des souches vac-. Plusieurs milieux de culture ont été formulés. Des cinétiques de fermentation ont également été suivies pour la production d'une enzyme-test : une protéase. La fragilité relative de ces cellules ont permis à l'auteur d'envisager une récupération facile des enzymes, que ces dernières soient excrétées ou intracellulaires.

Une technique de culture en masse de *Tetrahymena* mise au point sur *Paramecium* a été expérimentée avec succès. Elle consiste à utiliser, pour la culture statique, des sacs autoclavables en polypropylène de 5 litres (Giulian *et al.*, 1982). La microfiltration quant à elle a été utilisée par Shiloach *et al.* (1985) après un batch afin d'isoler et de purifier ensuite des hormones peptidiques sécrétées lors de cultures en fermenteurs de 100 à 300 litres sur un milieu chimiquement défini. La principale difficulté résidait dans l'obtention de cellules intactes bien qu'en phase stationnaire, ce qui impliquait l'utilisation d'un dispositif de microfiltration, moins agressif que la centrifugation.

Les procédés de culture à haute densité cellulaire sont parmi les moyens les plus efficaces d'augmenter le rendement tant en cellules qu'en produits, et c'est dans cette voie que s'orientent les travaux les plus récents dans ce domaine. Kiy et Tiedtke (1991) ont utilisé la technique d'immobilisation de cellules dans des sphères d'alginate pour produire des enzymes lysosomales. Lorsque les cellules sont encapsulées dans des sphères d'alginate de calcium pleines, elles ne se multiplient pas mais la survie des cellules et la diffusion d'enzymes montrent qu'il s'agit d'un bon support. Par contre, les sphères creuses d'alginate de calcium favorisent une bonne croissance et amènent en deux jours, en partant de 2.10^5 cellules/ml, la densité cellulaire à 9.10^6 cellules/ml alors que le maximum atteint par Saliba (1984) est de 3.10^6

Tableau 4 : Performances de quelques procédés de culture en masse expérimentés avec *Tetrahymena*

Référence	Procédé utilisé	Milieu de culture	Performances	
			Population maximale (cellules/mL)	Temps de génération (min.)
Saliba (1984)	Erlenmeyer 2L	MYE	$1,0 \cdot 10^6$	160
Saliba (1984)	Fermenteur 20L	MYE	$3,0 \cdot 10^6$	118
Saliba (1984)	Fermenteur 100L	MYE	$2,0 \cdot 10^6$	147
Shiloach <i>et al.</i> (1985)	Fermenteur (100L-300L) couplé à une microfiltration tangentielle	CDM	$6,4 \cdot 10^6$	180-240
Ethuin (1993)	Fermenteur 100L	YEG	$4,0 \cdot 10^6$	255
Kiy et Tiedtke (1991)	Cellules immobilisées	PPYS	$9 \cdot 10^6$	414
Kiy et Tiedtke (1992)	Module perfusé 2L	MYE	$2,2 \cdot 10^7$	84
Hellenbroich <i>et al.</i> (1999)	Fermenteur 1500L agité par aération	MYE modifié (glucose+fertilisant)	$2,0 \cdot 10^6$	205

cellules/ml. Le temps de génération de *Tetrahymena*, lorsqu'il est encapsulé, est plus long que dans les cultures de cellules libres et serait dû à un phénomène d'adaptation à l'encapsulation et/ou à des limites dans la diffusion de l'oxygène et des nutriments. Dans un tel système, il est possible de produire des enzymes lysosomales pendant 56 jours. Avec quelques précautions supplémentaires, comme la stabilisation des billes par du chlorure de calcium, l'utilisation de récipients aux surfaces lisses pour éviter l'endommagement des sphères et l'accoutumance des cellules au chlorure de calcium avant l'encapsulation, Kiy et Tiedtke (1991) ont pu transférer leur technique de la fiole au stade du réacteur et augmenter la durabilité des billes. Ils sont ainsi parvenus à maintenir une excrétion des activités enzymatiques excrétées durant 3 mois. Plus récemment, des essais de culture en continu ont été réalisés avec des bioréacteurs à membrane, au sein desquels les technologies liées au bioréacteur et celles liées à la membrane sont combinées. Kiy et Tiedtke (1992) ont choisi un réacteur perfusé, technique empruntée aux cultures cellulaires, pour produire *Tetrahymena* en quantités importantes ($2 \cdot 10^7$ cellules/ml). Il s'agit d'une fermentation en deux phases : la première est un batch avec un temps de génération descendant à 1,4 h (84 min.) ; dans un second temps le milieu (MYE) est échangé en continu grâce à un module de perfusion à base de fibres creuses microporeuses en polypropylène. Les concentrations cellulaires ainsi obtenues sont 30 à 40 fois supérieures à celles observées en batch classique, avec un temps de génération maintenu à 84 minutes. D'après l'estimation de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase (témoin de l'activité intracellulaire) dans le milieu, les cellules ne sont pas endommagées même à des vitesses d'agitation élevées. Par la suite, ils ont montré que cette technique d'immobilisation modifie la morphologie des cellules ainsi que la composition en ADN du macronoyau (Kiy et Tiedtke, 1993). Enfin, récemment, Hellenbroich *et al.* (1999) ont développé un système de culture à grande échelle pour la production en masse et l'extraction de *T. thermophila* sur un milieu complexe proche du MYE, basé sur le principe de l'agitation de la culture par la seule aération. La population maximale atteinte ne dépasse pas $2,0 \cdot 10^6$ cellules par ml qu'il s'agisse d'un réacteur de 15 L ou de 1,5 m³, contre $3,0 \cdot 10^6$ cellules par mL en réacteur de 15L agité par des pâles et le temps de génération est supérieur de près de 20%. L'ensemble des procédés évoqués ainsi que leurs performances sont présentés dans le tableau 4.

II.4. CONCLUSION

Tetrahymena bien que reconnu comme modèle cellulaire intéressant à de nombreux égards, a longtemps été éclipsé par d'autres organismes *a priori* plus faciles à cultiver comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Escherichia coli*. Mais les avancées de la recherche sur la physiologie, la biochimie, la génétique et d'autres facettes de la biologie de *Tetrahymena* d'une part, la simplicité des milieux de culture et la faisabilité des techniques de culture en masse de ce microorganisme d'autre part, constituent autant de preuves que nous ne faisons que commencer à

apprécier le potentiel de ce protozoaire en recherche fondamentale et appliquée. Nous disposons, grâce aux améliorations constantes des conditions de culture vu ci-dessus, d'atouts indéniables d'une part pour la récupération d'un matériel cellulaire de bonne qualité, d'autre part pour la purification, la caractérisation et la production de métabolites ou d'enzymes. Les objectifs de recherche sur *Tetrahymena* en biotechnologie concerneront principalement l'amélioration des conditions de sa culture en masse (âge, substrat, agents pharmacologiques, technologies de récupération cellulaire et de concentration des métabolites). Ces axes de recherche appliquée impliquent bien sûr une meilleure connaissance fondamentale en ce qui concerne les mécanismes d'induction et de répression.

III / POTENTIALITÉS DE *TETRAHYMENA* EN BIOTECHNOLOGIE

III.1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Selon Elliott (1973), *Tetrahymena* peut être utilisé comme substitut au modèle animal dans les tests concernant la qualité des aliments car il présente des caractéristiques similaires aux êtres supérieurs vis-à-vis de :

- la sensibilité aux déséquilibres en acides aminés
- l'utilisation des acides aminés vers des voies différentes de la synthèse protéique
- l'économie des protéines comme source d'énergie (impliquant l'utilisation des lipides et des glucides).

Mais Lhuissier (1983) préconise plutôt son emploi pour des études en toxicologie.

III.1.1. Etudes toxicologiques

L'utilisation courante du rat pour l'étude de la qualité protéique des aliments pose le problème du temps de croissance de l'animal et du prix, l'âge et l'état physiologique influençant la détermination du coefficient d'efficacité protéique (PER : Protein Efficiency Ratio). Evans et Witty (1980) ont passé en revue les avantages et inconvénients de l'emploi de *T. pyriformis* en remplacement du rat. Les essais microbiologiques nécessitent peu d'espace et d'équipement, et les déterminations sont plus rapides (Wang *et al.*, 1980). De plus, la corrélation entre la méthode utilisant ce cilié et celles classiquement employées semble en générale très satisfaisante (Evans et Witty, 1980). En revanche, Anderson *et al.* (1984) ont montré que *Tetrahymena* ne convient pas comme modèle pour la quantification de la lysine disponible dans les aliments ayant subi la

réaction de Maillard, bien que les résultats obtenus soient tout de même exploitables comme indicateur du dommage causé par un process technologique. Par contre il peut permettre de détailler la relation entre le besoin en lysine et la biosynthèse de carnitine (Hutner *et al.*, 1980).

Par ailleurs, la dépendance de *Tetrahymena* vis à vis des bases puriques et pyrimidiques en fait un des organismes de choix pour les études des effets inhibiteurs des analogues de ces bases (Hill, 1972). Enfin, si les tests microbiologiques utilisent souvent des bactéries pour le dosage de vitamines, *Tetrahymena* peut servir à estimer la teneur en vitamines du groupe B d'une part mais aussi des acides gras (acide lipoïque) dans les milieux biologiques (Hutner *et al.*, 1980). A titre indicatif Lhuissier (1983) a effectué le dosage de l'acide pantothénique dans le foie du rat avec ce cilié, et les résultats confortent ceux obtenus avec *Lactobacillus plantarum*. L'intérêt de l'emploi de ces nouvelles méthodes réside dans le fait que protozoaires et métazoaires ont fondamentalement la même organisation cellulaire, ce qui permettra de différencier les formes actives et inactives de ces substances.

T. pyriformis a déjà été utilisé comme modèle expérimental dans un certain nombre d'études toxicologiques ayant permis de considérer la faculté de phagocytose du protozoaire comme une forme de mécanisme de défense et donc comme un paramètre pouvant être examiné en présence de substances chimiques. Chez *Tetrahymena* en effet, l'endocytose survient par la formation de vacuoles digestives au niveau du cytostome.

Stefanidou *et al.* (1990) ainsi que De Jesus et Renaud (1989) ont mis en évidence l'action de drogues courantes (haschich, cocaïne, morphine...) causant une dépendance sur le processus de phagocytose. Il existe en effet chez *Tetrahymena* un récepteur opioïde (Renaud *et al.*, 1993). Salamanet *al.* (1990) ont montré également le développement d'un processus proche de la dépendance chez *Tetrahymena*, suggérant non seulement que le mécanisme subcellulaire responsable de la tolérance et de la dépendance vis-à-vis de drogues comme la morphine a été conservé dans l'évolution des espèces et est présente chez les eucaryotes inférieurs, mais aussi que ce cilié pourrait être utilisé comme un modèle pour étudier les bases moléculaires de la tolérance et de la dépendance. Enfin Bamdad *et al.* (1999) ont récemment mis en évidence et identifié un système de multirésistance à différentes drogues.

Nilsson (1993) s'est intéressé à la distribution intracellulaire chez *Tetrahymena* d'un sel d'or (aurothiomalate) couramment utilisé comme thérapie de l'arthrite. Ses observations lui permettent de montrer un mécanisme de détoxification du métal par le cilié.

Outre les variations de teneur en substrat métabolisable du milieu, certaines substances pharmacologiques peuvent influencer sur la vitesse d'ingestion des particules et/ou la sécrétion d'hydrolases acides (Rothstein et Blum, 1974c ; Csaba et Cserhalmi, 1985) :

- la sérotonine et la caféine augmentent la vitesse d'ingestion des particules mais n'altèrent en rien la libération des trois hydrolases étudiées (α -glucosidase, phospholipase et protéase)

- les cathécholamines n'affectent ni l'ingestion des particules, ni la libération des hydrolases, mais leurs antagonistes (dichloroisoprotérénol, phénoxybenzamine) inhibent l'ingestion et augmentent la libération d'enzymes.

Rothstein et Blum (1974c) expliquent ces observations par le fait que microtubules et microfilaments jouent un rôle dans le processus d'ingestion et que ce processus peut être contrôlé en partie par un système adrénérgique et sérotoninergique sous dépendance de l'AMP cyclique.

Tetrahymena a aussi pu être utilisé avec succès dans des études d'écotoxicologie (Schultz, 1999). La richesse du milieu PPYS pouvant masquer facilement la nocivité de certains composés, l'utilisation d'un milieu chimiquement défini, associé à une faible densité cellulaire est préférable (Wheatley *et al.*, 1994). Une caractéristique remarquable de *Tetrahymena* réside dans sa capacité à résister aux toxines ; sa réaction immédiate consiste à stopper toute migration et/ou à s'arrêter à l'étape du cycle de reproduction où elle se trouve. Mais bien souvent, les cellules récupèrent tout leur potentiel environ 80 à 100 minutes plus tard et retrouvent donc leur activité de prolifération. La capacité de ce cilié de "contourner" les effets d'une large gamme d'inhibiteurs, par exemple le cycloheximide, qui inhibe la formation des vacuoles et l'exocytose (Wang et Hooper, 1978), a justifié des investigations ultérieures plus poussées. Des protozoaires dont *Tetrahymena* ont pu être utilisés pour tester la toxicité de produits chimiques pouvant être rejetés dans les écosystèmes aquatiques (Schultz, 1990). Les tests sont basés sur des critères morphologiques, ultrastructuraux ou métaboliques selon le composé étudié. Grolière *et al.* (1992) ont mis en évidence l'action toxique du chlorprophame chez *Tetrahymena*. Ce pesticide de la famille des carbamates est très utilisé comme herbicide de pré-levée. Il est également employé pour contrôler la germination de certaines semences et pour inhiber le bourgeonnement des pommes de terre en cours de conservation. Or l'ensemble des résultats de Grolière *et al.* montre une toxicité importante du chlorprophame pour *T. pyriformis* alors que ce produit phytosanitaire est considéré comme peu toxique.

Dunham (1982) a étudié l'effet du milieu sur la toxicité de métaux lourds chez *T. pyriformis*, montrant que ceux-ci se lient à la matière organique du milieu de culture. Il met ainsi en évidence l'influence de la concentration en composés organiques du milieu sur la toxicité due aux métaux. Nilsson (1989) s'est aussi intéressé à l'action des métaux lourds, montrant une tolérance variable de *Tetrahymena* en milieu organique selon la nature du métal, avec une toxicité majeure observée pour le mercure et le cadmium. En milieu minéral, la toxicité des métaux lourds augmente, mais l'action du mercure semble légèrement affectée par l'absence de matière organique. Le calcium semble avoir un effet antagoniste sur la toxicité de certains métaux comme le cadmium et le plomb. Enfin, le pH du milieu influence la toxicité des métaux lourds. Nilsson propose deux voies d'entrée de ces métaux lourds dans la cellule, d'une part par la formation de vacuoles digestives, d'autre part par la membrane plasmique.

Tetrahymena s'est aussi révélé être un très bon modèle pour la détection de mycotoxines, celles-ci ayant un effet sur le temps de division des cellules. Les seuils de détection sont compris entre 0,02 ppb (trichothécènes) et 10 ppb (aflatoxines) (Bijl *et al.*, 1988). Benitez *et al.* (1994), travaillant aussi sur des mycotoxines, ont montré que leur action se traduisait par des altérations de la morphologie environ 3 heures après la mise en contact des cellules de *Tetrahymena* avec la toxine. Les seuils de détections qu'ils observent sont très faibles, à l'exception de la roquefortine, pour laquelle *Tetrahymena* présente un seuil plus élevé de détection que la bactérie *Bacillus stearothermophilus* (50 ppb contre 25 ppb). Enfin Schlimme *et al.* (1999) ont récemment mis au point un test rapide de détection de bactéries toxigènes à l'aide de *T. pyriformis*.

III.1.2. Etudes en biologie cellulaire

Dès le début de son étude, cet organisme s'est avéré très prometteur par le degré très élevé de synchronicité pouvant être induit par des chocs thermiques (Zeuthen, 1971). En génétique, des transformants de *Tetrahymena* ont d'abord été obtenus par micro-injection (Tondravi et Yao, 1986 ; Yu et Blackburn, 1989) ou par électroporation (Orias *et al.*, 1988 ; Gaertig et Gorovski, 1993) d'un plasmide circulaire muté comme vecteur, les vecteurs linéaires présentant certains inconvénients dont celui de ne pouvoir être amplifiés dans des cellules bactériennes. Plus récemment, Endoh (1994) a obtenu des transformants par transfection en présence de phosphate de calcium. Le plasmide vecteur a été construit à partir d'un plasmide bactérien, d'un gène de résistance à la néomycine dérivé d'un vecteur issu de la moisissure *Dictyostelium*, et d'un ADN chromosomique macronucléaire de 1,2 kb issu d'un cilié hypotriche, *Stylonychia*. Les transformants ont été obtenus à la fréquence de 1 pour 10^6 chez *Tetrahymena*, contre un pour 10^4 à 10^5 pour *Stylonychia*. Un vecteur simplement linéarisé par des enzymes de restriction n'arrive pas à donner de transformants. Par contre, lorsque le vecteur est linéarisé de telle sorte qu'il présente des séquences télomériques (structures protégeant les extrémités des chromosomes) à chacune des extrémités, la transformation est possible.

Les séquences des télomères de *Tetrahymena* ont été parmi les premières étudiées et continuent à faire l'objet d'investigation poussées, dans le but notamment de mieux comprendre, les mécanismes de cancérisation chez les eucaryotes supérieurs (Kirk et Blackburn, 1995).

Martindale (1989) a montré que *Tetrahymena*, différait d'autres ciliés dans l'utilisation plus fréquente par les gènes de certains codons " synonymes ". L'analyse des gènes de *Tetrahymena* indique que ceux à expression élevée durant une croissance cellulaire normale ont une tendance accentuée à utiliser ces codons synonymes, à la différence des gènes exprimés à de plus faibles niveaux durant la croissance ou pendant de brèves périodes comme la conjugaison. Ce mode d'expression des codons rend *Tetrahymena* plus proche des levures que des autres ciliés, fait encore inexplicable, dans la mesure où une corrélation entre la distance taxonomique et la

similarité du mode d'expression des codons a été mise en évidence chez les bactéries, suggérant que le langage des codons tend à être conservé de façon évolutive (Ikemura, 1985). En tout état de cause, cette singularité génétique de *Tetrahymena* devrait lui permettre l'attribution du caractère G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe), c'est à dire une absence de pathogénicité chez l'homme (Martindale, 1989 ; Gaertig et Gorovsky, 1993), ce qui est un atout précieux pour son utilisation comme outil en biotechnologie.

Il est également possible d'étudier sur *Tetrahymena* quelques uns des éléments régulateurs de base des cellules d'eucaryotes multicellulaires, comme :

- certaines amines biogènes neurorégulatrices (sérotonine) ou le calcium qui favoriseraient la régénération des cils (Renaud *et al.*, 1987) et la phagocytose, et ce à de très faibles concentrations (0,1 à 1 μ M) (Quinones-Maldonado et Renaud, 1987).

- certaines hormones comme les prostaglandines (Szablewski, 1993), la triiodotyronine (Csaba *et al.*, 1979), ou l'insuline (Bencsath *et al.*, 1994).

- certains activateurs de croissance comme des diacylglycérols, tetrapyrolles, etc (Rasmussen *et al.*, 1996) ce qui fait émettre aux auteurs l'hypothèse que ces mécanismes de contrôle au sein du cytoplasme, communs aux systèmes pluricellulaires et aux unicellulaires eukaryotes, trouvent leur origine chez ces derniers.

III.2. PRODUCTION DE MÉTABOLITES

III.2.1. Acides gras et hormones

Tetrahymena représente une source intéressante de métabolites, mais ce domaine reste encore peu exploré à l'heure actuelle.

Saliba (1984) a démontré que *T. rostrata* était une source naturelle d'acide γ -linolénique très intéressante sur le plan industriel et pharmaceutique. En effet, certaines prostaglandines, issues de l'acide arachidonique, sont à l'origine d'une agrégation plaquettaire irréversible qui aboutit à la formation de thromboses. Actuellement, la lutte contre ces prostaglandines nocives passe par des méthodes médicamenteuses (aspirine, corticoïdes...). Il serait préférable d'adopter une méthode physiologique basée sur le recours aux précurseurs biosynthétiques de prostaglandines douées de propriétés d'antiagrégation plaquettaire. L'acide dihomogamma-linolénique est un précurseur de choix mais il est rarissime chez les êtres vivants et très coûteux. Par contre, l'acide γ -linolénique, précurseur biosynthétique immédiat de l'acide dihomogamma-linolénique apparaît plus accessible, notamment chez *Tetrahymena* (25% de la masse des acides gras totaux). Saliba (1984) montre même que le mélange brut d'acides gras de *Tetrahymena* est un très puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire *in vitro*. Grâce à sa facilité de culture en masse,

Gosselin (1989) a montré que cette production d'acide γ -linoléique par *Tetrahymena* était envisageable à l'échelle industrielle.

Après avoir mis en évidence la sécrétion intracellulaire par *Tetrahymena* de peptides ressemblant à l'insuline, la somatostatine, l'ACTH, ou la relaxine, Shiloach *et al.* (1985) ont pu obtenir des quantités substantielles de ces peptides –sécrétés à raison de quelques picogrammes par g de cellules- en cultivant le cilié en fermenteurs de 100 à 300 litres sur un milieu chimiquement défini. La principale difficulté résidait dans l'obtention de cellules intactes bien qu'en phase stationnaire, ce qui impliquait l'utilisation d'un dispositif de microfiltration, moins agressif que la centrifugation. La présence de ces peptides hormonaux typiques des vertébrés chez des eucaryotes unicellulaires, ainsi que chez des procaryotes suggère que les systèmes nerveux et endocrines des organismes multicellulaires ont des origines, dans l'évolution, bien plus précoces que ce qui était admis jusqu'à présent.

III.2.2. Enzymes

Selon Munro (1985), les protozoaires sont une source intéressante d'enzymes pour un certain nombre de raisons.

III.2.2.1. Variété d'enzymes

La diversité des espèces (30000 pour les protozoaires, contre 13000 pour les bactéries et 100000 pour les espèces fongiques), celle des habitats, et enfin la souplesse d'alimentation rendent cette potentialité d'enzymes importante. Du fait de la grande diversité des sources de nourriture, l'ensemble de ces organismes requiert un grand nombre d'enzymes pour accomplir la digestion. En choisissant des espèces ayant des régimes particuliers, il est possible d'obtenir toute une gamme d'enzymes spécifiques. Au total environ 570 hydrolases de protozoaires ont été répertoriées parmi les 30000 espèces, dans la nomenclature des enzymes, mais seules quelques espèces ont été largement étudiées (*Trypanosomatides*, *Trichomonas*, *Paramecium*, *Tetrahymena pyriformis*). Il reste encore beaucoup de précisions à apporter sur les conditions optimales de production et d'action de ces enzymes.

III.2.2.2. Activité enzymatique

L'activité enzymatique peut se révéler élevée dans certains cas. Par exemple, les activités enzymatiques des phosphatases acides, nucléases et protéases de *Tetrahymena pyriformis* sont plus élevées que dans le foie du rat, source fréquente parmi les tissus mammifères de ce type d'enzyme (Rothstein et Blum, 1973; 1974b).

Tableau 5 : Potentiel de *Tetrahymena* comme source d'enzymes

Enzyme	Applications industrielles	Source actuelle	Référence
GLYCOSIDASES			
α -glucosidase	industries alimentaires	microbienne	Silberstein (1979), Hunseler <i>et al.</i> (1987) Tiedtke <i>et al.</i> (1988), Banno <i>et al.</i> (1987)
β -glucosidase	industries alimentaires	microbienne	Banno <i>et al.</i> (1987)
α -mannosidase	industries alimentaires	bactérienne	Banno <i>et al.</i> (1987), Blum (1976), Hunseler <i>et al.</i> (1987)
α -amylase	industries alimentaires	microbienne	Hunseler et Tiedtke (1988), Hunseler <i>et al.</i> (1987)
hyaluronidase	industries pharmaceutiques	bactérienne et animale	Munro (1985)
muramidase	industries pharmaceutiques	animale et végétale	Reynolds (1982), Davis <i>et al.</i> (1980) Vicks <i>et al.</i> (1979)
PROTEASES	détergents, modèles d'étude en recherche, industries alimentaires et pharmaceutiques	bactérienne ou animale	Ethuin <i>et al.</i> (1993) Ethuin <i>et al.</i> (1993) Zdanowski et Rasmussen (1979)
trypsine α -chymotrypsine peptidase			
NUCLEASES			
DNase	industries pharmaceutiques	animale	Nilsson (1939)
LIPASES	industries alimentaires et pharmaceutiques détergents	microbienne	Portois <i>et al.</i> (1999)

III.2.2.3. Production enzymatique

Le taux de production d'enzymes apparaît plus important chez les espèces à relargage enzymatique exocellulaire.

Le fait d'obtenir des enzymes exocellulaires d'une cellule eucaryote telle qu'un protozoaire présente deux avantages :

- la libération exocellulaire d'enzymes simplifie le processus de séparation et de purification ;
- la cellule eucaryote peut fournir des produits que ne peuvent fabriquer les procaryotes (protéines glycosylées par exemple).

La vitesse d'alimentation et de formation de la vacuole influent directement sur la vitesse de production des enzymes : les protozoaires ayant une vitesse d'alimentation et de formation de la vacuole élevée auront aussi des vitesses de production enzymatique élevées. Il est à noter que l'activité enzymatique et la vitesse de formation de la vacuole varient avec l'âge de la culture et l'état physiologique de l'organisme. Ces deux paramètres sont à leur maximum pendant la phase logarithmique de croissance et baissent vers la phase stationnaire.

Comme le souligne Munro (1985), les protozoaires ont longtemps été complètement ignorés comme sources d'enzymes pour une production et un usage industriels. D'une part, les études dans ce domaine ont été beaucoup moins intensives que pour les autres microorganismes, en dehors des formes parasitiques, d'autre part, il n'est pas toujours facile de cultiver les protozoaires à grande échelle.

III.2.2.4. Enzymes de *Tetrahymena* (tableau 5)

La plupart des études menées sur les enzymes de *Tetrahymena* ont été réalisées sur *T. pyriformis*. Les principales enzymes exocellulaires de *Tetrahymena* ont été citées dans les paragraphes précédents. Ce sont en majorité des hydrolases d'origine lysosomale (Blum, 1976). La principale caractéristique des enzymes de *Tetrahymena* réside dans le fait qu'elles subissent une glycosylation par acquisition d'unités phosphomannosyl, permettant la fixation des enzymes au récepteur mannose-6-phosphate et leur transfert conséquent vers les lysosomes ; mais d'autres mécanismes intracellulaires indépendants du récepteur mannose 6-phosphate existent probablement pour la libération des hydrolases acides vers les lysosomes (Gabel *et al.*, 1983), hypothèse confirmée par les travaux de Taniguchi *et al.* (1985) qui ont étudié les fractions glucidiques de la phosphatase acide et de l' α -glucosidase acide sécrétées dans le milieu de culture. Leur structure suggère qu'elles sont produites par une voie "alternative" dans laquelle la

fraction glucidique Glc3.Man5.GlcNAc2 fonctionne comme un donneur d'oligosaccharide. Cette hypothèse semble confirmée par Banno *et al.* (1993) concernant l' α -glucosidase acide. Cette glycosylation rend les enzymes de *Tetrahymena* plus proches des enzymes de mammifères des eucaryotes supérieurs que de celles des procaryotes.

A titre d'exemple, une glucosidase synthétisée par *Tetrahymena* présente jusque 45% d'homologie de séquence avec la même enzyme produite dans les cellules humaines (Alam *et al.*, 1996). Banno *et al.* (1987) ont mis en évidence l'hétérogénéité de la sécrétion (énergie dépendante) de quelques enzymes lysosomales, en phase de croissance et en milieu carencé. Ils déterminent trois classes d'enzymes selon leur cinétique de sécrétion :

- Premier groupe, celui des hydrolases à sécrétion lente, pour lequel environ 4% de l'activité cellulaire initiale est libérée par heure : phosphatase acide, β -glucosidase et α -galactosidase

- Second groupe, celui des hydrolases à sécrétion modérée (11 à 15% de l'activité cellulaire initiale libérée par heure) : α -glucosidase, α -mannosidase et β -galactosidase

- Troisième groupe, celui des hydrolases à sécrétion élevée (22% de l'activité cellulaire initiale libérée par heure), pour lequel on note un effet inhibiteur du cycloheximide : N-acétyl- β -hexosaminidase, protéase

Certains processus dépendant du pH seraient impliqués dans la régulation de la sécrétion et des voies différentes de biosynthèse des protéines expliqueraient les différences entre les cinétiques de sécrétion ; d'autres processus sont dépendants de la température (Banno et Nozawa, 1982) : De plus, un traitement par des bases faibles cause une inhibition de la sécrétion à différents degrés chez la phosphatase alcaline (groupe I), l' α -glucosidase (groupe II) et N-acétyl- β -hexoseaminidase (groupe III) ; cette inhibition suggère l'implication d'un processus pH-dépendant durant la sécrétion des enzymes lysosomales.

L'insensibilité de la sécrétion des enzymes des groupes I et II au cycloheximide indique que la biosynthèse des enzymes n'est pas une condition préalable à la sécrétion. Le comportement de la sécrétion de ces enzymes suggère que l'hétérogénéité des vitesses de sécrétion est seulement due à des différences dans l'attachement pH-dépendant des hydrolases aux membranes. Ces indications nécessiteraient plus d'investigations sur l'influence du pH afin d'en tirer des informations utiles dans le cadre d'une production industrielle. Florin-Christensen *et al.* (1990) ont montré depuis que l'action de certaines hydrolases est facilitée en pH acide.

Outre l'influence du pH, la sécrétion de ces enzymes est souvent liée à la composition du milieu de culture : Dickie et Liener (1962a) ont montré que *Tetrahymena* est capable de produire deux protéinases exocellulaires différentes selon que le glucose est présent ou absent dans le milieu.

Le glucose peut aussi diminuer la sécrétion de l'activité bactériolytique détectée par Vick *et al.* (1979). Aucune activité protéasique extracellulaire n'est observée durant une croissance équilibrée, alors qu'une telle activité a été mise en évidence quand les cellules sont cultivées sans agitation (manque d'O₂) (Nielsen et Villadsen, 1985 ; Banno *et al.*, 1982), ou transférées dans un milieu pauvre en nutriments (Suprinowicz et Allewell, 1979).

Quant à la capacité de digestion de ces enzymes, Viswanatha et Liener (1954) ont montré que *T. pyriformis*, souche W, était incapable d'utiliser des protéines (extrait brut de soja ou globulines de soja, serum albumine bovine ou ovalbumine) non dénaturées par chauffage (autoclavage à 1,5b durant 15 min.) ou par l'urée 6M. Mais la serum albumine bovine et l'ovalbumine résistent à une attaque protéolytique même sous forme dénaturée. Par contre le fibrinogène et la caséine sont hydrolysés même à l'état natif, la dénaturation n'apportant qu'une faible amélioration de l'hydrolyse. L'incapacité pour les protéases de *Tetrahymena* à digérer des protéines globulaires natives est une propriété commune avec la trypsine et certaines protéases bactériennes. La capacité de ce système enzymatique à digérer une protéine fibreuse comme le fibrinogène même à l'état natif constitue également une propriété commune avec la trypsine.

Ces informations nous permettent de nous intéresser davantage aux travaux d'extraction et de purification déjà réalisés sur ces enzymes, plus particulièrement les protéases et les glycosidases. Le tableau 6 (p.51) présente les glycosidases et protéases extraites et purifiées à ce jour. Dans une optique industrielle, les auteurs se sont attachés à trouver une parenté de ces enzymes, notamment pour les protéases avec des enzymes d'eucaryotes supérieurs connues, d'origine végétale ou animale.

Concernant les glycosidases, la parenté de l' α -glucosidase de *T. pyriformis* W, purifiée par Banno et Nozawa (1985), avec l' α -glucosidase lysosomale humaine présente un intérêt si l'on considère que la déficience de celle-ci chez l'être humain est à l'origine d'une maladie grave, la glycogénose de type II, aussi appelée maladie de Pompe. L' α -glucosidase de la souche *T. thermophila* CU399 purifiée par Banno *et al.* (1989) présente des similitudes avec celle de *T. pyriformis* W, les principales différences résidant dans leur réponse antigénique d'une part, et dans la thermostabilité de celle de *T. thermophila*, dont l'explication reste à déterminer, probablement par la connaissance complète des séquences en acides aminés et des structures tertiaires de chacune des deux enzymes.

Les trois protéases isolées et purifiées par Dickie et Liener (1962a,1962b) possédant le même acide aminé N-terminal, les auteurs suggèrent la possibilité d'une origine commune : la protéase intracellulaire, qui présente une activité plus importante, ne pouvant diffuser à travers la membrane cellulaire à cause de sa taille, pourrait subir un processus de fragmentation pour donner une ou deux protéases plus petites selon la présence ou non de glucose dans le milieu. Les trois protéases présentent la même spécificité de substrat.

Tableau 6 : Glycosidases et protéases de *Tetrahymena* extraites et purifiées

ENZYME Enzyme connue apparentée	souche	pH optimal	PM	origine	Catégorie	Référence
Glycosidases α -glucosidase lysosomale du foie humain	<i>T.pyriformis</i> W	4,0	110 000	extracellulaire	α -1,6 glucosidase et α -1,4 glucosidase	Banno et Nozawa (1985)
	<i>T. thermophila</i> CU399	4,5	105 000	extracellulaire	α -1,6 glucosidase et α -1,4 glucosidase	Banno <i>et al.</i> (1989)
Protéases papaïne- cathepsine B	<i>T.pyriformis</i> W	7,0		extracellulaire		Viswanata et Liener (1956)
	<i>T.pyriformis</i> W	7,0 - 8,0	17500	extracellulaire		
	<i>T.pyriformis</i> W	6,0 - 7,0	10400	extracellulaire		
	<i>T.pyriformis</i> W	5,5	29300	intracellulaire		Dickie et Liener (1962a, 1962b)
cathepsine B1 du foie humain	<i>T.pyriformis</i> E	3,5 - 8,0 (selon le substrat)	25000	intracellulaire		Levy <i>et al.</i> (1976)
cathepsine B	<i>T.pyriformis</i> WH14	neutre (6,5 - 8,0 selon le substrat)	21000 - 24000	extracellulaires	cystéine protéase	
cathepsine B		neutre (6,5 - 8,0 selon le substrat)	21000 - 25000	intracellulaire	cystéine protéase	Banno <i>et al.</i> (1982)
cathepsine B	<i>T.pyriformis</i> W	4,5 - 8,0 (selon le substrat)	22000 - 23000	extracellulaire	cystéine protéase	Banno <i>et al.</i> (1983)
cathepsine B - papaïne	<i>T.pyriformis</i> T	7,5 - 8,0	28000	extracellulaire		Murricaine (1986)
papaïne - cathepsine L	<i>T.pyriformis</i> W	8,0	28000	extracellulaire	cystéine protéase	Suzuki <i>et al.</i> (1997, 1998)

Tetrahymena pyriformis E contient une activité protéasique qui peut attaquer les protéines sur une large gamme de pH ; la plupart des données, notamment l'impossibilité de séparer différentes entités, indiquent que les activités envers l'azocaseïne à pH 8 et l'hémoglobine à pH acide sont dûes à une seule protéase (Levy *et al.*, 1976).

Cette hétérogénéité d'optima de pH est également observée par Banno *et al.* (1983), sur une protéase intracellulaire de la souche E de la même espèce. De façon générale, un pH optimum neutre est observé avec l'azocaséïne ou un substrat synthétique comme N α -benzoyl-DL-arginine-nitroanilide, et un pH optimum acide sur hémoglobine dénaturée ou verdohémoglobine. Ces auteurs mettent en évidence dans le même travail deux protéases extracellulaires. Les similarités qu'ils observent entre ces deux dernières et la protéase intracellulaire au niveau des propriétés physico-chimiques (pH optimum, activité spécifique envers un substrat synthétique et un substrat naturel, PM, Km...) apportent selon eux la preuve que les protéases intracellulaires sont sécrétées dans le milieu sans modification. Cette information est de première importance car elle va déterminer la meilleure conduite à tenir dans le cas d'une mise au point d'extraction de protéase au niveau industriel.

L'appartenance de ces enzymes à la classe des cystéines-protéases, déterminée par la nature des activateurs et inhibiteurs est un point commun, ainsi que leur poids moléculaire peu élevé (entre 10000 et 28000 Da). Les travaux de Straus *et al.* (1992) sur des extraits cellulaires, sans aller jusqu'à la purification des enzymes, mettent en évidence ce caractère commun cystéine-protéase pour presque toutes les activités protéasiques détectées dans les extraits.

Suzuki *et al.* (1997), travaillant sur une protéase extracellulaire, qu'ils nomment "tétraïne" vont plus loin sur le caractère cystéine-protéase : l'analyse par séquençage de l'acide aminé N-terminal suggère selon eux une forme mature de cystéine protéase, et la sensibilité de l'enzyme à certains inhibiteurs confirme son appartenance à la famille des papaïnes.

L'analyse par immunoblotting montre que la tétraïne est présente en plus grandes quantités dans le milieu de culture en phase stationnaire qu'en phase logarithmique. Ceci ajouté au pH optimum neutre ou légèrement alcalin suggère que la tétraïne a un rôle fonctionnel dans le milieu de culture en phase stationnaire car le pH du milieu de culture devient alcalin au fur et à mesure de la croissance. Dans une étude plus récente (Suzuki *et al.*, 1998) les auteurs caractérisent cette enzyme comme faisant partie de la sous-famille des cathepsines L ; l'analyse par microscopie d'immunofluorescence leur permet de montrer que la tétraïne est concentrée dans ou autour des vacuoles digestives cellulaires en fin de phase exponentielle, mais la coloration des vacuoles n'est pas évidente en phase stationnaire. Ces résultats laissent penser à Suzuki *et al.* (1998) que la tétraïne est synthétisée en phase exponentielle et est sécrétée dans le milieu de culture sous forme mature. Ces résultats confirment donc les hypothèses de Banno *et al.* (1982) sur l'origine de la similitude entre protéases extracellulaires et intracellulaires. Par ailleurs, il est intéressant de constater qu'une cathepsine L, de 36000 Da, a également été isolée récemment d'une éponge

Tableau 7 : Atouts de *Tetrahymena* en biotechnologie (d'après Wheatley *et al.*, 1994)

1	Facilement cultivable en culture axénique à grande échelle
2	Le milieu de culture (par exemple PPYS) peut revenir jusque cent fois moins cher que ceux utilisés pour les cultures de cellules de mammifères
3	Possibilité de croissance en milieu chimiquement défini
4	Besoins nutritionnels similaires à ceux des cellules de mammifères
5	Tolère de fortes variations de pression osmotique (pas d'osmolyse dans l'eau distillée) et de température
6	Possibilité d'atteindre des densités supérieures à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml rapidement (temps de génération de 1,5 à 2,5h)
7	Assimilé G.R.A.S. (absence de pathogénicité pour l'homme)
8	Sécrète, comme les cellules de mammifères, des protéines qui sont glycosylées, ce qui n'est pas le cas des levures et bactéries
9	Relargue des enzymes hydrolytiques d'origine lysosomale en grandes quantités, suffisantes pour une récupération industrielle
10	Entretien des souches facile, possibilité de stockage dans l'azote liquide
11	Du fait de sa mobilité, cet organisme colmate rarement les cuves de fermentation lors de cultures à grande échelle
12	Manipulable génétiquement ; nombreux mutants disponibles
13	Facile à isoler et à cloner
14	Importante littérature disponible sur <i>Tetrahymena</i>

marine, *Geodia cydonium* (Krasko *et al.*, 1997), nouvelle preuve s'il en était besoin de la parenté phylogénétique entre espèces eucaryotes.

Les hydrolases de *Tetrahymena* pourraient-elles entrer en compétition avec celles généralement utilisées dans différents secteurs industriels, sachant que la libération extracellulaire est d'une importance particulière au niveau commercial par simplification du process de séparation de l'enzyme et sa purification ? Il est possible de se monter optimiste si nous nous référons aux derniers travaux de Suzuki *et al.* (1997, 1998) mentionnés ci-dessus, qui montrent que les protéases extracellulaires ne sont que des formes matures des protéases intracellulaires. Concernant les industries agro-alimentaires (amidonnerie, brasserie, panification.....), les principales enzymes employées dans ce domaine (amylases, cellulases, protéases) sont obtenues actuellement à partir de champignons, bactéries ou plantes. *Tetrahymena* peut fournir des enzymes similaires mais il semble peu probable que celles-ci remplacent les sources courantes en termes économiques. Toutefois, les activités protéasiques et glycosidasiques sont couramment utilisées comme modèles de recherche dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et en recherche clinique pour l'étude de la structure d'autres protéines et la synthèse de peptides, en ce qui concerne les premières par exemple. De plus, la similarité de structure et de fonction de certaines des protéases de *Tetrahymena* avec celles du système digestif des eucaryotes supérieurs (tableau 7) renforcent leur rôle de modèle d'études physiologiques.

L'utilisation de *Tetrahymena* pour la production d'enzymes, ainsi que d'autres métabolites, dans le domaine des industries pharmaceutiques et de la biologie moléculaire est beaucoup plus probable que dans le domaine des industries alimentaires, avec la découverte et la mise en oeuvre d'enzymes difficiles à obtenir d'autres sources et ne pouvant être produites qu'en petites quantités, commercialisées comme produits enzymatiques hautement purifiés et à valeur ajoutée élevée. Par exemple, la désoxyribonucléase est présente chez plusieurs protozoaires, notamment chez *Tetrahymena* alors que la seule source actuelle est le pancréas de boeuf. Elle est utilisée en recherche et en analyse clinique pour réduire la viscosité des substances purulentes. La hyaluronidase, surtout présente chez les protozoaires parasites, réduit la viscosité des tissus et améliore les injections sous-cutanées et intra-musculaires. Elle est préparée à partir de bactéries et de substances séminale de mammifères. Quant à la muraminidase, c'est un agent mucopolysaccharidique qui agit surtout contre les bactéries à gram+ et, dans une moindre proportion, contre les bactéries gram- et certains virus. Cette enzyme peut être aussi utilisée dans les processus de stérilisation et d'extraction (Munro, 1985). Deux protozoaires apparaissent comme sources intéressantes : *Acanthamoeba castellanii* et *Tetrahymena pyriformis* (Munro, 1985).

Le domaine de la biologie moléculaire utilise aussi des systèmes catalytiques endocellulaires de *Tetrahymena* : les ribozymes. Ce sont des molécules d'ARN qui induisent une catalyse intramoléculaire (par exemple auto-clivage ou auto-épissage) ou qui agissent comme une enzyme

(Cech, 1988). Alors qu'en général les ribozymes testés ont une efficacité catalytique réduite et une gamme de substrat limitée, le ribozyme de *Tetrahymena* augmente le taux d'hydrolyse du RNA d'un facteur 10 par rapport à la réaction non catalysée et il divise toutes les molécules avec lesquelles il se lie. Herschlag et Cech (1990) montrent que ce ribozyme peut aussi catalyser le clivage d'un DNA simple-brin, avec de multiples turn-over. Les ribozymes suscitent aujourd'hui un vif intérêt en raison de leurs nombreuses applications potentielles, d'une part, et le renouveau concernant les spéculations sur l'origine de la vie que leur découverte a provoqué d'autre part.

La caractérisation de certaines de ces activités enzymatiques devrait permettre une meilleure compréhension de la physiologie de *Tetrahymena thermophila* d'une part, et montrera d'autre part si la totalité ou certaines des enzymes ici évoquées sont compatibles avec des procédés industriels d'extraction et de purification.

Wheatley *et al.* (1994) ont proposé dans une revue un résumé des caractéristiques avantageuses de *Tetrahymena* pour une utilisation en biotechnologie (tableau 7, page 56).



Au regard de ce que nous avons pu lire lors de cette étude bibliographique, notre projet d'étude se découpe en quatre parties. Au préalable, nous avons choisi notre souche de *Tetrahymena* en fonction des résultats d'Ethuin (1993) qui avait réalisé une étude comparative des comportements respectifs des souches SJ180 (mutant *vac*-) et BIII (non mutée). Cette dernière a été retenue, la souche *vac* – présentant les inconvénients suivants :

- Temps de génération supérieur
- Population maximale inférieure
- Fragilité de culture
- Excrétion enzymatique non influencée par la mutation

Dans une première étape, nous chercherons à produire en grandes quantités le protozoaire choisi, et à optimiser sa culture en masse :

- par le choix du milieu de culture industriel le plus performant et le plus économique possible, puis par une amélioration de ce milieu.
- par une adaptation à des conditions industrielles impliquant la culture en fermenteur, la maîtrise de cette étape étant primordiale pour la suite du travail.

Dans une seconde étape, nous chercherons à relier la production de deux types d'activités enzymatiques (glycosidasique et protéasique) largement utilisées comme modèles de recherche,

à la nature du milieu de culture d'une part, et à mieux cerner les cinétiques d'apparition de ces activités dans le milieu de culture d'autre part.

La troisième étape consistera à déterminer les modalités d'amélioration de la production de biomasse et d'activité enzymatique, soit en régulant certains paramètres, soit en jouant sur un couple de paramètres, soit par la mise en oeuvre d'un procédé de fermentation permettant de récupérer facilement les métabolites.

La quatrième et dernière étape consistera à caractériser puis à purifier une ou plusieurs activités enzymatiques mises en évidence au cours des fermentations.

MATÉRIEL & MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I / MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

I.1. LE MICRO-ORGANISME

La souche non mutée *Tetrahymena thermophila* BIII provient de l'Institut Carlsberg de Copenhague. Son obtention est détaillée dans le chapitre précédent (§I.7, page 17)

I.2. LES MILIEUX DE CULTURE

Les exigences liées au milieu de culture en vue d'une adaptation à des milieux industriels résident dans l'aspect économique du produit et sa simplicité de préparation.

Pour allier ces deux exigences, il est possible d'utiliser :

- d'une part des substrats naturels : extrait de levure, lait écrémé
- d'autre part des sous-produits industriels : solubles de pomme de terre, solubles de maïs, maltodextrines.

L'extrait de levure assure l'apport en acides nucléiques ; le lait écrémé, ainsi que les substrats naturels ou la protéose peptone assurent quant à eux l'apport azoté. Les éléments minéraux peuvent être assurés par le lait écrémé ou les substrats naturels, ou en quantités connues par des solutions salines.

I.2.1. Milieu semi-synthétique : PPYS (Proteose Peptone Yeast Salts) (Plesner *et al.*, 1964)

Extrait de levure	7,5g
Protéose peptone	7,5g
Solution saline A	10ml
Solution saline B	10ml
H ₂ O désionisée qsp	1000ml

Solution saline A :

MgSO ₄ , 7H ₂ O	10g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6H ₂ O	2,5g
MnCl ₂	50mg
ZnCl ₂	5mg
H ₂ O distillée qsp	1000 ml

Solution saline B :

CaCl ₂ , 2H ₂ O	5g
CuCl ₂ , 2H ₂ O	500 mg
FeCl ₃ , 6H ₂ O	125 mg
H ₂ O distillée qsp	1000 ml

Les éléments minéraux des solutions salines sont de qualité analytique et sont commercialisés par MERCK. Ces solutions sont conservées à +4°C.

On n'effectue pas l'ébullition préalable, ni la filtration, proposées à l'origine par Plesner.

Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 min.

I.2.2. Milieux complexes

I.2.2.1. Milieu MYE (Milk Yeast Extract modifié) (Verdier-Denantes *et al.*, 1994)

lait écrémé en poudre	10g
extrait de levure	10g
H ₂ O désionisée qsp	1000 ml

Autoclaver 20 min. à 120°C.

I.2.2.2. Milieu YE amélioré

Ethuin (1993) avait testé ce milieu en ne gardant qu'un seul des constituants commun aux milieux qu'elle utilisait : l'extrait de levure, puis avait enrichi ce milieu d'autres constituants afin d'évaluer l'importance relative des constituants pour les paramètres de croissance. Nous avons repris l'un de ces milieux améliorés, le YEG, les autres ayant été mis au point lors de nos travaux.

1.2.2.2.1. Milieu YEG (Yeast Extract Glucose) (Ethuin, 1993)

Extrait de levure	10g
Glucose	5g
H ₂ O désionisée qsp	1000 ml

1.2.2.2.2. Milieu YEX (Yeast Extract glucidex) (Verdier-Denantes et al, 1994)

Extrait de levure	10g
Glucidex 12	45g
H ₂ O désionisée qsp	1000 ml

Composition du Glucidex® 12 déminéralisé (% : g/100g de matière sèche)

DE	11-13
glucose	0,6
maltose	2,6
DP3	4,4
DP4	3,6
DP5	3,8
DP6	4,7
DP7	4,7
DP8	3,8
DP9	2,9
DP10-20	26,8
DP>20	42

1.2.2.2.3. Milieu YEP (Yeast Extract Pomme de terre) (Verdier-Denantes et al., 1994)

Yeast extract	10g
Solubles de pomme de terre	3g
H ₂ O désionisée qsp	1000 ml

Composition partielle des solubles de pomme de terre (% : g/100g de matière sèche)

Azote total	4,5-5
Azote aminé	1,5-1,8
Azote ammoniacal	0,5
Résidu à la calcination	28-30%

I.2.2.2.4. Milieu YEM (Yeast Extract Maïs) (VERDIER-DENANTES et al.,1994)

Yeast extract	10g
Solubles de maïs (SOLULYS L)	3g
H ₂ O désionisée qsp	1000 ml

Composition partielle des solubles de maïs (% : g/100g de matière sèche)

Azote total	6,5-7
Azote aminé	2,3
Azote ammoniacal	0,9
Résidu à la calcination	20%

I.3 . CONDITIONS GÉNÉRALES D'EXPÉRIMENTATION

I.3.1. Conservation

Les souches de *Tetrahymena thermophila* sont conservées dans 5 ml de milieu PPYS à 13°C, température qui réduit la fréquence des repiquages. La collection est repiquée tous les mois à raison de 2 à 3 gouttes de culture dans du milieu frais.

I.3.2. Cultures mères pour les inoculations

Il est nécessaire d'acclimater les cellules à leur nouvelle température et à leur nouveau milieu avant toute expérimentation en effectuant un repiquage journalier pendant quelques jours. La souche est cultivée à 28°C en étuve ; elle est repiquée stérilement tous les jours à raison d'une goutte de culture dans des tubes contenant 5 ml de milieu frais afin de la maintenir en phase exponentielle de croissance.

I.3.3. Déterminations préliminaires de paramètres de croissance en flacons

Le milieu à tester est réparti aseptiquement à raison de 10 ml par flacon stérile de 125ml.

Il est mis ensuite à l'étuve 2-3 jours avant son utilisation pour mettre en évidence d'éventuelles contaminations. Pour suivre la croissance de *Tetrahymena*, l'inoculation se fait en début de journée à partir d'une jeune culture-mère (24h) en phase exponentielle de croissance. En 2 ou 3h, la culture atteint sa phase exponentielle de croissance ; cinq à sept dénombrements sont alors effectués à intervalles réguliers dans la journée. Les prélèvements sont espacés de une à deux heures.

Pour déterminer la population maximale en phase stationnaire, nous ensemençons une autre série de flacons et nous laissons les cellules se multiplier et passer leur phase exponentielle de croissance durant les 24 premières heures. Puis 3 à 4 dénombrements par jour sont effectués jusqu'à ce que la population décroisse, à raison de deux valeurs décroissantes consécutives.

I.3.3.1. Détermination de la composition optimale du milieu MYE

Les gammes de concentration s'étendent de 0 à 5,0% pour le lait écrémé, et de 0 à 1,5% pour l'extrait de levure.

I.3.3.2. Détermination du pH optimal de culture

La recherche du pH optimal s'effectue sur milieu MYE, mais le milieu YEG est utilisé pour la zone de pH allant de 4,0 à 6,5, car la caséine précipite lors de l'autoclavage pour des valeurs de pH inférieures à 6,5.

Différents tampons sont utilisés selon le pH du milieu :

- MES pH 4,0 à 6,5
- MOPS pH 6,5 à 7,0
- TRIS pH 7,5 à 8,5

I.3.3.3. Détermination de la température optimale de culture

La recherche de la température optimale de culture s'effectue dans le milieu MYE et dans des bain-maries thermostatés au lieu d'étuves. La gamme de température s'étend de 25°C à 37°C.



Figure 11 : Fermenteur Biolafitte de 2 Litres

I.3.4. Cultures en fermenteur

I.3.4.1. Fermenteur de 2 L

Un fermenteur Biolaffite de 2 L est constitué d'une cuve en verre borosilicaté à fond hémisphérique muni d'une double enveloppe reliée à un bain-marie qui régule la température (Fig.11). La cuve a un volume utile de 1,5 L. La platine en acier inoxydable repose sur la cuve et comprend :

- un axe d'agitation équipé de 2 turbines de Rushton (45mm de diamètre) à ailettes, prévues pour culture bactérienne.
- une canne en doigt de gant pour y placer un thermomètre
- des cannes de surface pour la sortie de l'air, l'inoculation ou le fed-batch
- des cannes en profondeur pour le prélèvement ou l'entrée d'air.

Sur la platine, il existe des orifices réservés aux capteurs (sonde pH ou O₂ dissous), des bouchons à plasma et un condenseur à la sortie d'air pour éviter une trop forte évaporation du milieu.

Chaque fermenteur est relié à un coffret de commande où sont réglés la vitesse de rotation de l'axe d'agitation et le débit d'air. Il permet la mesure du pH et du pourcentage en O₂ dissous. Le 100% correspond à un milieu saturé en oxygène. Il est également possible de réguler le pH grâce à une pompe péristaltique commandée par le coffret électronique. L'air est filtré à l'entrée et à la sortie du fermenteur à l'aide de filtres 0,2 µm hydrophobes et autoclavables.

La stérilisation du fermenteur s'effectue dans l'autoclave à 120°C pendant 30 min. car l'épaisseur de la cuve et du milieu ralentit la montée en température. Tout est stérilisé en même temps : cannes, filtres et milieux.

I.3.4.2. Préparation de l'inoculum

La culture de départ se fait toujours dans un flacon de 125 ml contenant 10 ml de milieu. Ce sont les conditions optimales en culture statique qui permettent d'obtenir des cellules dans un très bon état physiologique. Environ 24 h plus tard, cette culture sert à ensemer l'inoculum du fermenteur. Celui-ci consiste en un erlenmeyer de 500ml contenant un volume de milieu égal à 10% du volume de milieu en fermenteur. Cette culture est réalisée, comme la précédente, en condition non agitée et environ 24 h avant ensemsement du fermenteur.

I.3.4.3. Inoculation

L'inoculation du fermenteur de 2 litres s'effectue toujours sous la hotte à flux laminaire et après désinfection de la platine du fermenteur. L'inoculum est versé directement par un orifice ouvert sur la platine. Dans le cas de l'utilisation de solutions d'enrichissement contenant des éléments thermolabiles, ces solutions sont ajoutées au fermenteur à travers un bouchon plasma à l'aide d'une seringue munie d'un filtre stérilisant de 0,2 μm

I.3.4.4. Conditions expérimentales

Dans toutes les expérimentations effectuées en fermenteur, le volume est fixé à 1,5L, après s'être assuré que la production de mousse au cours de la croissance cellulaire reste dans des proportions acceptables.

La vitesse d'agitation est de 300 tours/min. ce qui correspond à une vitesse linéaire périphérique (V) des turbines de 0,7 msec⁻¹ ($V = \pi DN$ où D représente le diamètre des turbines en m, et N la vitesse angulaire en tr.sec⁻¹).

Le débit d'air est dans la majorité des cas fixé à 1 volume d'air par volume de milieu de culture et par minute (1vvm).

Sur les différents prélèvements, le temps de génération et la population maximale atteinte en phase stationnaire de croissance, ainsi que les dosages biochimiques sont déterminés dans chaque milieu testé.

Nous avons cherché, au cours de notre travail à optimiser le mode de prélèvement des échantillons en fermenteur, en étudiant l'influence du recyclage de la purge (volume contenu dans la canne de prélèvement) sur la population dénombrée, notamment la population maximale. Il est apparu que le vidage du fermenteur, en l'absence de recyclage augmente artificiellement la population maximale. Le système de recyclage de la purge a donc été adopté.

I.4. TECHNIQUE DE DÉNOMBREMENT ET DÉTERMINATION DU TEMPS DE GÉNÉRATION

0,5 ml ou 1 ml de culture selon la densité de cellules sont prélevés aseptiquement du flacon de culture et sont fixés par 1ml de glutaraldéhyde (dilution au 1/10 de la solution commerciale) dans un flacon de comptage. Ce dernier peut être conservé au froid si le comptage n'est pas immédiat.

Le dénombrement cellulaire s'effectue par comptage à l'aide d'un Coulter counter ZM.

Les réglages de l'appareil sont les suivants :

- diamètre de l'orifice	140 µm
- courant d'ouverture	100 mA
- atténuation	64
- gain	1
- diamètre min. compté (sphère équivalente)	19,46 µm
- volume analysé	500µl

Juste au moment du comptage, l'échantillon est dilué selon la densité de cellules avec 10, 20 ou 30 ml de NaCl à 1% (P/V) filtré au préalable sur membrane Millipore de 0,45µm. A partir de cette suspension homogénéisée, 3 dénombrements (x_1 , x_2 , x_3) sont réalisés au Coulter counter. Un simple calcul de dilution sur la moyenne des trois comptages donne le nombre de protozoaires par ml de culture. A titre d'exemple, pour 1 ml de culture fixé dans 1 ml de glutaraldéhyde et dilué dans 10 ml de NaCl (0,5 ml sont analysés par le Coulter-counter) :

$$[(x_1 + x_2 + x_3) / 3] \times 2 \times 12 = \text{nombre de cellules de } Tetrahymena \text{ par ml}$$

Les valeurs sont ensuite reportées sur papier semi-log (nombre de cellules/ml en fonction du temps). En phase exponentielle de croissance, les points sont parfaitement alignés et forment une droite à partir de laquelle le temps de génération est déterminé graphiquement.

I.5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Chaque condition expérimentale est répétée au minimum trois fois de manière à pouvoir exploiter statistiquement nos résultats. Ces analyses sont effectuées grâce au logiciel STATITCF. Il nous fournit pour chacune des variables "temps de génération", "population maximale" et "activité protéasique" : moyennes, écart-types, analyse de variance, test de Newman-Keuls.

L'analyse de variance a pour but de comparer les moyennes de séries de données normalement distribuées et de même variance à partir d'échantillons aléatoires, simples et indépendants les uns des autres. Lorsqu'à l'issue d'une analyse de variance, on est amené à rejeter l'hypothèse d'égalité des moyennes, la question se pose généralement de savoir quelles sont, parmi les moyennes considérées, celles qui diffèrent significativement. Cette question peut être résolue par le test de Newman et Keuls, méthode de comparaisons multiples de moyennes (Dagnelie, 1975).

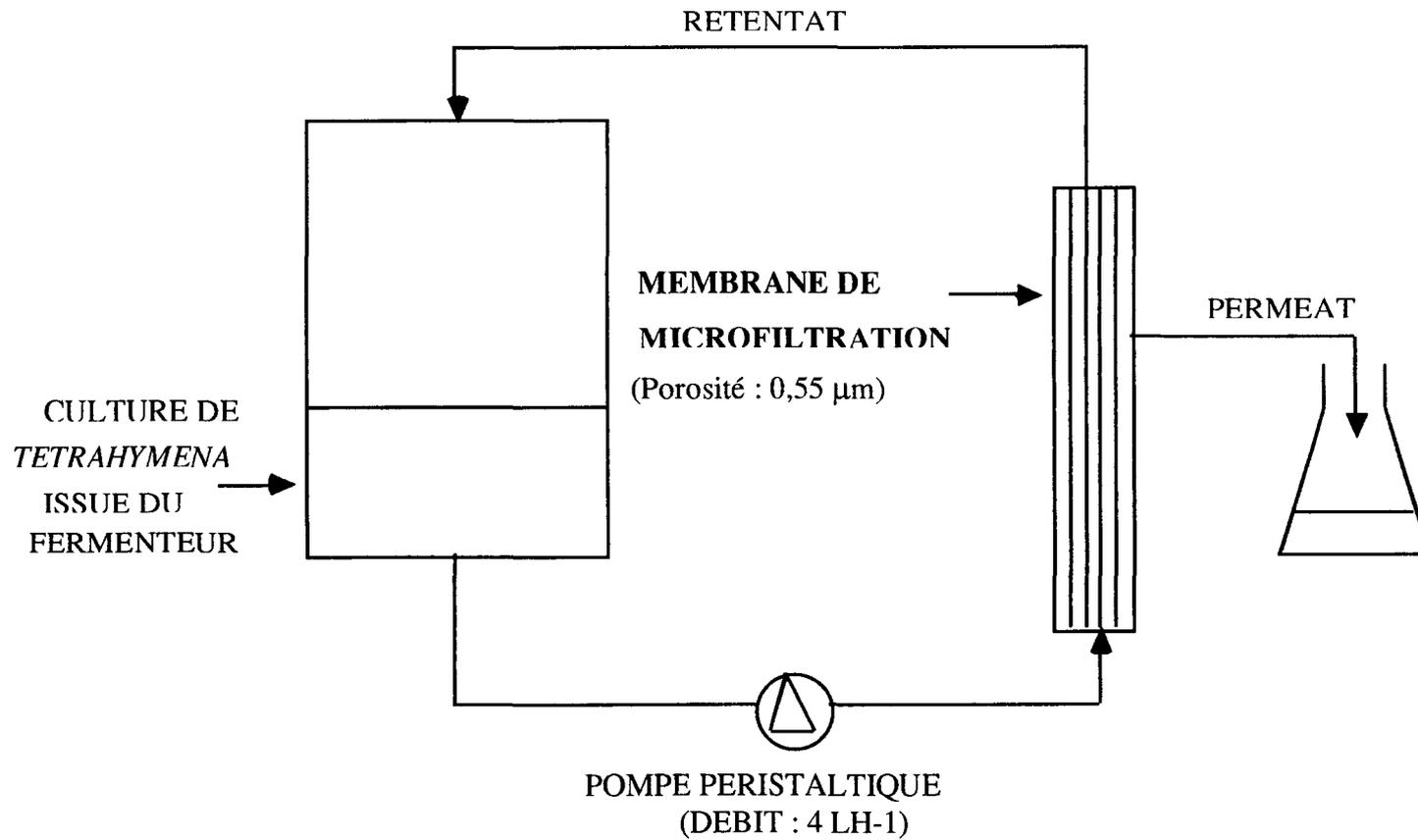


Figure 12 : Représentation schématique du dispositif de microfiltration tangentielle

Les tableaux d'analyse statistique que nous présenterons en annexe préciseront donc le classement et les regroupements de moyennes déterminées par ce test. On considère que les moyennes qui se trouvent dans un même groupe ne diffèrent pas significativement. Dans notre étude, le classement des groupes nous permet de distinguer rapidement parmi les conditions de culture testées, celles qui favorisent les meilleurs résultats pour chacune des variables " temps de génération " et " population maximale ". Du meilleur au moins favorable, les groupes sont respectivement notés A, B, C, etc.

II / TECHNIQUES UTILISÉES POUR LES ÉTUDES DE PRODUCTION ET DE CARACTÉRISATION ENZYMATIQUE

II.1. PRÉPARATION DU MATERIEL ENZYMATIQUE

II.1.1. Préparation du surnageant de culture

II.1.1.1. Centrifugation

Les suivis des paramètres biochimiques en cours de fermentation ont été effectués sur des surnageants de culture obtenus par centrifugation de l'échantillon de culture dans les conditions suivantes :

- Vitesse : 1000g
- Température : 3°C
- Durée : 20 min.

II.1.1.2. Microfiltration tangentielle (figure12)

Le système de microfiltration SETRIC (Type 30/HI-FLOW) permet des séparations (clarification ou concentration) par filtration tangentielle.

Pour limiter les phénomènes de colmatage de membrane et de lyse cellulaire, la concentration (ou clarification) est effectuée par une filtration tangentielle mettant en œuvre un module de fibres creuses ou tubulaires (diamètre des fibres : 500 µm). Le diamètre des pores mesure 0,55 µm pour ce qui concerne la séparation des cellules et du milieu de culture. La surface d'échange est de 0,40 m². Le produit à traiter circule (par pompage) à l'intérieur des fibres. Les cellules, de taille supérieure au diamètre des pores de la membrane, sont recyclées dans le bac d'alimentation, alors que la solution clarifiée passe au travers de la paroi des fibres.

Avant toute opération, la membrane doit être humidifiée par passage à faible débit de 2 litres d'eau déminéralisée à un débit de 100 à 200 ml/min. dans le compartiment "rétentat". Puis il faut faire passer 2 litres d'eau déminéralisée à un débit de 100 à 200 ml/min. dans le compartiment "perméat" en retournant la sortie perméat dans la cuve.

En cas de stérilisation, le compartiment "rétentat" doit être vidé de son eau et les sorties "rétentat" et "perméat" doivent être reliées entre elles afin d'éviter de trop grandes différences de pression. La fibre est stérilisable trois fois au maximum à l'autoclave, 20 min. à 120°C. La membrane est nettoyée par passage de NaOH 0,1 M pendant 20 min. dans les deux compartiments puis par rinçage à l'eau distillée.

II.1.2. Concentration des surnageants de culture et éluats de chromatographie

II.1.2.1. Ultrafiltration tangentielle

Dans le cas de volumes importants (supérieurs à 500 ml), on utilise le dispositif décrit ci-dessus, mais la membrane utilisée a alors une porosité de 10 kDa, ce qui nous permet de retenir les protéines enzymatiques et de se débarrasser de nombreux peptides : les molécules de taille supérieure sont recyclées et concentrées dans le bac d'alimentation.

II.1.2.2. Ultrafiltration sous courant d'azote

Cette technique est utilisée pour les faibles volumes (inférieurs à 500 ml), notamment les éluats intéressants de chromatographie. On utilise le système Amicon, avec des membranes de 5 ou 10 kDa.

II.1.3. Extraction cellulaire

II.1.3.1. Cycles de congélation/décongélation des cellules

1 litre de culture cellulaire sur milieu MYE issue d'un fermenteur ont été microfiltrés, pour récupérer un rétentat dialysé contre du tampon phosphate pH 7,0 10 mM et concentré 5 fois. Cinq échantillons de 50 ml de ce rétentat ont été utilisés pour notre étude. Quatre d'entre eux sont congelés immédiatement (n°1 à 4). Après numération des cellules sur le n°5, le rétentat est centrifugé à 1000g, et les activités protéasiques sont dosées dans le surnageant. Après 12h de congélation, les échantillons 1 à 4 sont décongelés, les n°1 à 3 sont immédiatement recongelés sans analyse ; le n°4 est traité comme le 5 précédemment. On procède de même avec le n°3, 12 heures plus tard, et ainsi de suite jusqu'au n°1.

II.1.3.2. Homogénéiseur de Potter

Nous travaillons sur un rétentat issu d'une microfiltration de culture sur MYE. Après une numération cellulaire et un dosage de l'activité protéasique à pH 4,5 dans le surnageant issu de la centrifugation d'une aliquote de ce rétentat, les cellules sont ensuite broyées à l'aide de l'homogénéiseur Potter (5 aller retour environ, jusqu'à ce qu'il n'y aie plus d'augmentation des cellules cassées). Une nouvelle numération est effectuée, puis l'activité protéasique est dosée dans le surnageant de centrifugation.

II.1.3.3. Traitement par les ultra-sons

Des cultures en flacons d'âges différents ont ici été utilisées. Un lavage est réalisé par du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8, puis la suspension cellulaire est divisée en deux après numération (environ 10^7 cell./ml), un volume servant de témoin (5ml), l'autre volume étant soumis à un traitement par les ultrasons (5ml), dont nous pouvons rappeler le mécanisme de production : l'énergie électrique est transformée par le générateur en énergie ultrasonique haute fréquence à 20 kHz, transmise au convertisseur. Les vibrations mécaniques sont amplifiées par la sonde et provoquent la formation de microbulles par alternance de compressions dans le liquide. En explosant violemment, les microbulles libèrent une énergie considérable à l'extrémité de la sonde.

Ce phénomène appelé cavitation permet une agitation intense de l'échantillon.

L'appareil utilisé est un générateur homogénéiseur sonificateur BRANSON B30, de puissance maximale 100 watts, et de fréquence 20 kHz. La suspension cellulaire est mise dans un bain de glace pour que l'extraction puisse se faire à des températures inférieures à 10°C. Après mise en contact de la sonde à ultra-sons et de la suspension cellulaire, le traitement s'effectue sur une durée de 10 sec. Après une numération cellulaire, les échantillons témoin et soniqué sont centrifugés (1000g, 30 min., 4°C), et les dosages biochimiques sont réalisés sur les surnageants. Le culot est alors repris dans le tampon d'extraction, homogénéisé puis remis au contact de la sonde à ultra-sons. Après trois traitements similaires, les surnageants sont dans les mêmes conditions que précédemment de façon à obtenir une solution limpide.

II.2. MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES

II.2.1. Dosage des protéines

II.2.1.1. Principe

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) utilise la propriété que possèdent les solutions en milieu acide de Bleu Brillant de Coomassie de voir leur absorbance maximale se déplacer de 465 à 595 nm quand il y a formation de complexes avec les protéines.

II.2.1.2. Réactifs

- Solution de Serum-albumine bovine (SAB) à 1 mg/ml
- Réactif de Bradford : dissoudre 320 mg de Bleu Brillant de Coomassie (G-250) avec 660 ml d'acide phosphorique concentré (H_3PO_4 16M, 88% p/p) et 150 ml d'alcool absolu. Compléter à 1L et filtrer sur papier Whatman N°1. Conserver à l'abri de la lumière.

II.2.1.3. Mode opératoire

*Gamme étalon de SAB : A 800 µl de SAB dont la concentration varie de 0 à 25 µg/ml, ajouter 200 µl de réactif de Bradford sous agitation au Vortex. Après 5 min. d'attente à l'obscurité, la densité optique est lue à 595 nm.

*Dosage de l'échantillon : A 100 µl de surnageant de culture, plus ou moins diluée (1/100 au 1/8e) selon le stade de la croissance, ajouter 700 µl d'eau puis les 200 µl du réactif de Bradford.

II.2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

L'analyse électrophorétique des protéines est effectuée selon la technique décrite par Laemmli (1970).

Le gel de séparation, d'une épaisseur de 0,75 mm ou 1,5 mm et de concentration en acrylamide de 8%, 10% ou 12% dans un tampon Tris 1,5M, pH 8,8 est préparé à partir d'une solution mère de 30% acrylamide et 0,8% bisacrylamide. Le gel de concentration de 5% est préparé dans un tampon Tris 0,5M pH 6,8. Les échantillons sont solubilisés par chauffage à 95°C pendant 5 min. dans un tampon Tris 0,25M pH 6,8, SDS 8%, saccharose 10%, bleu de bromophénol 0,2%. L'addition éventuelle de dithiothréitol (DTT) 0,1M permet de réduire les ponts disulfures intra ou inter-chaines polypeptidiques. Des marqueurs de poids moléculaire (Bas poids

moléculaires: LMW, Sigma) sont déposés parallèlement aux échantillons. La séparation électrophorétique s'effectue à ampérage constant (4 mA par gel de 0,75 mm d'épaisseur) pendant 18 h en tampon Tris 0,025 M, glycine 0,192 M, SDS 0,1%.

II.2.3. Coloration des protéines

Après démoulage, le gel est fixé et coloré pendant 1h sous agitation douce par une solution de Bleu de Coomassie (Merk) 0,02%, acide acétique 10%, isopropanol 25%, puis décoloré avec une solution d'acide acétique 10% et méthanol 40%.

II.2.4. Mise en évidence d'une activité protéasique par gélatine SDS-PAGE (conditions non dénaturantes)

Une suspension de gélatine à 1% dans l'eau est solubilisée au bain-marie à 100°C pendant 10 min. Cette solution est ajoutée à raison de 0,1% final en gélatine à un gel de polyacrylamide (10% en acrylamide). L'électrophorèse se déroule dans les conditions classiques d'une électrophorèse SDS. Après migration, le gel est lavé sous agitation douce pendant 1h à température ambiante dans une solution de Triton X100 à 2,5% dans l'eau. Il est ensuite baigné entre 4 et 16 h à 37°C sous agitation dans un tampon glycine-NaOH 0,1M pH 8,3. Le gel est enfin coloré par une solution d'Amido black 1% et décoloré par l'acide acétique à 10%. Les zones de digestion de la gélatine apparaissent en clair par rapport au reste du gel qui est coloré.

II.3. DOSAGES ENZYMATIQUES

II.3.1. Activités glycosidasiques

II.3.1.1. Principe

La détermination des activités glycosidasiques est basée sur la libération de sucres réducteurs à partir de différents substrats, ici l'amidon et le pullulane. Après incubation, les sucres réducteurs sont dosés en équivalent glucose par le 3,5-dinitrosalicylate (DNS) (Summer et Howell, 1935). Le DNS est réduit par les sucres réducteurs et prend une couleur brune en milieu basique.

II.3.1.2. Réactifs

*Dosage des sucres réducteurs par le DNS

- Solution étalon de glucose à 20 mM contenant de l'azide de sodium à 0,02%.
- Réactif au DNS : 5g de DNS dans 100 ml de NaOH 2N + 150 g de tartrate de Na et K dans 300 ml d'eau. Les deux solutions sont mélangées et complétées à 500 ml avec de l'eau distillée.

*Substrats et solution tampon

- Activité α -amylasique : solution d'amidon à 1% (chauffer légèrement pour dissoudre).
- Activité pullulanasiqque : solution de pullulane à 1%
- Tampon acétate pH 5,2, 200mM

II.3.1.3. Mode opératoire

*Gamme étalon de glucose

La gamme de concentration s'étend de 0 à 3,6 g/l. A 0,4 ml de solution de glucose, ajouter 0,2 ml de tampon, puis 0,4 ml de DNS et porter au bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Refroidir pour bloquer la réaction et ajouter 2 ml d'eau. Mesurer les densités optiques à 540 nm.

*Milieu réactionnel et dosage

Tous les réactifs sont pré-incubés séparément à 55°C pendant 5 min. (enzyme, substrat). A 0,2 ml de surnageant de culture, ajouter 0,2 ml de tampon acétate et 0,2 ml de substrat, agiter et attendre 20 min. à 55°C. Ajouter 0,4 ml de DNS et suivre le même protocole énoncé pour la solution étalon de glucose.

II.3.1.4. Expression de l'activité

1 Unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 μ mole de glucose par minute.

II.3.2. Activité protéasique

II.3.2.1. Sur des substrats naturels

II.3.2.1.1. Principe

La détermination de l'activité protéasique est basée sur la libération de la tyrosine à partir d'un substrat naturel : l'hémoglobine (Beynon et Bond, 1989). La tyrosine est dosée après

précipitation acide des protéines par la méthode de Folin (Folin, 1927 ; Lowry, 1951). Le pH et la température du milieu réactionnel choisis sont ceux ayant été déterminés comme optima sur la souche mutée SJ180 par Ethuin (1993). La spécificité d'hydrolyse a été étudiée sur d'autres substrats naturels que l'hémoglobine bovine : sérum albumine bovine, ovalbumine, gluten, collagène, caséinate de calcium, lysozyme, pepsine, globine humaine.

II.3.2.1.2. Réactifs

**Dosage*

- Acide trichloroacétique (TCA) 5% p/v
- Solution étalon de tyrosine 200 μ M en solution dans HCl 0,2M
- Solution de NaOH 0,6M
- Réactif de Folin, dilué au 1/3

**Substrat*

- Tampon Tris/HCl 200 mM, pH 9,0
- Tampon acétate 200 mM, pH 4,5
- Tampon citrate phosphate borate pH 2,0 à 12,0
- Préparation du substrat : le substrat doit être à une concentration finale de 20g/l (Beynon et Bond, 1989). Le protocole de traitement du substrat par l'urée est le suivant :
Ajouter la quantité d'urée pesée au substrat, et la même quantité d'eau. Attendre environ 2 heures à 37°C que l'urée se dissolve et que la protéine se dénature.
Ajouter 10% du volume final en tampon adapté au pH recherché, ajuster à l'aide d'un pH-mètre. Ajuster au volume final avec de l'eau distillée. Le substrat se conserve très bien au congélateur.

II.3.2.1.3. Mode opératoire

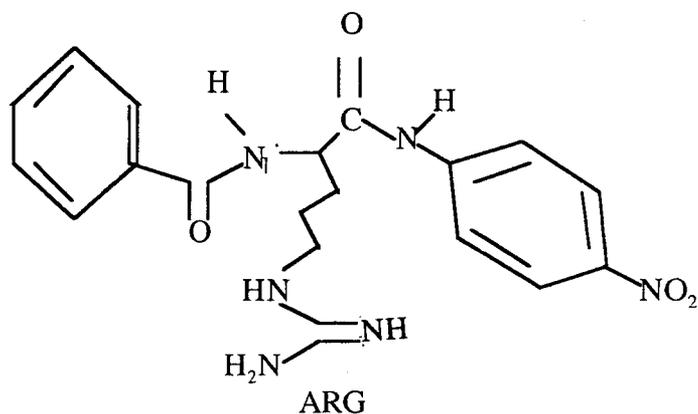
**Gamme étalon*

A 1 ml de tyrosine dont la concentration est comprise entre 0 et 200 μ M, ajouter 2 ml de NaOH 0,6M, puis 1ml de réactif de Folin.

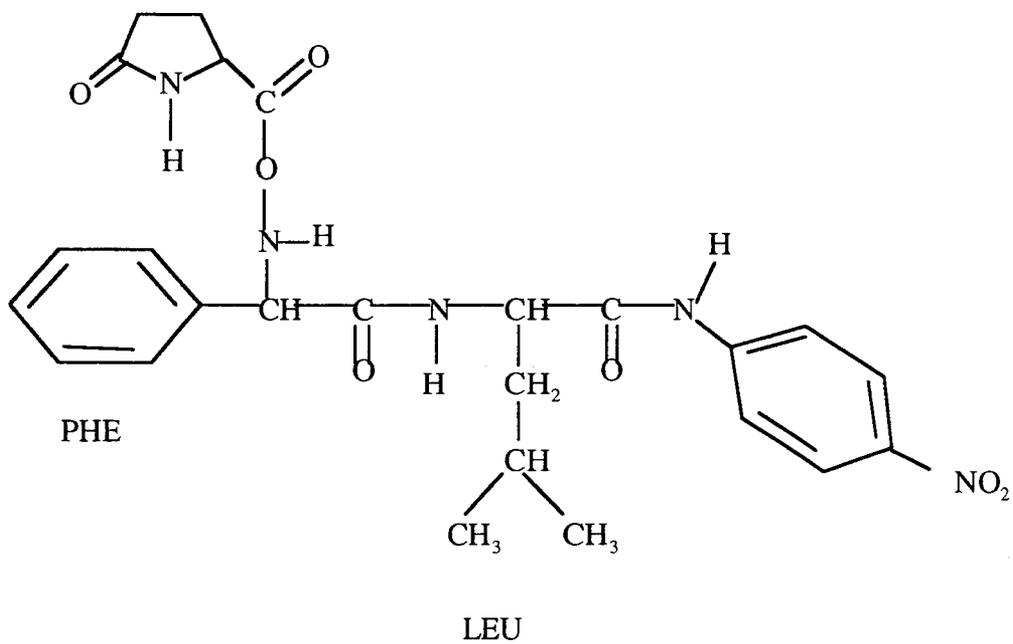
Agiter et lire après 10 min. à 750 nm contre le zéro qui contient 1 ml de HCl 0,2M, 2ml de NaOH 0,6M et 1 ml de réactif de Folin.

**Milieu réactionnel et dosage*

Tous les réactifs sont pré-incubés séparément à 55°C pendant 5 min.. (enzyme, substrat, tampon). A 0,2 ml de surnageant de culture, ajouter 1 ml de substrat agiter et attendre 20 min. à 37°C. Arrêter la réaction avec 2 ml de TCA.



N- α -benzoyl-arginine-*para*-nitroanilide



Pyroglutamyl-phénylalananyl-leucine-*para*-nitroanilide

Figure 13 : Formules développées des substrats synthétiques utilisés pour le dosage de l'activité protéasique

Attendre 30 min., centrifuger pour éliminer les protéines précipitées, et doser la tyrosine sur le surnageant par la méthode de Folin. Prélever 1 ml de substrat et procéder comme pour la gamme étalon. Le blanc est composé de 1,2 ml de tampon additionné de 2 ml d'ATCA.

Pour chaque essai il est fait un témoin enzyme-substrat : à 0,2 ml de surnageant sont ajoutés 2 ml d'ATCA puis 1 ml de substrat.

Pour chaque expérience, les essais et témoins sont réalisés en double.

II.3.2.1.4. Expression de l'activité

Les résultats sont exprimés en :

- activité protéasique : 1 Unité (U) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 micro mole de tyrosine par minute
- activité spécifique : il s'agit de l'activité protéasique par mg de protéines

II.3.2.2. Sur des substrats synthétiques

II.3.2.2.1. Principe

La détermination de l'activité protéasique est basée sur le dosage de la nitroaniline libérée lors de l'hydrolyse de substrats synthétiques nitroanilidés.

Deux substrats synthétiques ont été utilisés (figure 13) :

- le N- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitro-anilide ou BAPNA (Barret, 1972),
- et
- le pyroglutamyl-L-phénylalanine-L-leucine-*p*--nitro-anilide (pyr-PHE-LEU-pNa) (Filippova *et al.*, 1984).

II.3.2.2.2. Réactifs

***Dosage**

- Tampon d'arrêt acétate-monochloroacétique 100 mM, pH 4,3
- Solution étalon de nitroaniline 10 mM dans le DMSO

***Substrats**

- Tampon Tris/HCl 200 mM, pH 9,0
- Tampon acétate 200 mM, pH 4,5
- Tampon citrate phosphate borate pH 2,0 à 12,0

Préparation du substrat : le substrat doit être à une concentration finale de 100 mM dans le DMSO.

II.3.2.2.3. Mode opératoire

40 µl d'extrait enzymatique sont mélangés à 445 µl de solution tampon 200 mM. On ajoute 15 µl de substrat (traité ou non par de l'urée) et on laisse incuber 20 min. à 55°C. La réaction est arrêtée par ajout de 500 µl de tampon d'arrêt. Pour le témoin enzyme substrat, on ajoute le tampon acétate monochloroacétique avant le substrat.

La détermination de la quantité de nitroaniline libérée se fait par la lecture de l'absorbance à 420 nm contre le blanc (485 µl de solution tampon, 15 µl de substrat, 500 µl de tampon d'arrêt). Le calcul de l'activité se fait par rapport à une valeur dite " standard " lue après mélange de 465 µl de tampon, 15 µl de substrat, 20 µl de nitroaniline 10 mM, et 500 µl de tampon d'arrêt.

II.3.2.2.4. Expression de l'activité

1 Unité (U) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1nanomole de nitroaniline par minute.

II.3.3. Activité hexokinase

II.3.3.1. Principe

Le glucose est transformé par l'hexokinase (HK), libérée lors de la lyse cellulaire (en présence d'ATP) en glucose-6-phosphate (G-6-P). Le produit de la réaction est oxydé par la glucose-6-phosphate-deshydrogénase (G-6-PDH) en présence d'un cofacteur pyridinique : le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP⁺). La quantité de NADPH, H⁺ formée est proportionnelle à la quantité de glucose transformé et donc à l'activité hexokinase et est déterminée par spectrophotométrie à 340 nm (Kunst *et al.*, 1984).

II.3.3.2. Réactifs

*Gamme étalon

- Solution-mère de glucose 2 mM

- Tampon triéthanolamine (1) (TEA) 820 mM contenant : NADP⁺ (2,6 mM), ATP(8,5 mM), MgSO₄ (3,5 mM).

Ajuster à pH 7,6 par HCl 1M.

Extemporément, la solution enzymatique de HK et G-6-PDH (®Boehringer) est ajoutée dans le tampon précédent (0,3U/ml finale)

***Milieu réactionnel**

- Tampon TEA (2) (820 mM) contenant : ATP (8,5 mM), MgSO₄ (3,5 mM), glucose (100 mM) Ajuster à pH 7,6 par HCl 1M

- Tampon TEA (3) (820 mM) contenant : NADP (2,6 mM), G-6-PDH.

Ajuster à pH 7,6 par HCl 1M

- Tampon TEA (4) (820 mM) contenant : Solution ATP + Mg : TEA (820 mM), ATP (8,5 mM), MgSO₄, 7H₂O (3,5 mM)

Ajuster à pH 7,6 par HCl 1M.

II.3.3.3. Mode opératoire

***Etablissement de la gamme étalon de glucose**

La gamme étalon s'étend de 0 à 250 mM. On se met en concentrations de glucose limitantes et en saturation d'enzyme. A 1 ml de solution de glucose, on ajoute 1 ml de solution tampon TEA (1) contenant les enzymes HK et G-6-PDH. On homogénéise et on laisse incuber 20 min. à 25°C. Les absorbances sont lues à 340 nm contre le blanc. Cette gamme permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire du NADPH.

***Milieu réactionnel**

On se met en concentration saturante de glucose, soit 100mM et on dose l'activité.

- 0,5 ml d'échantillon

- 0,5 ml de solution tampon (2) (substrat)

Incuber 20 min. à 25°C. Arrêter la réaction en mettant les tubes au bain-marie 100°C durant 2 minutes. Ajouter 1ml de solution tampon (3). Laisser incuber 20 min. à 25°C. Lire à 340 nm contre le blanc. Pour chaque essai il est fait un témoin enzyme-substrat : 0,5 ml de surnageant sont incubés au bain-marie 100°C pendant 2 min., puis on ajoute 0,5 ml de tampon (2), puis 1 ml de tampon (4). Pour chaque expérience, les essais et témoins sont réalisés en double.

II.3.3.4. Expression de l'activité

1 Unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 millimole de NADPH ou de glucose-6-P par minute.

Tableau 8 : Précipitation par addition du sulfate d'ammonium solide (à 25°C)

Concentration initiale en sulfate d'ammonium (% de saturation)

Concentration finale en sulfate d'ammonium (% de saturation)																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
Gramme de sulfate d'ammonium solide à ajouter à un litre de solution																	
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

II.4. ISOLEMENT DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

II.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation sélective des protéines peut constituer une première étape de purification. L'addition de sels minéraux à une solution protéique provoque l'insolubilisation des protéines (technique du relargage). Chaque protéine pourra ainsi précipiter dans un certain intervalle de concentration en sels. Le 100% est défini par la dissolution de sulfate d'ammonium dans l'eau jusqu'à saturation. Ces essais ont donc pour but d'initier une séparation éventuelle des activités par précipitation sélective au sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), en présence de concentrations croissantes en force ionique. 13 degrés de saturation ont été testés en cascade, de 40 à 100% par incrément de 5%. A 50 ml de surnageant de culture, de concentration en protéines et activité protéasique connues, on ajoute la quantité de sulfate d'ammonium solide correspondant au taux de saturation de 40% (Tableau 8). On centrifuge à 4000g durant 20 min. Le culot, après centrifugation est remis en suspension dans 15 ml de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,0. L'activité protéasique et le taux de protéines sont ensuite dosés sur le culot et le surnageant. Celui-ci est réutilisé pour procéder au relargage suivant (45%), et ainsi de suite jusque 100% de saturation.

II.4.2. Techniques chromatographiques

II.4.2.1. Chromatographie sur hydroxyapatite-ultrogel

Le surnageant de culture concentré par ultrafiltration est appliqué sur une colonne (12,5*4,5 cm) d'hydroxyapatite-ultrogel (IBF ®Biotechnics) équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8. Les débits d'injection et d'élution sont de l'ordre de 20 ml/heure. Après lavage, on élue par un gradient discontinu de phosphate de sodium 150 et 250 mM. Les fractions recueillies (10ml) sont rassemblées et dialysées dans des cellules de concentration AMICON de 450 ml sur des membranes AMICON PM5 (seuil de coupure 5000 Da) ou PM10 (seuil de coupure 10000 Da).

II.4.2.2. Gel filtration

Les masses moléculaires sont déterminées par une chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne (1,6*90 cm) de ®Sephacryl HR100 (sphères de dextran alkyl et de N-N'-méthylène bisacrylamide), équilibrée en tampon phosphate de sodium 50 mM NaCl 0,5M pH 6,8 sous un débit de 20 ml/heure.

La zone de linéarité de la colonne est comprise entre 1 et 100 kDa et les protéines suivantes ont permis sa calibration : serum albumine bovine (65000), ovalbumine (43000), chymotrypsine (25000), ribonucléase (13500). Son volume d'exclusion a été déterminé par injection de Bleu Dextran. La fraction injectée est de 5 ml, les protéines sont suivies par absorbance à 280 nm, les fractions recueillies sont de 4 ml et les activités enzymatiques sont mesurées sur celles correspondant aux pics de protéines.

II.5. ÉTUDE DES PROTÉASES

II.5.1. Détermination du point isoélectrique par chromatofocalisation

Le point isoelectrique a été déterminé sur une colonne (0,5 * 20 cm) ®MonoP HR 5/20 équilibrée en tampon Bis-Tris 25 mM pH 6,3 à un débit de 30 ml/h. L'élution est effectuée par passage sur ®POLYBUFFER 74 (Pharmacia-LKB Biotechnology) dilué au 1/10 et ajusté à pH 4,5 par addition d'HCl 1M. Lors de l'élution, les protéines sont suivies à 280nm, les fractions recueillies de 1ml permettent de vérifier le pH d'élution et l'activité enzymatique.

II.5.2. Détermination de la stabilité au pH

L'extrait enzymatique est pré-incubé seul durant 2 heures à 25°C mais à des pH différents (de 2,0 à 12,0 par incrément de 1 unité). Par pH testé, on met 0,2 ml de solution enzymatique + 0,8 ml de tampon citrate-phosphate-borate dans un tube et on pré-incube 2h à 30°C. Puis on pré-incube 5 min. à 55°C et l'on suit le protocole classique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle en fonction du pH de pré-incubation.

II.5.3. Détermination du pH optimal

Le principe consiste à effectuer la réaction enzymatique à différents pH.

Dans la préparation du substrat, le tampon est du tampon citrate-phosphate-borate de sodium 200mM. Le substrat est ajusté au pH voulu. La zone de pH étudiée s'étend de 2,0 à 12,0, par incrément de 0,5 unité. La réaction se fait à 55°C en suivant toutes les étapes du protocole de base. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité maximale en fonction du pH d'incubation.

II.5.4. Détermination de la stabilité à la température

L'extrait enzymatique est pré-incubé à 7 températures différentes (-20°C, 4°C, 20°, 50°C, 60°C, 70°C et 80°C), et durant des temps variables (30 min., 1, 2, 3 et 4 heures). L'activité est ensuite mesurée par la méthode classique.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative par rapport à l'activité maximale.

II.5.5. Détermination de la température optimale

Le principe consiste à suivre le protocole de base à des températures différentes :

20, 45, 50, 55, 60, 65, et 80°C

En dehors du changement dans la température d'incubation, toutes les étapes du protocole restent inchangées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative (le maximum d'activité correspond à 100%) en fonction de la température.

II.5.6. Détermination des Km et Vmax

Les paramètres apparents Km et Vmax sont déterminés selon la méthode de Hanes (1932) ($[S/V] = f[S]$) ou de Lineweaver et Burk (1934) ($1/V = f(1/[S])$) sur deux substrats :

- l'hémoglobine traitée par l'urée 3M, avec des concentrations en substrat allant de 0,08 à 8,33 g.l-1.

- le BAPNA, avec des concentrations en substrat allant de 0,15 à 1,5 mM.

II.5.7. Action d'effecteurs sur les activités enzymatiques

Le principe consiste à pré-incuber l'enzyme en présence de chacun des effecteurs étudiés ou, dans certains cas, à incorporer l'effecteur dans le substrat.

Les différents effecteurs ont été incorporés dans le tampon de dilution de l'enzyme, ou dans la solution de substrat, et les concentrations indiquées dans les résultats sont celles du milieu réactionnel. Lorsque l'effecteur n'est soluble que dans un solvant (effecteur spécifique), celui-ci est aussi testé comme effecteur (cas du diméthylsulfoxyde, DMSO). Dans le cas de l'incorporation de l'effecteur dans le tampon de dilution de l'enzyme, après une pré-incubation

de 1 h de la solution enzymatique en présence des effecteurs à 25°C, l'activité enzymatique est déterminée selon la méthode classique.

Les résultats sont exprimés en activité relative par rapport au témoin qui ne contient pas d'effecteur.

II.5.8. Influence de l'urée

L'urée est ajoutée soit au substrat, soit à au tampon de dilution de l'enzyme, soit aux deux, à des concentration variant de 0 à 9 M. Les concentrations indiquées dans les résultats sont celles du substrat ou de l'enzyme.

II.5.9. Recherche de modifications conformationnelles de l'hémoglobine par spectrométrie d'émission en fluorescence

Les différents échantillons d'hémoglobine à 20 g.L⁻¹ dans un tampon acétate de sodium 200 mM (pH 4,5) ou Tris/HCl 200 mM (pH 9,0), additionnés ou non d'urée (3M ou 8M) et/ou de chlorure de zinc (0,2 mM ou 2,0 mM) sont analysés par fluorimétrie dans des cuves en quartz de 1 cm ou 0,4 cm de chemin optique à l'aide d'un spectrofluorimètre (PERKIN-ELMER LS-5B). Ils sont ramenés au préalable à 1 mg/mL dans le même tampon. Les fentes sont de 2,5 nm à l'excitation comme à l'émission. La fluorescence des résidus tryptophanyles après excitation à 275 nm est mesurée entre 290 et 450 nm. L'intensité des spectres s'exprime sur une échelle d'amplitude 0,5.

RÉSULTATS & DISCUSSIONS

RÉSULTATS

D'après les travaux d'Ethuin (1993), l'utilisation d'une souche mutée de *Tetrahymena thermophila vac*- présente surtout des inconvénients en culture, et la mutation n'a pas d'influence sur la production enzymatique. C'est pourquoi le choix d'une souche non mutée, la souche BIII, a été fait, celle-ci étant plus apte à une production en masse en milieu liquide. Cette souche produit également différentes activités enzymatiques à intérêt industriel.

I / PRODUCTION EN MASSE DE *TETRAHYMENA*

Cette première étape a consisté dans un premier temps à choisir, pour *Tetrahymena thermophila*, parmi plusieurs milieux de culture, celui permettant, en fermenteur de 2 litres, d'obtenir des critères de croissance (temps de génération et population maximale) satisfaisants ainsi que simplicité et faible coût de préparation.

Dans un second temps, le choix du milieu de culture étant fait, il restait à fixer les paramètres physico-chimiques les plus adaptés à la croissance du cilié sur ce milieu.

I.1. CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE DE *T. THERMOPHILA*

I.1.1. Etude de la croissance de *T. thermophila* sur différents milieux

Nous avons utilisé en fermenteur les six milieux suivants, dont la composition est détaillée dans le chapitre Matériel & Méthodes .

Le milieu MYE a été simplifié dans sa préparation, les étapes intermédiaires de stérilisation des constituants pratiquées par Saliba (1984) ayant été supprimées sans inconvénient.

Les milieux YEX, YEP et YEM ont été mis au point en veillant à respecter une concentration en sucres réducteurs équivalente.

MYE : lait écrémé (1%) et extrait de levure (1%)

PPYS: protéose peptone(0,75%), extrait de levure (0,75%) et sels minéraux (env. 0,02%)

YEG : glucose (0,5%) et extrait de levure (1%)

YEX : maltodextrines (4,5%) et extrait de levure (1%)

YEP : solubles de pomme de terre (0,3%) et extrait de levure

YEM : solubles de maïs (0,3%) et extrait de levure (1%).

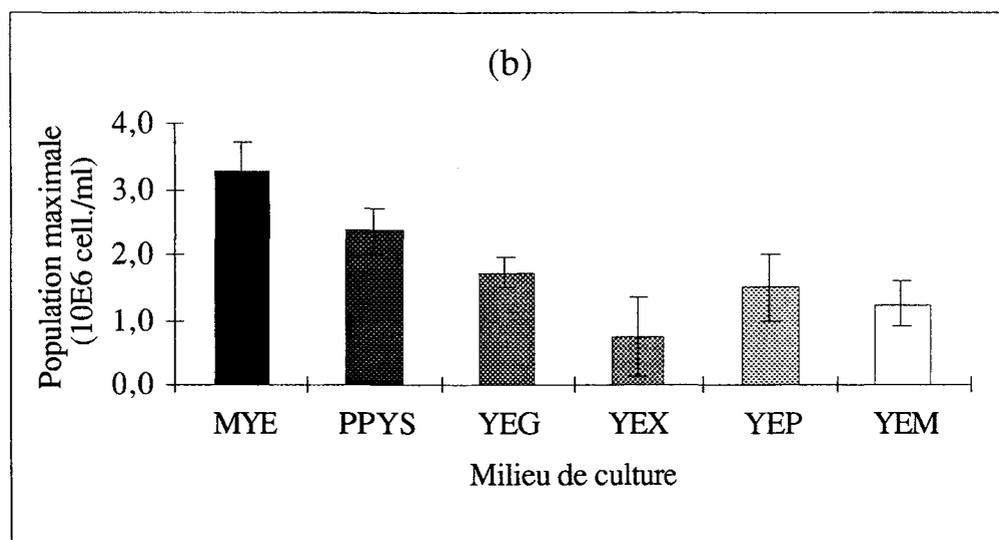
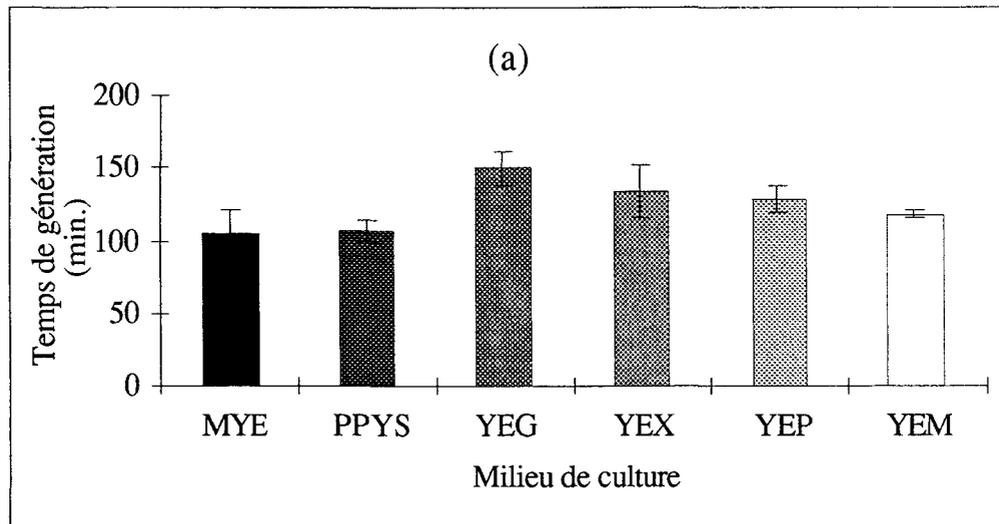


Figure 14 : Temps de génération (a) et populations maximales (b) de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus dans six milieux complexes

Notre objectif est de déterminer, parmi les six milieux étudiés en fermenteur, celui qui donnera la densité cellulaire la plus élevée, et le temps de génération le plus faible possible.

Les résultats sont présentés sur la figure 14.

Afin de nous aider dans nos interprétations de résultats et de nous conforter dans nos analyses, nous avons utilisé deux outils statistiques : l'analyse de variance et le test de Newman (1939) et Keuls (1952) (Analyse statistique en annexe C, tableaux C1 à C5).

En ce qui concerne la population maximale atteinte, le milieu MYE est de loin le plus performant ($3,26 \cdot 10^6$ cellules/ml), suivi par le milieu PPYS (72%), puis les milieux YEG (53%) et YEP (45,7%) et enfin les milieux YEM (38%) et YEX (23%). De plus, la population maximale sur MYE est atteinte en moins de 48h contre plus de 50h pour les autres milieux.

En ce qui concerne le temps de génération, aucun milieu ne dégage réellement d'avantage, mais on peut distinguer un groupe statistiquement plus satisfaisant, à savoir celui comprenant les milieux MYE (105 min.), PPYS (+1%) et YEM (+12,6%).

On note une plus grande homogénéité pour ce paramètre par rapport à la population maximale.

Le milieu MYE donne les meilleurs résultats tant en populations maximales atteintes qu'en temps de génération.

La digestion par *Tetrahymena* des protéines du lait se caractérise par un éclaircissement du milieu MYE : opaque et blanchâtre avant inoculation, il devient limpide et jaunâtre en fin de culture, ce qui correspond à la couleur de l'extrait de levure.

Compte tenu de la variabilité de la composition de l'extrait de levure et du lait écrémé, les temps de génération semblent en accord avec ceux décrits dans la littérature (Plesner, 1964 ; Saliba *et al.*, 1983 ; Ethuin, 1993 sur mutant *vac-*). Par contre, nous avons obtenu des populations maximales sensiblement plus importantes avec les milieux MYE et PPYS avec cette espèce. A titre d'exemple 2,5 fois plus pour la population maximale et un temps de génération inférieur de 43% avec PPYS comparé aux résultats de Saliba (1983) obtenus avec *Tetrahymena rostrata*.

I.1.2. Détermination de la composition optimale du milieu MYE

Ayant retenu le milieu MYE pour la suite de notre étude, nous l'avons soumis à une étude extensive qui nous a permis de déterminer les concentrations optimales de lait écrémé et d'extrait de levure pour la croissance. Les essais ont été réalisés en flacons de 100ml, sur des volumes de culture de 10 ml. 23 combinaisons de concentrations, choisies d'après les résultats obtenus par Saliba (1983), comprenant chacune trois essais, ont été testées.

Les combinaisons ont été établies à partir des concentrations suivantes :

- de 0,0 à 5,0% de lait écrémé, par incrément de 0,5% ;
- 0,2%, 0,5%, 1,0% et 1,5% d'extrait de levure.

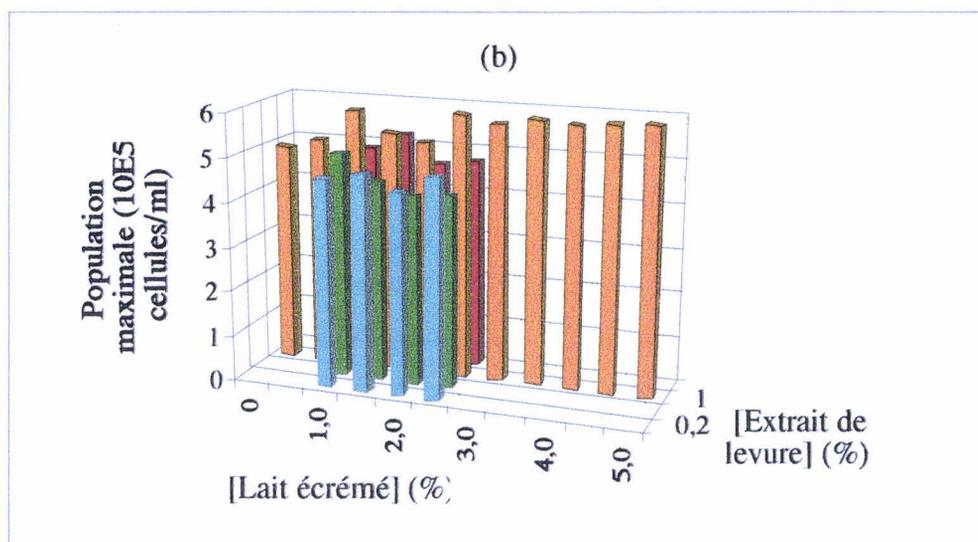
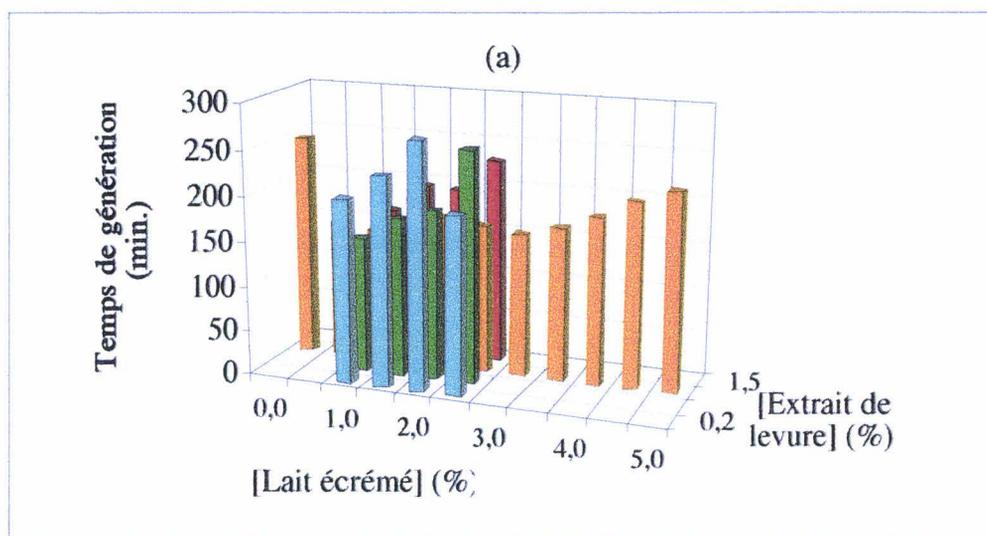


Figure 15 : Temps de génération (a) et populations maximales (b) de *Tetrahymena thermophila* obtenus sur milieu MYE avec différentes teneurs en lait écrémé et extrait de levure.

Les résultats sont présentés sur la figure 15.

Après un test de Barlett destiné à s'assurer que les variances peuvent être comparées, une analyse de variance sur SPADN a été réalisée, puis une comparaison des moyennes par la méthode des moindres carrés (Annexe C, tableaux C6 à C12).

Après analyse statistique, la composition optimale s'avère être la suivante :

Pour le temps de génération	Pour la population maximale
Extrait de levure :1%	Extrait de levure :1%
Lait écrémé :1%	Lait écrémé :1%

Les résultats montrent que :

- à partir d'une teneur en extrait de levure et en lait de 1%, la densité cellulaire devient stable, avec un optimum atteint dès 1% de lait écrémé
- à partir d'une teneur en extrait de levure de 1,0% et en lait écrémé de 0,5%, le temps de génération lui aussi se stabilise, pour remonter au-delà de 4% de lait écrémé.

I.2. PARAMETRES DE CULTURE

Après avoir choisi le milieu le plus performant et sa composition optimale pour la culture de *Tetrahymena*, nous nous sommes intéressés au comportement de ce cilié selon les paramètres physico-chimiques de culture auxquels il sera soumis, à savoir : le pH et la température du milieu de culture, ces deux paramètres faisant l'objet d'une étude en flacons. Mais au préalable, nous avons voulu comparer son comportement en changeant d'échelle de culture (en flacon ou en fermenteur).

I.2.1. Influence du mode de culture : changement d'échelle

Il s'agissait dans un premier temps de confirmer les résultats obtenus par Ethuin (1993) concernant l'influence de l'échelle de culture sur les paramètres de croissance de *Tetrahymena*, effectué sur le milieu MYE précédemment choisi.

L'analyse statistique (annexe C, tableau C13) nous montre que globalement, la culture en fermenteur de 2 litres induit des temps de génération plus courts (-30%) et surtout une population maximale plus élevée (multipliée par 5).

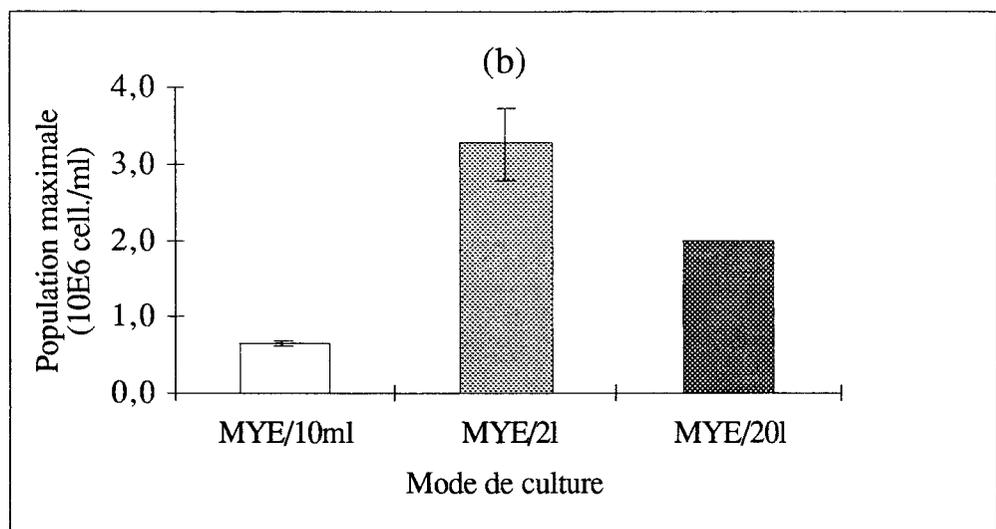
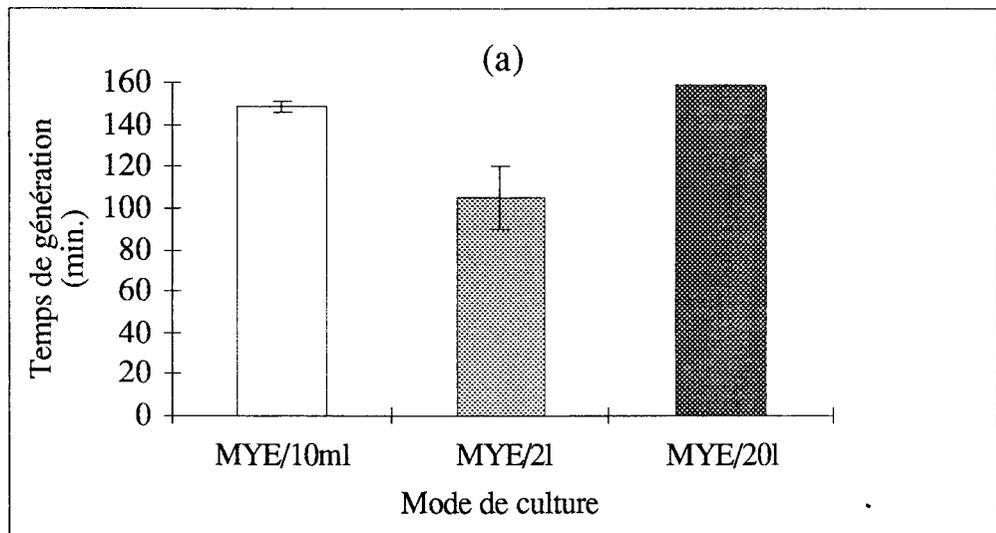


Figure 16 : Temps de génération (a) et populations maximales (b) de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différents modes de culture

Ces résultats (figure 16) ne corroborent pas tout à fait ceux d'Ethuin (1993) qui, dans le cadre d'une étude similaire, signale en fermenteur à 28°C un temps de génération plus faible de 4% seulement, et une population maximale augmentée de 71%, avec une souche mutée.

Le résultat obtenu en fermenteur de 20 litres sur MYE est insuffisant à lui seul pour tirer des conclusions mais se révèle à priori plus intéressant en terme de population maximale qu'au niveau du temps de génération. A titre de comparaison, Ethuin (1993) avait obtenu sur milieu YEG :

- en fermenteur de 20 litres un temps de génération de 252 min. et une population maximale de $2,4 \cdot 10^6$ cellules/ml.
- en fermenteur de 100 litres un temps de génération de 162 min. la population maximale n'ayant pu être déterminée.

Nous n'avons pas fait d'essai en fermenteur de plus grand volume, mais au vu du résultat obtenu sur 20 litres nous pourrions escompter un résultat très intéressant par une amélioration des paramètres de culture (agitation, aération).

I.2.2. Détermination du pH optimum de culture

Pour cette étude, nous avons travaillé sur le milieu MYE retenu plus haut, mais le milieu YEG a cependant été utilisé pour la zone de pH allant de 4 à 6,5, car la caséine précipite lors de l'autoclavage pour des valeurs de pH inférieures à 6,5. Différents tampons ont été utilisés selon le pH du milieu.

Les résultats sont présentés sur la figure 17.

Une croissance médiocre (irrégulière) a rendu impossible la détermination du TG aux pH 4,0, 5,0 et 5,5 ; les populations maximales obtenues étant très faibles, nous n'avons donc pas pris en compte les résultats concernant les pH 4,0, 4,5 et 5,0. Sachant qu'un manque d'oxygène provoque une production d'acides (voie glycolytique anaérobie), une acidité importante aurait donc le même effet qu'un manque d'oxygène et limiterait plutôt la croissance ce que confirment nos résultats obtenus aux faibles pH.

Nous avons utilisé deux outils statistiques : l'analyse de variance et le test de Newman (1939) et Keuls (1952). (Analyse statistique en annexe C, tableaux C14 à C18). Ce dernier test permet d'obtenir :

- en ce qui concerne le temps de génération : quatre groupes homogènes, dont l'un comprenant les pH 6,5 et 7,0 qui donne les valeurs les plus faibles
- en ce qui concerne les populations maximales : quatre groupes homogènes, dont l'un comprenant les pH 6,5 et 7,0 donne les valeurs les plus élevées.

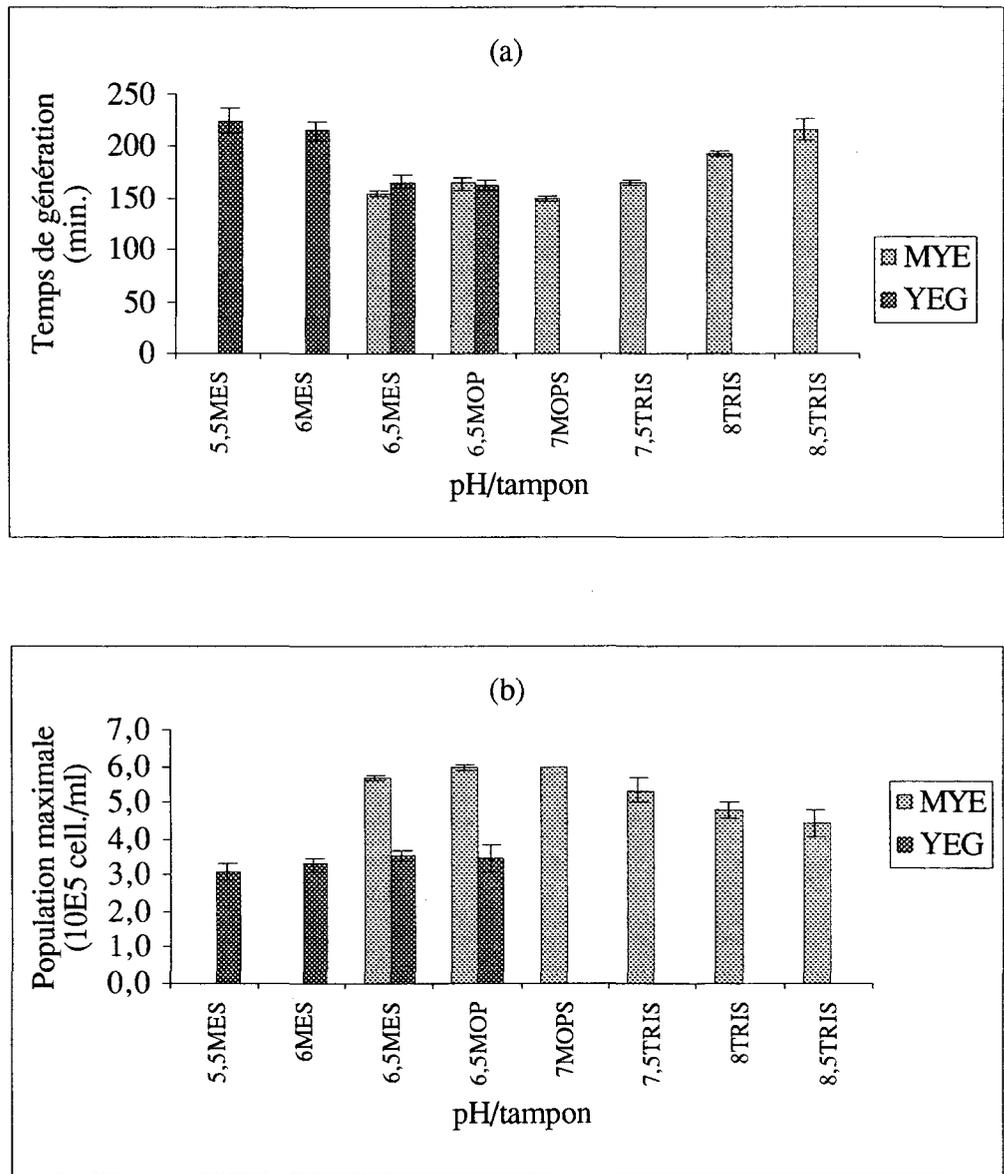


Figure 17 : Temps de génération (a) et populations maximales (b) de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différents pH de milieu de culture.

En combinant les résultats trouvés pour les temps de génération et les populations maximales, nous pouvons conclure que les pH permettant d'avoir les meilleurs critères de croissance de *Tetrahymena* sont les pH 6,5 et 7,0.

Si la baisse du temps de génération n'est que de 4% entre les pH 5,5 et 6,0, elle est de 23% entre 6,0 et 6,5, si l'on reste en milieu YEG, et de 28% si l'on passe en milieu MYE. De 6,5 à 7,0, la différence de temps de génération n'est que de 4% au bénéfice du pH 7,0, ce que l'analyse statistique considère comme négligeable. De pH 7,0 à pH 8,5, l'évolution des temps de génération est sensiblement similaire à ce qui se passe en deçà de pH 7,0.

En ce qui concerne la population maximale, on note une augmentation sensible entre pH 6,0 et 6,5 d'une part (+73%), et d'autre part une augmentation du même ordre à pH 6,5 quand on passe du milieu YEG au milieu MYE (+60%) et pour un même tampon, ce qui nous montre l'influence du milieu de culture. De plus, la nature du tampon utilisé n'influe pas sur les résultats ; nous avons pu le vérifier en utilisant chacun des deux tampons MES et MOPS à pH 6,5 (figure 17). Entre pH 7,0 et 7,5, la population maximale ne baisse que de 10,7%, et ce rythme se maintient jusque pH 8,0.

Le pH du milieu de culture semble donc influencer davantage la population maximale atteinte que le temps de génération.

I.2.3. Détermination de la température optimale de culture

Cinq températures sont testées sur milieu MYE : 25, 28, 31, 34 et 37°C.

L'histogramme représentant le temps de génération en fonction de la température (fig.18a) montre un minimum à 34°C, confirmé par le test de Newman et Keuls (Annexe C, tableaux C19 à C23). Par contre, en ce qui concerne la population maximale atteinte (fig.18b), plus la température augmente, plus elle diminue de façon significative ; entre 25 et 37°C, elle chute de 47%. 25°C favorise les meilleurs résultats en biomasse.

I.3. DISCUSSION

Les exigences liées au milieu de culture en vue d'une adaptation à des milieux industriels résident dans la couverture des besoins nutritionnels du protozoaire, d'une part, et dans l'aspect économique du produit et sa simplicité de préparation d'autre part. Les milieux complexes (non définis) vont permettre d'allier ces différentes exigences grâce au mélange

- d'une part de substrats naturels : extrait de levure, lait écrémé qui vont permettre de satisfaire les besoins en acides aminés, vitamines
- d'autre part des sous-produits industriels : solubles de pomme de terre, solubles de maïs, maltodextrines.

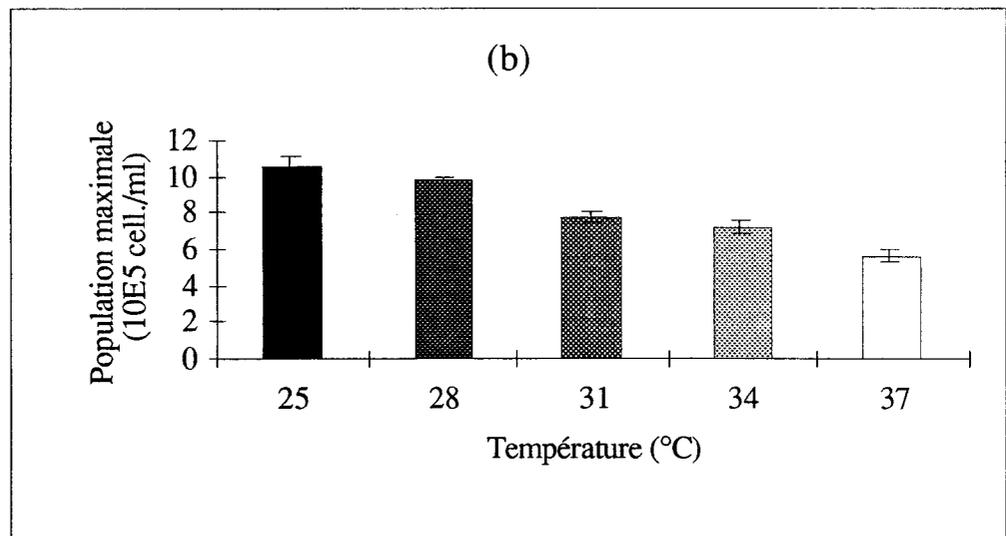
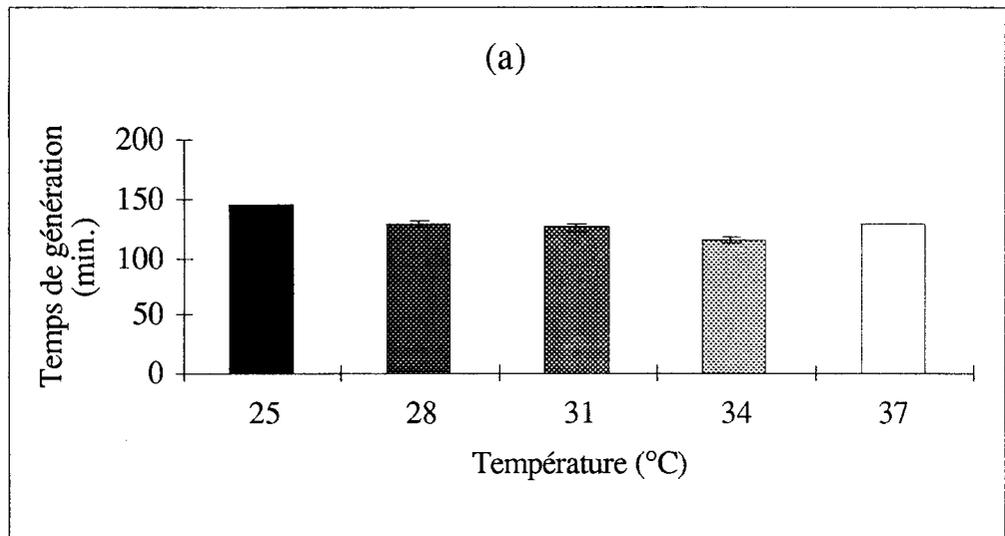


Figure 18 : Temps de génération (a) et populations maximales (b) de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différentes températures d'incubation.

De façon générale, le milieu MYE représente une bonne alternative au milieu semi-synthétique PPYS dans le cas d'une culture de cellules à des fins industrielles. D'après Hill (1972), les ciliés utilisent d'abord des acides aminés ou des peptides, fournis par l'extrait de levure pendant que les protéines commencent à être hydrolysées par des enzymes exocellulaires ou trans-membranaires (Florin-Christensen *et al.*, 1989, 1990). En revanche, d'après Ethuin (1993) les performances du milieu MYE ne sont pas dues au lactose présent dans le lait écrémé, pas ou peu utilisé en début de culture, car le galactose issu de son hydrolyse par la β -galactosidase (Ethin, 1989) aurait tendance à ralentir la division cellulaire. Il en résulte que les protéines dégradées grâce aux protéases de *Tetrahymena* servent bien sûr de sources d'acides aminés mais aussi, comme les lipides, de source d'énergie et ceci avant les glucides. Ainsi le glucose ne serait utilisé qu'en fin de croissance exponentielle, ce qui expliquerait la supériorité de MYE en termes de temps de génération, tant sur PPYS que sur les milieux YE améliorés, et en particulier sur YEG. En revanche, une étude de Kiy et Tiedtke (1992) montre que l'ajout de glucose au milieu MYE allonge la phase stationnaire, ce qui peut s'expliquer par l'abaissement du pH du milieu de culture.

L'enrichissement en fer du milieu PPYS, dont Rasmussen et Orias (1976) ont montré l'effet bénéfique sur la croissance de *T. pyriformis*, ne permet pas à ce milieu de donner des résultats supérieurs à ceux du milieu MYE. Toutefois, l'effet bénéfique de l'ajout de solution minérale peut expliquer les meilleurs résultats obtenus sur le milieu PPYS par rapport aux milieux à base d'extrait de levure (YEG, YEX, YEM et YEP).

Si l'on compare entre eux les milieux YE améliorés, les meilleures performances des milieux YEP et YEM par rapport à YEG peuvent s'expliquer par la plus grande richesse des deux premiers en éléments azotés et minéraux apportés par les solubles de pomme de terre (environ 7% d'azote et 30% de résidu à la calcination pour 100g de matière sèche) ou de maïs (environ 10% d'azote et 20% de résidu à la calcination pour 100g de matière sèche), ce qui constitue encore une preuve de l'intérêt des sous produits de l'industrie que sont ces solubles. En revanche, les faibles performances du milieu YEX par rapport à YEG nous confirment que *Tetrahymena* préfère le glucose comme apport glucidique (qui n'est présent qu'à 0,03 % dans le milieu YEX) à tout autre sucre simple ou plus encore polymérisé. YEX contient en effet 4,5 % de glucides totaux, dont seulement 0,03% de glucose).

Notre choix s'est arrêté sur le milieu MYE, qui présente l'avantage de combiner performance en terme de croissance, faible coût et simplicité de préparation. A titre indicatif, il est intéressant de noter que le prix du milieu MYE est estimé égal au quart de celui de PPYS ceci s'expliquant par le fait que le coût de la poudre de lait écrémé représente environ 1% du prix de la poudre de protéose peptone utilisée dans le milieu PPYS.

Concernant la composition du milieu MYE, les résultats sont comparables à ceux de Saliba *et al.* (1983). Par contre, Kiy et Tiedtke (1992) observent, pour une teneur en extrait de levure de

0,5%, une augmentation continue de la population maximale lorsque la teneur en lait écrémé varie de 0 à 4%. Par contre ils observent le plus faible temps de génération avec 2% de lait écrémé. Nous pouvons confirmer l'hypothèse de Saliba (1984) selon laquelle les acides aminés libres de l'extrait de levure sont consommés dans un premier temps. Cet auteur postulait également que la vitesse à laquelle sont synthétisées les protéases (responsables de l'hydrolyse des protéines du lait et notamment de la caséine et de la libération de leurs acides aminés) varie avec la teneur en extrait de levure. Dans notre cas, le pourcentage le plus élevé en extrait de levure ne donne pas forcément la croissance la plus importante, à taux de lait écrémé identique. Finalement, notre choix, aidé par l'exploitation statistique des résultats, s'est arrêté sur le couple composé de 1% d'extrait de levure et 1% de lait écrémé.

L'utilisation du fermenteur se révèle comme le mode de culture le plus intéressant pour la production en masse de *T. thermophila*. Signalons que la production à l'échelle ou semi industrielle des protozoaires n'est guère connue et *Tetrahymena*, l'un des organismes les plus utilisés pour des études biologiques, biochimiques et autres comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, a été peu étudié dans cette optique, si ce n'est par Gosselin *et al.* (1989), Kiy et Tiedke (1992), Saliba (1984) et Ethuin (1993).

L'une des raisons de l'absence d'une optique industrielle est probablement liée au coût longtemps élevé des milieux de culture ; mais ce problème a été résolu par la détermination d'un milieu de culture à base de lait écrémé et d'extrait de levure. Il est indéniable que *Tetrahymena* ne peut que bénéficier d'une meilleure oxygénation grâce à l'aération du fermenteur.

Un autre point d'intérêt réside dans le fait qu'à priori, la culture de *Tetrahymena* peut se faire dans un matériel standard, sans adaptations particulières que l'on pourrait avoir du fait de la plus grande fragilité du protozoaire par rapport à d'autres microorganismes.

D'après nos résultats, le pH initial de MYE, soit 6,8, est optimal, puisque situé dans la fourchette de pH optimal déterminée tant pour le temps de génération que pour la population maximale. Il n'est donc pas nécessaire d'ajuster le pH du milieu MYE avant inoculation. Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus par Saliba (1984), nous constatons que celui ci avait trouvé, concernant le temps de génération, un optimum de départ de pH à 5,5 sur milieu MYE, alors que ce temps de génération était multiplié par 3 à pH 4,5 et remontait progressivement pour arriver à 50% de plus à pH 7,0. Il nous semble d'ailleurs surprenant que Saliba parvienne à travailler sur milieu MYE quel que soit le niveau de pH malgré la sensibilité de la caséine à l'acidité. Au microscope, il observait à pH 5,5 une division cellulaire accélérée associée à une mortalité élevée, le premier phénomène compensant probablement le second. Ce résultat reste néanmoins surprenant.

Nos expérimentations ne font pas apparaître une valeur optimale de température puisque les résultats obtenus pour les temps de génération et les populations maximales ne coïncident pas ; ils confirment ce que Ethuin (1993) avait observé avec le mutant SJ180 *vac+* sur trois

milieux de culture différents dont MYE, à savoir une dissociation entre température optimale pour le temps de génération d'une part et population maximale d'autre part. Pour ce deuxième critère, elle obtient néanmoins une chute de population maximale moins forte que nous (34%). On peut expliquer cette discordance entre ces deux optima par le fait qu'une température de 34°C favorisera la division cellulaire en activant les systèmes enzymatiques, mais ne favorisera pas la conservation de la biomasse.

Il nous a donc fallu déterminer arbitrairement une température de culture. Notre choix s'est porté sur 28°C qui semble être un bon compromis pour les deux paramètres de croissance. De plus, d'après les tests de Newman-Keuls, cette température se situe toujours dans un groupe proche du meilleur, à la fois pour les temps de génération et les populations maximales. Enfin cette température est celle à laquelle nous avons travaillé jusqu'ici, puisque nous avons retenu la température préconisée par Ethuin lors du même type d'étude. Notons que la limite supérieure de température de croissance de *T. thermophila* est de 44°C (Hill, 1972).

L'intérêt de la culture en fermenteur ayant été mis en évidence, les paramètres physico-chimiques de pH et de température ayant été fixés pour le milieu MYE, les étapes suivantes de notre travail se sont orientées sur l'amélioration de la culture de *Tetrahymena* en fermenteur, du point de vue de sa croissance d'une part, mais aussi de sa production enzymatique d'autre part.

II / PRODUCTION ENZYMATIQUE EN FERMENTEUR

Nous avons choisi de mettre à profit la grande quantité de culture en fermenteur pour suivre l'évolution d'une part de l'activité protéasique précédemment mise en évidence par Ethuin (1993) et mesurée sur hémoglobine, d'autre part de l'activité glycosidasique mesurée sur amidon et pullulane, étudiée par Banno *et al.* (1987). Cette étude a été réalisée sur les différents milieux testés plus haut, qui n'avaient jusqu'ici été considérés que dans le cadre strict de la croissance.

II.1. RÉCUPÉRATION DU SYSTÈME CELLULAIRE ET ENZYMATIQUE : COMPARAISON ENTRE CENTRIFUGATION ET MICROFILTRATION

Une étape préliminaire a consisté en la récupération du système cellulaire dans les meilleures conditions possibles, le but étant de disposer d'une méthode de séparation du surnageant et des cellules préservant l'intégrité de celles-ci.

Tableau 9 : Récupération du système cellulaire : comparaison entre centrifugation et microfiltration

Le milieu de culture est du MYE

La centrifugation a été réalisée à 3°C et 1000 tr/min.

La microfiltration a été réalisée sur fibres creuses de 0,55µm de porosité.

La concentration cellulaire en fin de fermentation était de $1,92 \cdot 10^6$ cellules/ml

Procédé & produit	Volume (ml)	Activité protéasique (U)	Rendement* (%)	Protéines (mg)	Rendement* (%)	Bio masse		Rendement (%)
						(cell./ml)	nombre de cell.	
CENTRIFUGATION								
milieu de culture	27,9	17,4	100,0	109,4	100,0	1,92E+06	5,34E+07	100,0
surnageant	24,5	9,4	53,8	7,6	7,0	1,05E+04	2,57E+05	0,5
culot	13,0	6,9	39,8	99,2	90,7	2,85E+06	3,70E+07	69,3
			93,6		97,6			69,8
MICROFILTRATION								
milieu de culture	558,0	348,8	100,0	2192,5	100,0	1,92E+06	1,07E+09	100,0
perméat	532,0	259,7	74,5	839,3	38,3	1,34E+03	7,13E+05	0,1
rétenant	84,0	32,3	9,3	989,4	45,1	8,23E+06	6,91E+08	64,6
			83,7		83,4			64,7

* Les rendements (*en italique*) sont calculés par rapport à la quantité totale de cellules, d'activité protéasique et de protéines dans le milieu de culture.

Les chiffres en gras représentent la somme des rendements

Deux méthodes d'obtention du matériel biologique ont été comparées sur une culture en phase stationnaire obtenue en milieu MYE : la centrifugation (4686g, 20 min., 3°C) et la microfiltration tangentielle (débit de la pompe : 1,54 L.h⁻¹, pression : 1 bar, porosité des fibres creuses : 0,55 µm) dont le dispositif est schématisé dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

II.1.1. Bilans cellulaire et enzymatique

L'examen du tableau 9 révèle que les deux techniques donnent des pourcentages de récupération cellulaire comparables ; toutefois on note un pourcentage légèrement supérieur avec la centrifugation (69,3 contre 64,8% pour la microfiltration), ce qui revient à dire *a priori* que les cellules après centrifugation sont en meilleur état qu'après microfiltration ; toutefois il convient de noter que le dispositif de microfiltration comporte un volume mort d'environ 100 ml pour le rétentat, volume contenant de ce fait des cellules non comptabilisées bien qu'intactes pour une partie d'entre elles, ce qui représenterait ici 8,23.10⁸ cellules dans ce volume mort. La prise en compte de ce volume mort ramène le rendement total en cellules à 77,6%, soit 8,3% de plus que pour la centrifugation. Un examen microscopique révèle d'autre part que la méthode de microfiltration préserve davantage l'intégrité cellulaire ; celles-ci apparaissent dans leur forme normale, alors qu'après centrifugation, nombre d'entre elles semblent déformées et abîmées (figure 19, page 106), et l'on peut chiffrer cet endommagement à environ 40% des cellules, non décelable par la technique de comptage utilisée.

En ce qui concerne l'activité protéasique, retenue dans cette étude, on en récupère plus dans le perméat de microfiltration (74,5%) que dans le surnageant de centrifugation (53,8%) par rapport à la quantité initiale présente dans le milieu de culture ; mais dans le cas de la centrifugation, une part importante reste dans le culot (39,8%, contre 9,3% pour le rétentat de microfiltration) ; toutefois, il est impossible avec nos résultats de préciser si cette activité est présente liée aux membranes cellulaires ou libre. Un dosage d'activité hexokinase, intracellulaire, permettrait de répondre à cette question.

Concernant les protéines, le rendement inférieur observé pour la microfiltration ((83,4% contre 97,6%) peut s'expliquer par une perte observée aussi par d'autres auteurs dans les fibres de la cartouche de microfiltration. Nous savons par l'étude bibliographique que les activités hydrolasiques en général sont pour une part excrétées en cours de croissance, et d'autre part libérées lors de la lyse des cellules.

Les différences de répartition de l'activité protéasique nous amènent à considérer les deux techniques sous deux optiques différentes :

- d'une part, celle de la récupération des cellules dans le meilleur état possible : dans ce cas la bonne qualité de la récupération se traduira par une faible activité protéasique dans le surnageant ou le perméat, qui proviendrait de l'excrétion cellulaire dans le milieu ; dans ce cas, la centrifugation à 4686g est sans conteste une technique trop agressive et il conviendrait d'en baisser l'intensité.

(a)



(b)



Figure 19 : Observation microscopique de cellules de *Tetrahymena thermophila* BIII (X400) :

- dans un culot de centrifugation (1000 tr./min.) (a)
- dans un rétentat de microfiltration (b)

- d'autre part celle de la récupération d'activité enzymatique globale, c'est à dire celle excrétée en cours de croissance mais aussi celle qui est libérée lors de la lyse des cellules, localisée dans les lysosomes. Dans ce cas au contraire, l'agressivité d'une centrifugation à vitesse élevée ne poserait pas de problème.

Globalement la centrifugation dans les conditions présentées plus haut libère 4,8% d'activité en plus, 38,5% si l'on considère seulement le rétentat de microfiltration et le culot de centrifugation.

Enfin, il convient de signaler dans le cas de la microfiltration, la perte en protéines plus importante, perte qui peut s'expliquer par un phénomène de colmatage des fibres creuses fréquemment observé en microfiltration (Le et Atkinson, 1985 ; Cheng-Kang *et al.*, 1993).

II.1.2. Conclusion

Dans les conditions présentées ici, la microfiltration tangentielle se révèle être à la fois la méthode de choix pour l'obtention d'un perméat en vue d'études des enzymes excrétées par la cellule d'une part, et comme technique de concentration cellulaire pour des études de localisation cellulaire, d'autre part.

Des études préliminaires concernant l'influence de la vitesse de centrifugation du milieu en fin de croissance nous avaient montré au microscope une lyse des cellules après centrifugation à 4686g (figure 20, page 108), contre un endommagement seulement après la même opération à 1000g (figure 19). En choisissant de centrifuger nos échantillons à 1000g au lieu de 4686g dans le cadre du suivi enzymatique de nos cinétiques de fermentation, nous avons voulu nous affranchir au maximum de l'incertitude liée à l'origine (extra ou intracellulaire) de ces activités et choisi donc de suivre spécifiquement la sécrétion des protéases dans le milieu de culture.

II.2. INFLUENCE DU MILIEU SUR LA PRODUCTION ENZYMATIQUE : CINETIQUES DE PRODUCTION ENZYMATIQUE

2 modèles d'hydrolases ont été choisis pour le suivi des cinétiques de production enzymatique :

- l'activité protéasique : Nous avons appliqué pour le dosage les mêmes conditions de pH, température et substrat que celles appliquées pour les études de la souche mutée SJ180 (Ethuïn, 1993).
- l'activité glycosidasique testée sur amidon et pullulane (Barth, 1992)

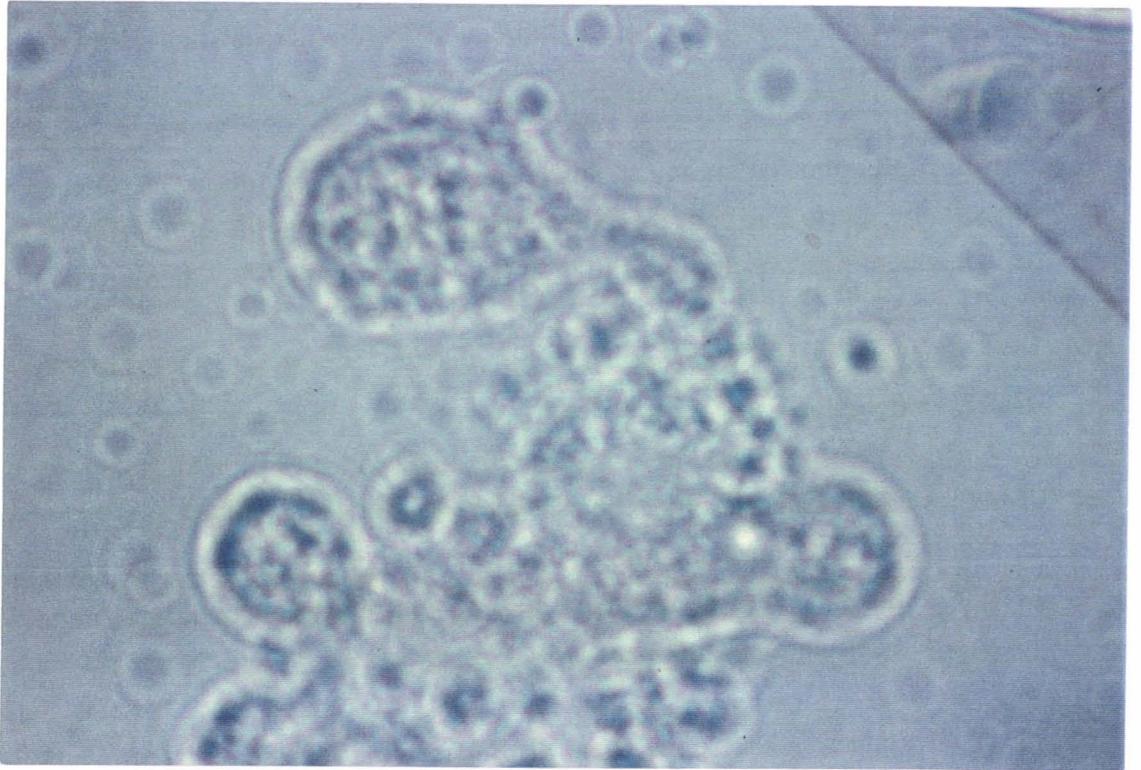


Figure 20 : Observation microscopique de cellules de *Tetrahymena thermophila* BIII (X400) dans un culot de centrifugation (4686g)

Les cinétiques de production enzymatique ont été suivies parallèlement à la croissance cellulaire

II.2.1. Activité protéasique

L'activité protéasique (figure 21, page 110 et annexe C, tableaux C24 à C28) apparaît de façon massive presque simultanément, à partir de 20 heures de culture, dans les milieux MYE, PPYS et, à un degré moindre, pour le milieu YEP. Cette cinétique d'excrétion est de type III des courbes de Gaden (métabolites secondaires), suit donc l'équation du type :

$$dP/dt = a(dX/dt) + bX$$

ce qui traduit le décalage existant entre la croissance et la production d'activité protéasique. Elle apparaît plus tardivement dans les milieux YEG et YEM, et plus faiblement surtout. La faible activité décelable dès les premières heures de fermentation n'est cependant pas à négliger. En termes d'activité spécifique ramenée au nombre de cellules, la phase " excrétrice " de la croissance se traduit par une baisse sensible de celle-ci, suivi par une phase plateau minimale. Lorsque la lyse des cellules est perceptible au comptage, on observe alors une légère remontée de l'activité spécifique. Il conviendrait, pour corroborer l'hypothèse de l'excrétion, de réaliser le même suivi mais en cassant les cellules avant dosage de l'activité protéasique ; en effet il est difficile à ce stade de faire la part entre l'excrétion active et l'augmentation de la densité cellulaire. Toutefois, des auteurs cités dans la revue bibliographique ont mis clairement en évidence le phénomène de l'excrétion des hydrolases (Tiedtke *et al.*, 1984 ; Tiedtke *et al.*, 1988).

II.2.2. Activités glycosidasiques

Le suivi de la cinétique de production de ces activités n'a été réalisé que sur les deux milieux présumés plus pauvres en protéines, mais plus riches en glucides, donc pouvant induire davantage la production d'activités glycosidasiques (figure 22, page 111 et annexe C, tableaux C29 et C30). Globalement, cette production glycosidasique, testée sur amidon et sur pullulane, est plus importante avec le milieu YEG, surtout lorsqu'elle est détectée sur l'amidon. La courbe de croissance et la population maximale atteinte avec le milieu YEX confirme nos observations faites lors de l'examen comparatif des paramètres de croissance ; les courbes d'activités nous montrent qu'en termes de production enzymatique, c'est la concentration du milieu en glucose qui va déterminer l'importance de cette production, sans doute l'effet Pasteur n'est-il pas étranger au processus. Par ailleurs, on observe ici comme pour la production protéasique une correspondance entre phase stationnaire et libération massive d'activité, tout du moins en ce qui concerne le milieu YEG où la production est facilement décelable.

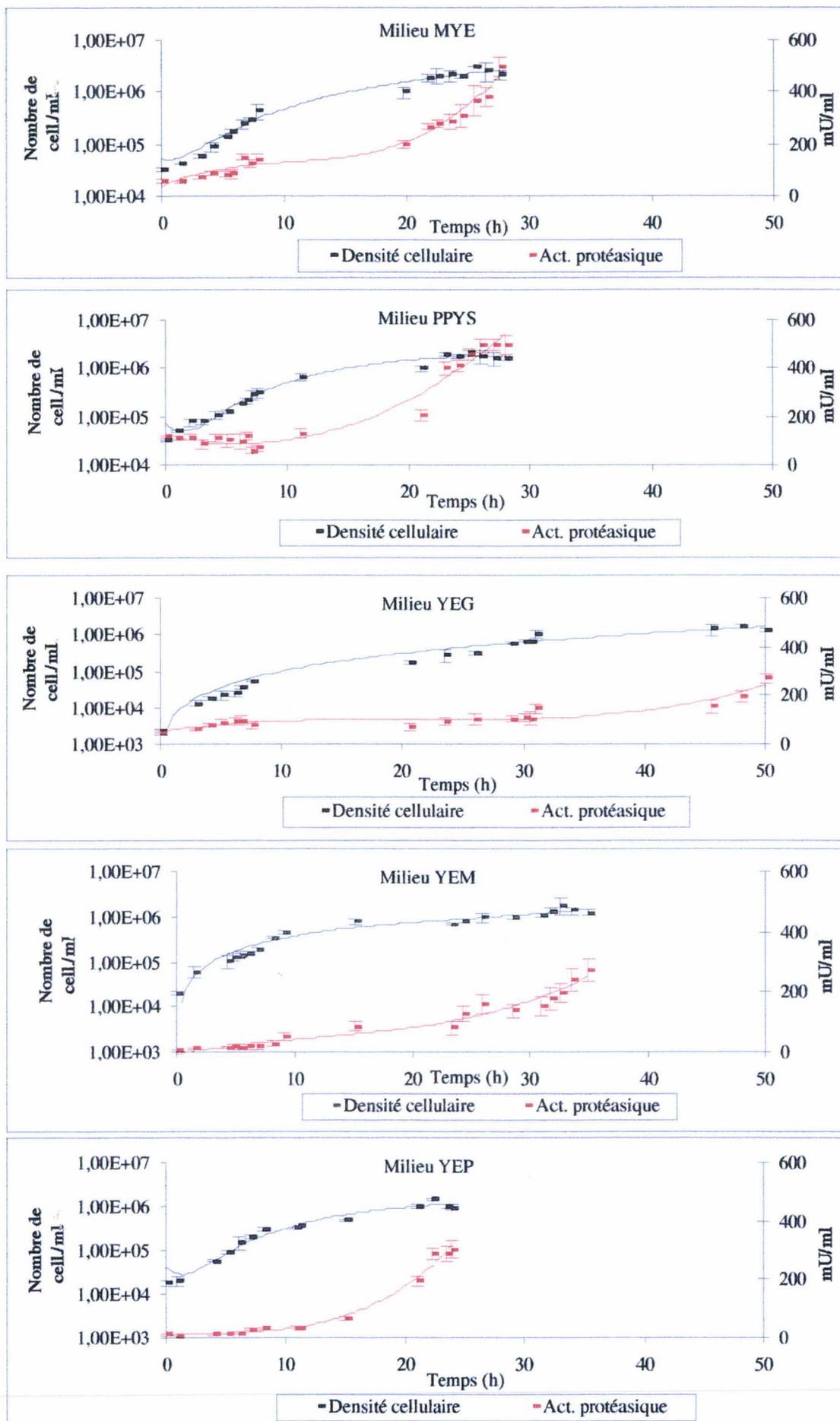


Figure 21 : Cinétiques de croissance et production des activités protéasiques lors de cultures en fermenteur de 2L de *T. thermophila* dans différents milieux de culture.

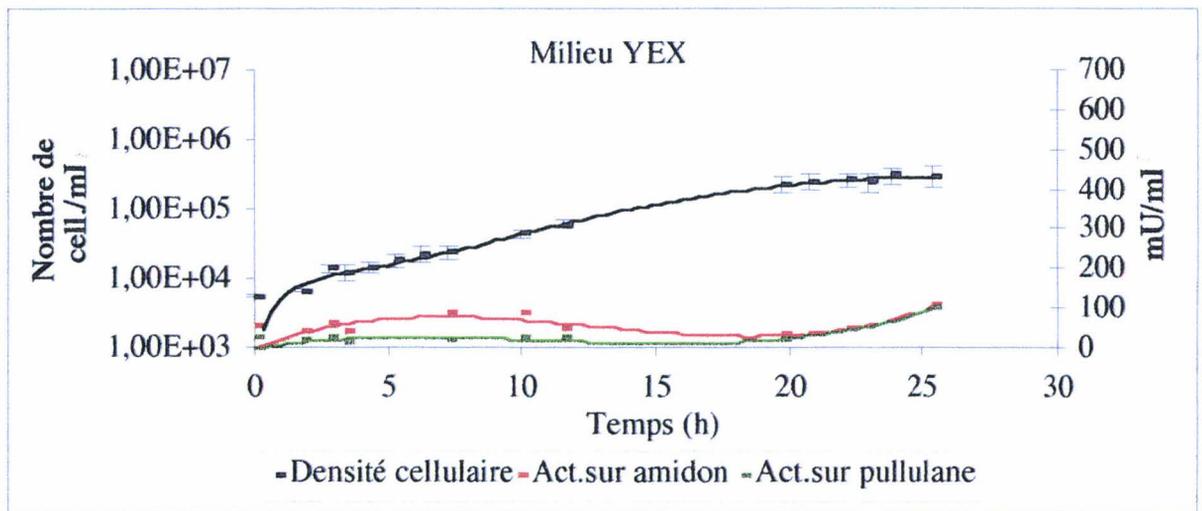
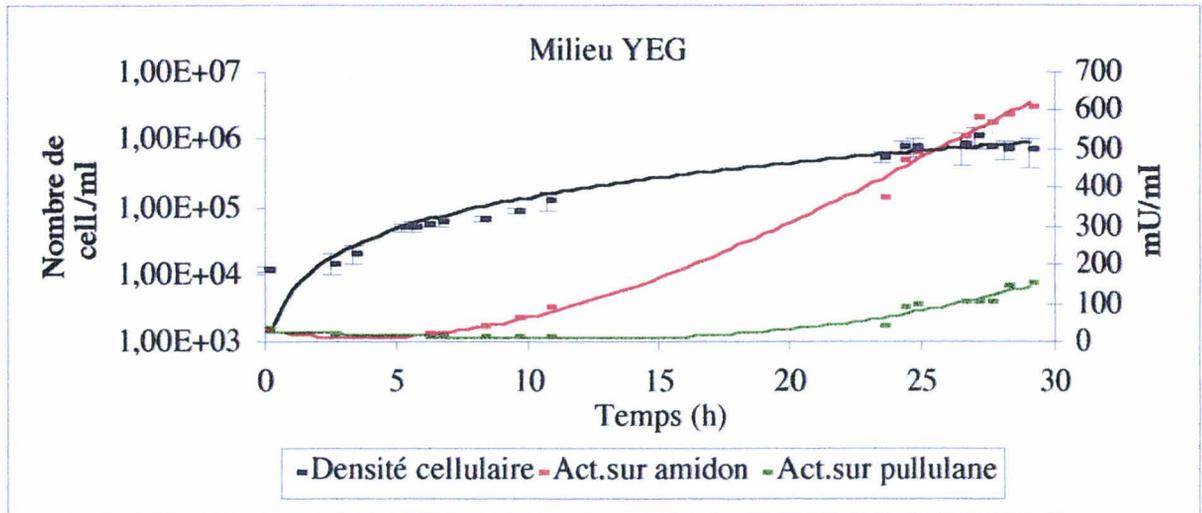


Figure 22 : Cinétiques de croissance et production des activités glycosidiques lors de cultures en fermenteur de 2l de *T. thermophila* BIII dans différents milieux de culture

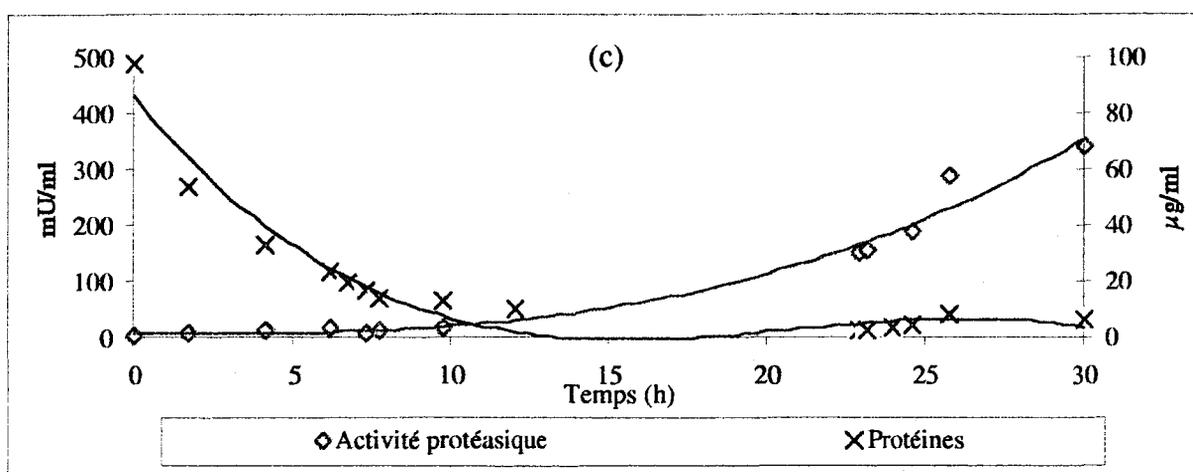
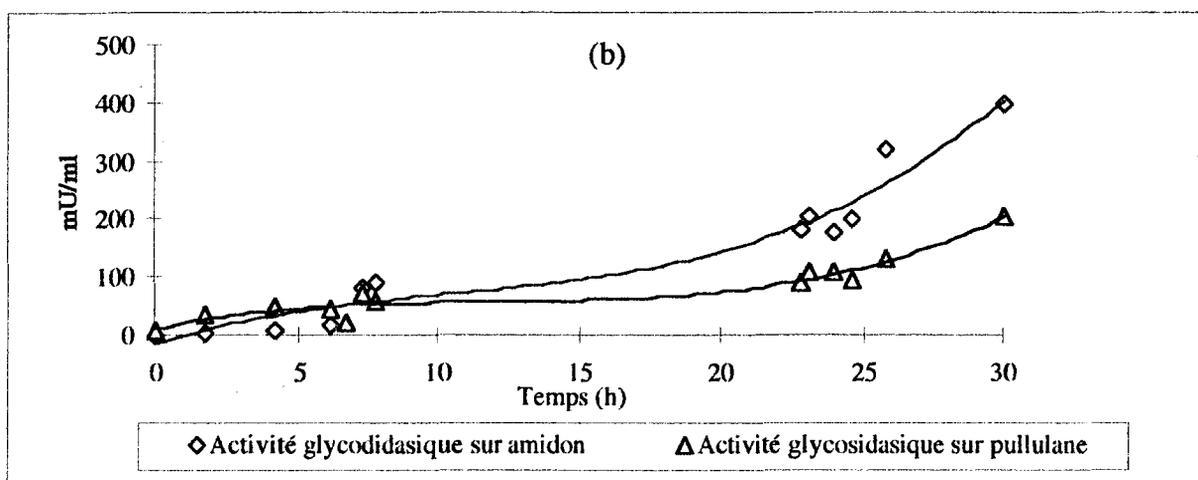
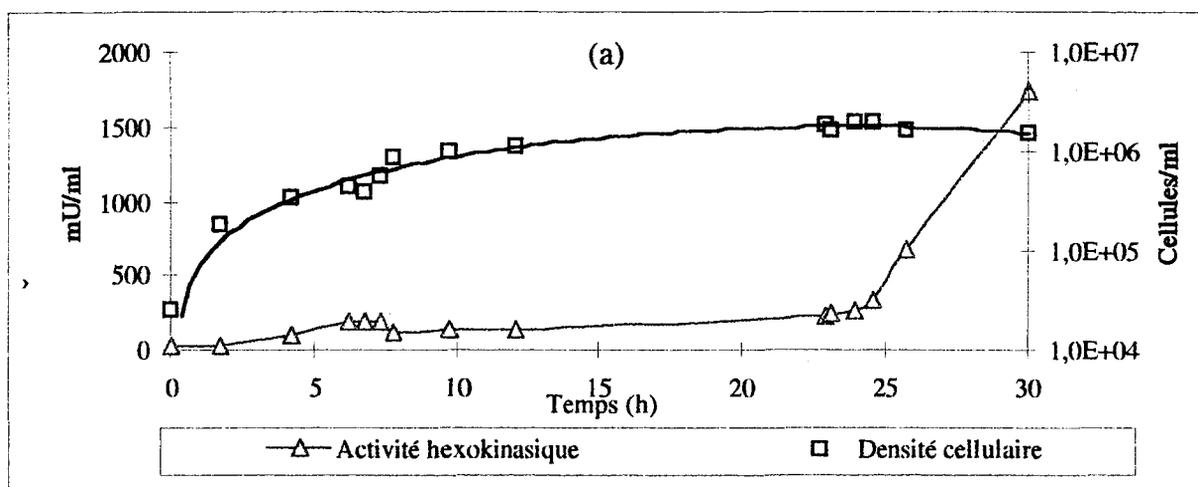


Figure 23 : Cinétiques de croissance et de lyse cellulaire dans le surnageant (apparition d'activité hexokinase) (a), de production d'activités glycosidasiques (b), et d'activité protéasique en relation avec la consommation des protéines (c) - Suivi réalisé sur le surnageant d'une culture de *T. Thermophila BIII* en fermenteur de 2 litres - Milieu MYE - Agitation : 300 trs/min. - Aération : 1,0 vvm. La culture a été arrêtée en fin de phase stationnaire – Moyenne de deux essais

II.3. DISCUSSION

La montée brusque et tardive de cette activité, observée sur l'ensemble des milieux à partir de la phase de ralentissement ou en début de phase stationnaire laisse penser que l'on a affaire à des activités protéasique et glycosidasiques d'origine lysosomale (Kiy *et al.* 1993) libérées par excrétion lors de la phase de croissance exponentielle d'une part, et lors de la phase stationnaire, par la lyse croissante des cellules, phénomène " passif ", d'autre part. Cette lyse permettrait la libération massive du contenu cellulaire dans le milieu de culture et donc des lysosomes contenant ces enzymes. L'hypothèse d'une origine intra-cellulaire des activités enzymatiques en relation avec un début de lyse cellulaire a été vérifiée lors d'une fermentation avec suivi de la lyse cellulaire sur milieu MYE (figure 23) par dosage de l'activité hexokinase ; nous pouvons en effet établir une relation de cause à effet entre la lyse cellulaire et la libération massive des activités de quelque nature qu'elles soient, par contraste avec une excrétion active mais modérée de ces activités en phase exponentielle. Étant donnée la population maximale atteinte avec le milieu MYE, on peut penser que la lyse des cellules issues de la culture sur ce milieu donnera une quantité sensiblement plus importante d'activité protéasique par rapport aux autres milieux de culture. De même, concernant les activités glycosidasiques, la lyse des cellules cultivées sur le milieu YEG sera sans doute plus productive en terme d'activité glycosidasique libérée par rapport au milieu YEX.

Une détermination des activités protéasiques et glycosidasiques après concentration (seuil de coupure : 5000 Da) des surnageants de culture (figures 24 & 25, page 114) nous a permis de confirmer que les milieux MYE, YEP et YEM sont les plus adaptés à la production protéasique, alors que les milieux YEG et YEX sont les plus adaptés à une production glycosidasique. ce qui peut s'expliquer par le fait que celle-ci est favorisée par la présence de glucose dans le milieu de culture.

Cependant, l'obtention de quantités massives d'activité enzymatiques suppose ici une lyse totale des cellules en fin de fermentation, procédé qui nous place donc obligatoirement dans une optique de process en batch d'une part, et nécessite une trentaine d'heures supplémentaires suivant le début de lyse des cellules, puis une procédure de séparation des cellules et du surnageant par centrifugation ou microfiltration. Or, la libération d'enzymes exocellulaires dans le milieu de culture en cours de croissance présente beaucoup plus d'intérêt commercial si le procédé de séparation des enzymes réside dans le simple traitement du milieu de culture sans nécessité de toucher aux cellules elles-mêmes, surtout si l'on souhaite travailler en continu. Une amélioration de la production de ces enzymes exocellulaires en cours de croissance présenterait donc plus d'intérêt dans une optique économique et nous avons donc intégré ce but dans la suite de nos travaux.

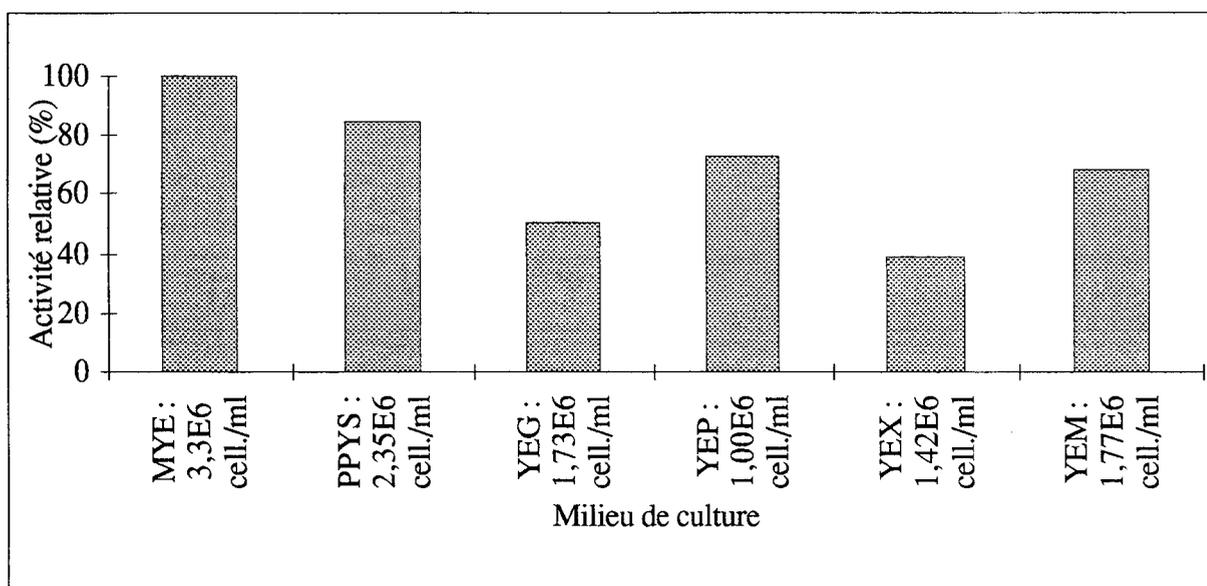


Figure 24 : Comparaison des productions finales d'activité protéasique par *T. Thermophila* BIII après concentration des milieux en fin de culture

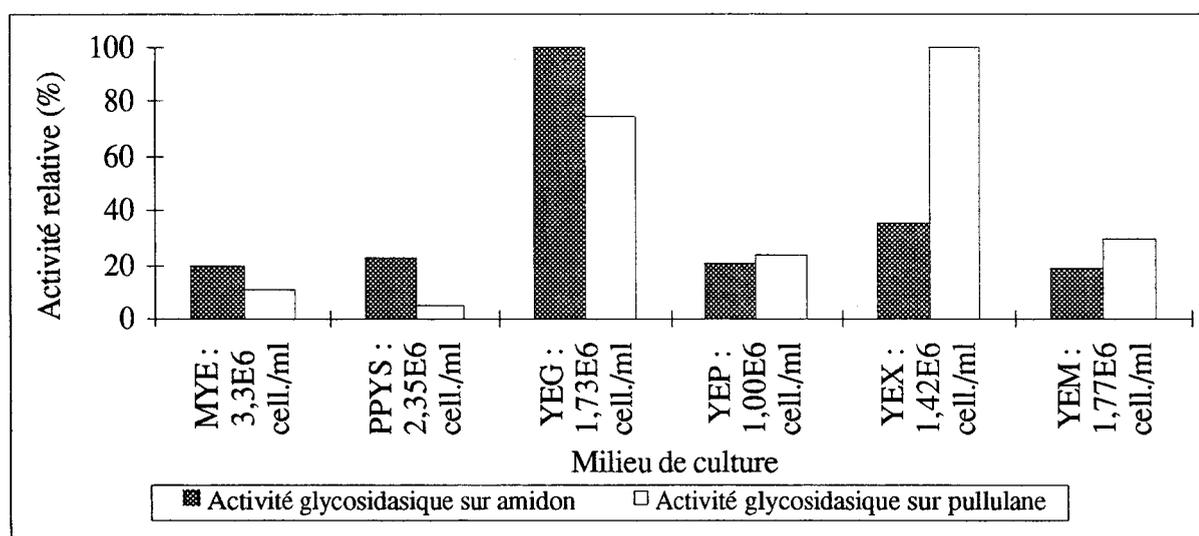


Figure 25 : Comparaison des productions finales d'activité glycosidasique par *T. Thermophila* BIII après concentration des milieux en fin de culture

À ce stade de notre étude nous avons choisi de nous limiter à un type d'activité enzymatique en vue d'améliorer la production de cette activité en fermenteur. Notre choix s'est porté sur l'activité protéasique. En effet, North (1982) signale dans sa revue sur les protéinases des eucaryotes inférieurs, une spécificité intéressante de nombreuses protéases de *Tetrahymena* identifiées comme cystéines-protéases, ce qui est rare chez d'autres eucaryotes comme les champignons par exemple. Ceci est confirmé par Munro (1985) qui montre l'importance des enzymes digestives chez les protozoaires en général, précisant que les activités lysosomales protéasiques sont beaucoup plus élevées que celles observées dans les organes d'eucaryotes supérieurs comme le foie du rat par exemple. Ces constatations nous laissent entrevoir les enjeux d'une maîtrise de la production industrielle d'enzymes apparentées aux protéases du système digestif des mammifères à un moindre coût que l'extraction actuelle de ces enzymes d'organes animaux. Il convient à ce propos de préciser que les enzymes lysosomales produites par les protozoaires sont glycosylées, ce qui n'est pas le cas des enzymes extraites d'autres eucaryotes inférieurs ou des bactéries.

III / AMELIORATION DE LA CULTURE ET DE LA PRODUCTION D'ENZYMES EN FERMENTEUR

Le comportement de *T. thermophila* BIII est étudié ici grâce à des paramètres chimiques et biochimiques (pH, O₂ dissous, activités enzymatiques) et à des paramètres de croissance (population maximale, temps de génération, stabilité de la phase stationnaire). Toutefois, le temps de génération, bien que fournissant une information précieuse sur la vitesse de multiplication cellulaire, n'est pas forcément retenu comme critère de choix lorsqu'il s'agit davantage de maintenir une population maximale le plus longtemps possible en phase stationnaire.

III.1. INFLUENCE DE LA REGULATION DU pH

D'après la littérature présentée plus haut, un pH supérieur à 7,5, suite à la production d'ammoniaque, produit azoté le plus excrété, cause une mort prématurée des cellules, ce qui se traduit par une phase stationnaire relativement courte. Nous avons déterminé plus haut que le pH optimum de croissance en flacon était compris entre 6,5 et 7,0, le pH initial du milieu MYE de 6,8 étant de ce fait considéré comme optimal. Avec la fermentation témoin (sans régulation), le pH ne change presque pas au cours des dix premières heures, puis il augmente linéairement alors que les cellules sont en phase exponentielle de croissance (figure 26, page 116).

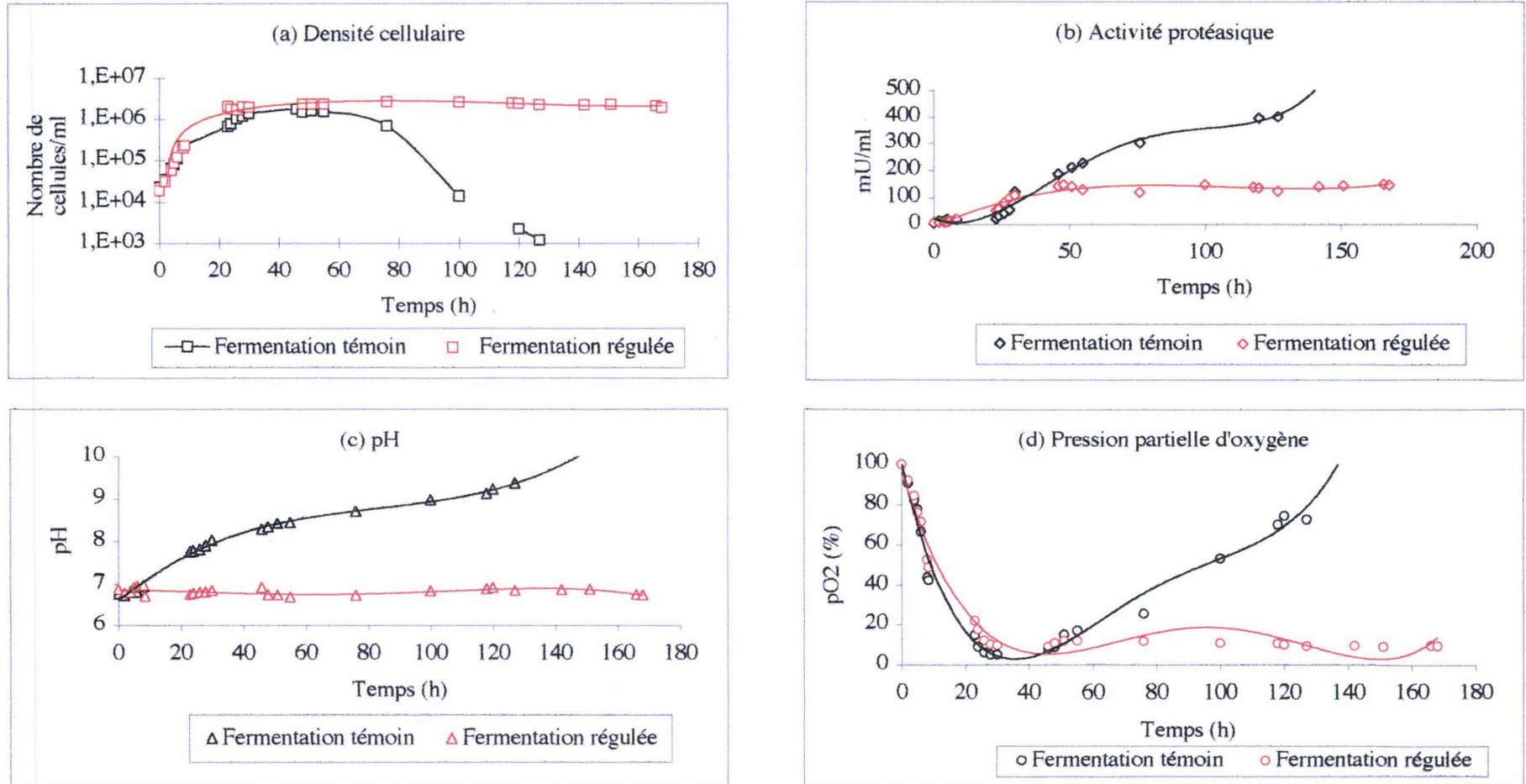


Figure 26 : Influence de la régulation du pH sur la croissance cellulaire (a) et la production protéasique (b) de *T. thermophila*, l'évolution du pH (c) et de l'oxygène dissous (d) dans le milieu de culture - Culture en fermenteur de 2 litres - Milieu MYE

On observe ensuite une inflexion dans la courbe de pH qui correspond au début de la phase stationnaire, soit après environ 24h de culture, mais le pH continue néanmoins d'augmenter pour atteindre 8,7 en fin de phase stationnaire ; une seconde inflexion marquant une accélération de l'alcalinisation s'observe en début de lyse cellulaire. En fin de lyse, le pH atteint près de 9,4. En résumé, le pH subit 2 paliers d'augmentation correspondant d'une part à la phase exponentielle de croissance (+15%), d'autre part à la phase de lyse (+12%), l'augmentation globale étant de 39%.

Il s'agissait de préciser le rôle de cette augmentation de pH qui provoque un arrêt de la croissance puis une lyse cellulaire. Pour cela, nous avons donc étudié l'influence de la régulation. En condition de pH régulé, celui-ci a été maintenu à la valeur initiale et optimale de 6,8 par ajout d'HCl 2M grâce à une pompe péristaltique.

III.1.1. Croissance cellulaire (figure 26a)

Le tableau 10 donne les valeurs des paramètres de croissance avec et sans régulation :

Tableau 10: Paramètres de croissance obtenus en culture de *T. thermophila* BIII sans ou avec régulation du pH du milieu MYE

	Fermentation témoin	Fermentation régulée
Temps de génération (min.)	134,8	133,4
Population maximale (cell./ml)	$1,72 \cdot 10^6$	$2,67 \cdot 10^6$

La régulation de pH a pour effet d'augmenter la population maximale atteinte (+55,2%) sans pour autant influencer la vitesse de croissance puisque le temps de génération ne diminue que de 1%, observation qui confirme celle de Prescott (1958) mentionnée dans l'étude bibliographique concernant l'incidence du pH sur la vitesse de croissance. Par ailleurs, on observe un allongement d'une centaine d'heures de la phase stationnaire. Cela confirme le fait que l'augmentation excessive du pH (au delà de 7,5), provoque non seulement un freinage puis une inhibition la croissance cellulaire, mais aussi une accélération de la lyse. La courbe d'évolution du pH évolue de façon identique à celle de la fermentation témoin, jusqu'en fin de croissance exponentielle ; par la suite, le pH de la fermentation régulée reste stable alors que celui de la fermentation témoin s'alcalinise comme nous l'avons vu plus haut.

Saliba (1984) suggère qu'en augmentant les concentrations initiales en poudre de lait dans le milieu MYE en plus de la régulation de pH, on pourrait augmenter encore davantage la population maximale sans pour autant influencer la vitesse de croissance.

Culture régulée et témoin montrent des évolutions comparables de l'O₂ dissous en cours de croissance exponentielle ; par contre ces évolutions divergent par la suite : la pression partielle d'oxygène remonte logiquement dès l'amorce de la lyse dans le cas de la fermentation témoin, pour revenir à 70% environ de la saturation initiale, alors qu'elles stagne à 10% de la saturation pour la fermentation régulée, ce qui confirme que les cellules ne croissent plus mais se maintiennent en vie.

Nous avons voulu savoir parallèlement si l'augmentation de la durée de la phase plateau présentait un intérêt dans le cas d'une production de métabolites, en l'occurrence les protéases.

III.1.2. Cinétique de production d'activité protéasique

L'allongement de la phase stationnaire (figure 26b) ne permet pas d'améliorer la production de protéase dans le surnageant, puisque celle-ci est légèrement inférieure dans le cas de la régulation. Si, en début de phase stationnaire (30h), la production protéasique de la fermentation témoin n'est supérieure que de 10,5% à celle de la fermentation régulée, elle la dépasse de 225% en fin de lyse (172h). En réalité ces écarts nous montrent que dans le cas d'une régulation, cette production protéasique est stabilisée ; il n'y a probablement plus de libération par lyse cellulaire mais seulement par excrétion, à la différence de ce qui se passe en l'absence de régulation.

La consommation des nutriments et/ou l'accumulation de métabolites inhibiteurs de la croissance semblent être les facteurs limitant la croissance de *Tetrahymena* dans une culture en batch, provoquant de ce fait une modification du pH du milieu de culture. On peut signaler à ce propos les résultats de Kiy et Tiedke (1992) qui, en ajoutant 1% de glucose à leur milieu contenant déjà 1% de lait écrémé et 0,5% d'extrait de levure, obtiennent en fermenteur lors d'une culture en batch, un allongement de la phase stationnaire d'une dizaine d'heures ; en effet, le glucose, en inhibant partiellement la respiration et en provoquant la formation d'acides organiques, contrecarre l'effet alcalinisant des ions ammonium. Cette propriété liée à la présence de glucose est d'ailleurs mise à profit dans l'utilisation du milieu YEG pour l'entretien des souches de *Tetrahymena*.

En conclusion, l'allongement de la phase plateau observé pour la croissance cellulaire permet le maintien d'une activité excrétrice des protéases sur une longue période ; globalement ceci a pour effet de nous permettre de récupérer plus d'activité par rapport à une récolte brutale et de courte durée, lors de la lyse cellulaire.

III.2. INFLUENCE DE LA REGULATION DE L'OXYGENE

La croissance et la vie de *Tetrahymena*, comme pour tous les organismes aérobies, dépendent de la présence de l'oxygène moléculaire dans leur milieu. Ainsi, la concentration en oxygène dissous dans un milieu liquide est un facteur important pour la croissance et ce d'autant plus que le nombre et la masse cellulaire augmentent.

Le transfert de la phase gazeuse vers les cellules doit permettre le maintien d'une concentration en oxygène dissous au moins égale à la concentration critique pour que la croissance se déroule dans les meilleures conditions. En effet, en dessous de cette concentration critique, le taux de croissance est inférieur au taux de croissance maximal et proportionnel à la concentration en oxygène (Saliba, 1984). S'il n'en est pas ainsi, le manque d'oxygène joue le rôle de facteur limitant et la croissance est ralentie. La concentration critique en oxygène, variable d'un microorganisme à l'autre est faible, de l'ordre de 0,1 ppm. Au fur et à mesure que le développement se poursuit, la concentration cellulaire augmente ; globalement, les caractéristiques rhéologiques et chimiques du milieu changent, ce qui entraîne des modifications de fonctionnement, les transferts ne s'effectuant plus de la même façon, d'où l'intérêt d'agir sur les modalités du fonctionnement (débit d'air, puissance d'agitation) pour faire en sorte que la population microbienne soit à tout moment dans les meilleures conditions et que son comportement cinétique soit optimal.

En fermentation non régulée (figures 27, page 120), l'oxygène dissous –exprimé en pourcentage de pression partielle, le 100% correspondant à un milieu saturé en oxygène en l'absence du protozoaire- commence à être consommé dès le début de la phase exponentielle de croissance. Le pourcentage en oxygène dans le milieu diminue pour atteindre une valeur minimale à la fin de cette phase exponentielle, correspondant à environ 10% de la saturation ; il amorce une remontée alors que les cellules commencent à se lyser, sans dépasser toutefois 17% de la saturation dans le cas présent puisque nous avons arrêté la culture en cours de lyse. Nous avons vu toutefois au paragraphe précédent pour cette même fermentation qu'en fin de lyse l'oxygène dissous remontait à environ 75% de la saturation. A titre indicatif, une saturation en oxygène du milieu de culture correspond à une concentration en oxygène dissous d'environ 14,7 ppm, à 28°C.

Dans cette étude nous avons cherché à déterminer si une régulation, c'est à dire un maintien à taux constant de l'apport en oxygène, contrôlable par l'agitation et l'aération, pouvait améliorer les différents critères de croissance étudiés, et en premier lieu maintenir plus longtemps les phases successives de croissance exponentielle puis stationnaire.

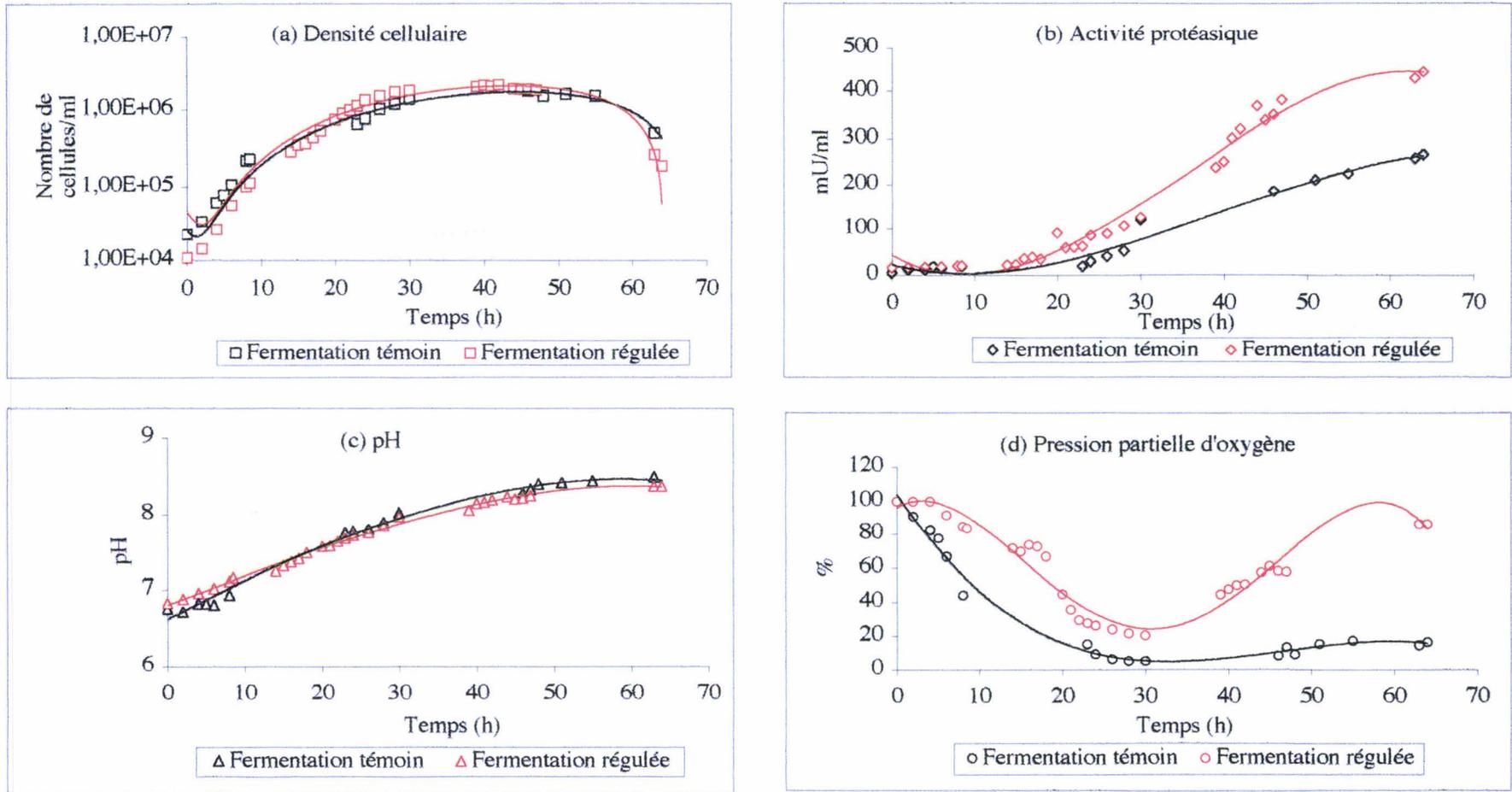


Figure 27 : Influence de la régulation de l'apport en oxygène sur la croissance cellulaire (a) et la production protéasique (b) de *T. Thermophila*, l'évolution du pH (c) et de l'oxygène dissous (d) dans le milieu de culture - Culture en fermenteur de 2 litres - Milieu MYE

III.2.1. Effet sur la croissance cellulaire

La concentration en oxygène (Figure 27d) dissous diminue avec la croissance cellulaire mais reste supérieure à 20% de sa valeur de saturation, alors qu'elle diminue jusque moins de 5% dans le cas d'une fermentation témoin. Cependant, le maintien de l'apport en oxygène au taux fixé initialement à 70% se révèle impossible dans la durée sauf en augmentant l'agitation mais la vitesse est alors trop importante pour ne pas endommager les cellules, puisqu'il nous fallait appliquer à partir de 20h de culture une vitesse supérieure à 700 tr.min.⁻¹. La combinaison de cette régulation avec celle du pH envisagée initialement n'a de ce fait pas été tentée.

Les deux courbes de croissance sont par conséquent presque superposées (Figure 27a). En réalité, on observe pour la fermentation régulée une population maximale supérieure de 23% à celle atteinte avec la fermentation témoin, mais cet écart reste toutefois dix fois moindre à celui observé avec et en l'absence de régulation de pH.

Tableau 11 : Paramètres de croissance obtenus en culture de *T. thermophila* BIII sans ou avec régulation de l'apport en oxygène au milieu MYE

	Fermentation témoin	Fermentation régulée
Temps de génération (min.)	134,8	128,2
Population maximale (cell./ml)	1,72.10 ⁶	2,11.10 ⁶

La régulation ne fait diminuer le temps de génération que de 5% ce qui est plus que l'effet obtenu par la régulation de pH mais reste modeste, bien qu'en accord avec le fait que la concentration en O₂ dissous influe sur la vitesse de croissance en phase exponentielle. Globalement, l'effet de la régulation se fait donc peu ressentir sur les critères de population maximale et de temps de génération d'une part, et pas du tout sur le maintien de la phase stationnaire comme nous le montre le graphique. Cette observation diffère de celles de Berline *et al.* (1982) qui ont montré que des cultures en batch de *Tetrahymena* entrent en phase stationnaire lorsqu'elles deviennent limitées en oxygène. De même, Hoffman et Cleffman (1981) ont noté que de plus grandes concentrations en oxygène dans le milieu n'améliorent pas significativement la densité cellulaire. Mais nos résultats ont montré une amélioration légère de la biomasse lorsque l'oxygène est régulé.

III.2.2. Effet sur la cinétique de production d'activité protéasique

La production protéasique dans le cas de la fermentation régulée est nettement plus importante que dans le cas de la fermentation témoin (figure 27b), à l'instar des deux courbes de croissance qui laissaient supposer un profil similaire de production enzymatique.

En fin de croissance exponentielle (30h), la différence se chiffre à 11% en faveur de la fermentation régulée, mais on arrive à 66,5% en phase de lyse (64h). Une explication à cette différence peut être proposée : durant la phase plateau, il est possible que l'activité excrétrice d'enzymes des cellules soit stimulée par un apport d'oxygène supplémentaire ; en effet, bien que ne pouvant être maintenue à 70% de la saturation, la régulation en oxygène permet de ne pas aller en deçà de 20%. Par contre, une fois la lyse amorcée l'effet stimulant de cet oxygène supplémentaire pourrait résider dans une libération plus importante d'activité lysosomale. On note toutefois dans la culture non régulée une forte production protéasique en fin de croissance, sans doute à cause de la lyse d'un grand nombre de cellules. Tiedtke *et al.* (1988) ont observé que le calcium stimulait la sécrétion d'hydrolases y compris de protéases. Nos résultats montrent quant à eux que l'oxygène maintenu en quantités suffisantes dans le milieu stimule aussi la sécrétion de protéases.

III.3. INFLUENCE DU COUPLE AÉRATION/AGITATION

Pour produire une culture de densité cellulaire et d'activité protéasique élevée, nous avons vu plus haut que des concentrations suffisantes en oxygène dissous dans le milieu de culture doivent être maintenues. Ceci justifie une étude conjointe de l'influence de l'agitation et de l'aération sur les critères de croissance et de production enzymatique. Différentes combinaisons de ces deux paramètres ont donc été testées pour optimiser ces facteurs.

Lors de l'étude suivante, la culture de la souche *Tetrahymena thermophila* BIII a été réalisée en examinant systématiquement l'influence des paramètres d'agitation et d'aération de la cuve de fermentation sur les critères de croissance (temps de génération, population maximale) et sur la production protéasique en fin de fermentation, sachant que le but de nos fermentations est une récupération de l'activité enzymatique excrétée lors de la croissance. Nous avons ainsi pu déterminer le couple composé de chacun de ces paramètres donnant à la fois un temps de génération, une population maximale et une production protéasiques optimales.

L'influence de ces paramètres sur le K_{La} a aussi pu être étudiée mais dans une moindre mesure, car nous n'avons que quelques mesures concernant ce critère. La mesure du K_{La} (coefficient volumétrique de transfert, h^{-1}) d'un bioréacteur permet d'évaluer ses capacités à transférer l'oxygène. Les K_{La} ont été déterminés selon la méthode dynamique de Taguchi et Humphrey (1966). Cette méthode présente le grand avantage de pouvoir conduire à la vitesse du K_{La} pendant le déroulement de la fermentation.

La concentration en oxygène dissous dans la phase liquide a été mesurée à l'aide d'une électrode. Les conditions d'agitation et d'aération sont choisies en vue d'éviter l'endommagement des cellules, afin de ne détecter que la sécrétion protéasique dans le milieu

de culture et non la production globale, ce qui constituerait un avantage notable en vue de développements ultérieurs de procédés (culture continue avec recyclage des cellules).

III.3.1. Plan d'expérience

Des expériences factorielles ont été utilisées pour cette étude. Vingt conditions consistant respectivement à aérer les cultures aux taux de 0,5 vvm, 1,0 vvm, 1,0 vvm et 2,0 vvm (Volume d'air par volume de milieu et par minute), et à les agiter aux vitesses de 0, 200, 300, 400 et 500 tours.min⁻¹ ont été testées, chaque combinaison étant effectuée trois fois.

L'interprétation statistique, quand elle était possible, a été réalisée par la méthode des moindres carrés.

III.3.2. Résultats

Tetrahymena est un microorganisme aérobic et sa croissance est influencée par la concentration en oxygène dans le milieu. Sans aération, la croissance reste à un très faible niveau (population maximale environ 10 fois inférieure que dans une culture en aérobiose) et la production protéasique détectée est faible aussi. La figure 28 (page 124) représente les histogrammes obtenus lors de cette étude pour les quatre critères étudiés. Les résultats concernant les Kl.a n'ont pas fait l'objet d'une analyse statistique, étant en quantités insuffisantes. De même, la dispersion des résultats obtenus en ce qui concerne la production protéasique en fin de croissance nous a empêchés d'appliquer une analyse statistique.

Pour une agitation donnée, on remarque que l'aération influence le temps de génération et la population maximale, sauf lorsque cette agitation est nulle, ce qui conforte l'importance de cette agitation pour une meilleure efficacité de l'aération. L'aération influence également la production protéasique, même pour une agitation nulle (figure 28, page 124).

Par contre, pour une aération donnée, on constate que la population maximale est davantage influencée par l'agitation que le temps de génération. La production protéasique, elle, est influencée par cette agitation ; en effet une agitation trop importante entraîne un risque de lyse cellulaire et donc de libération des protéases.

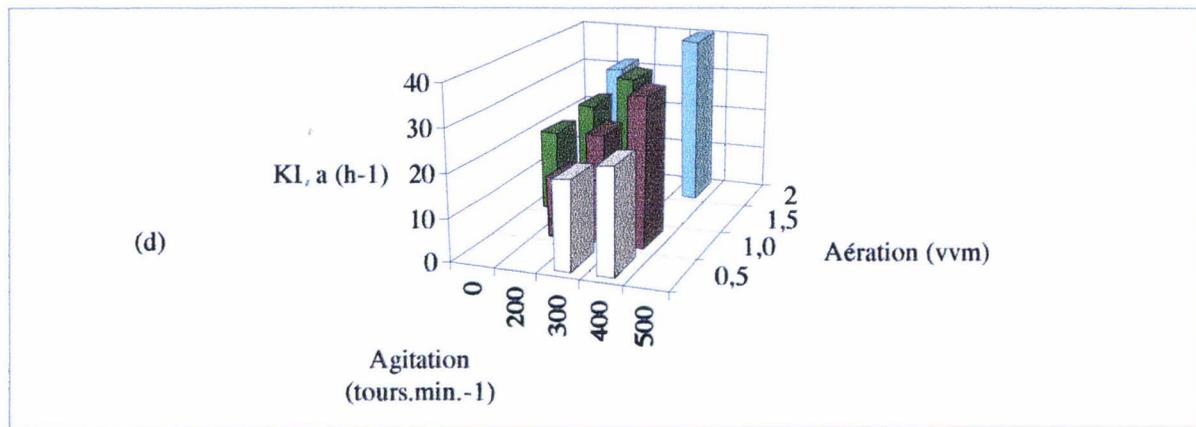
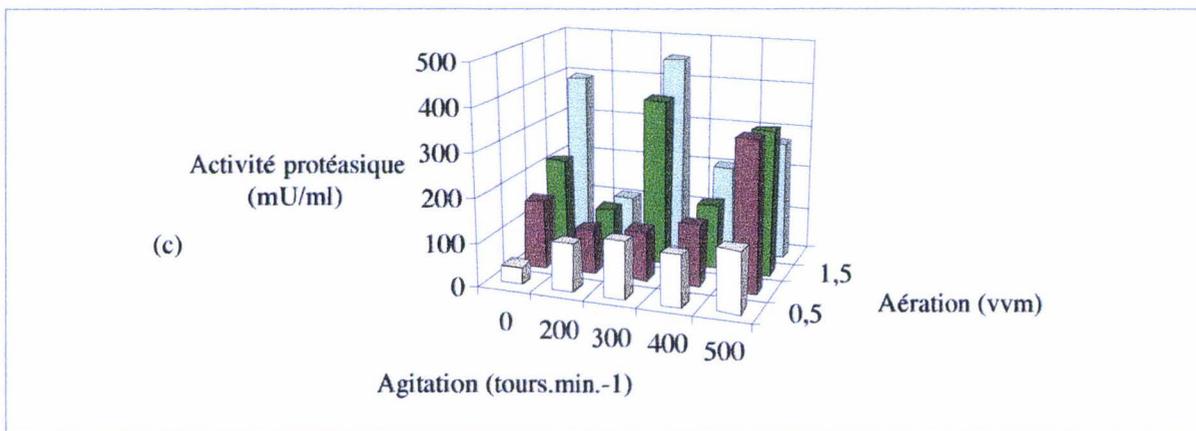
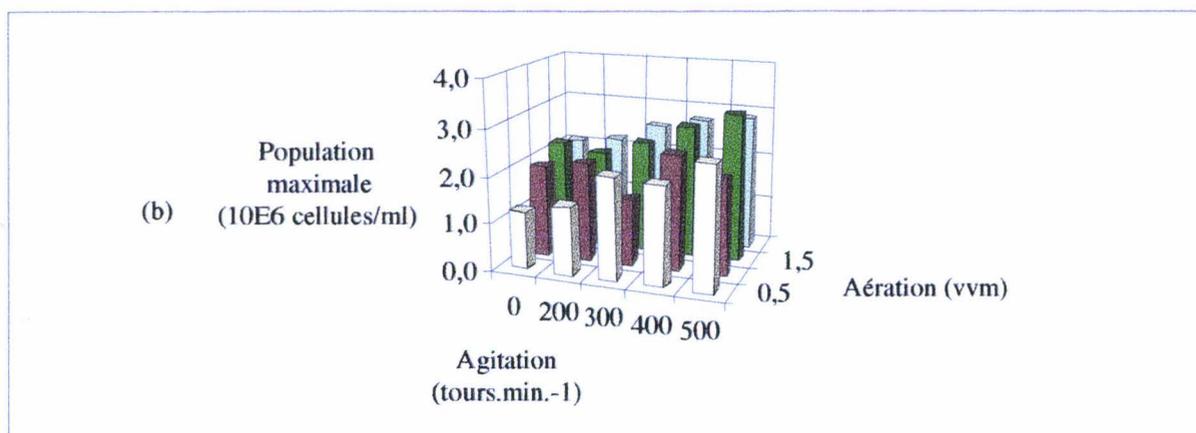
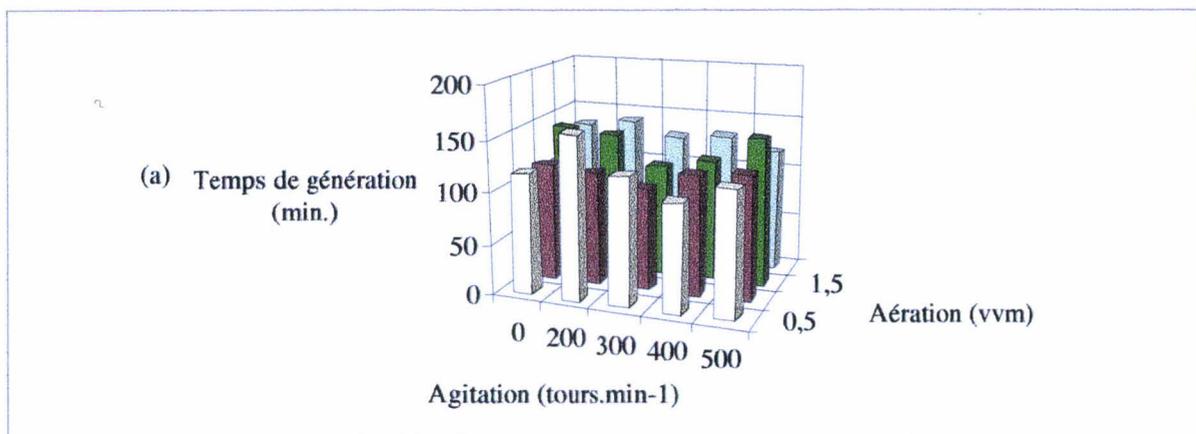


Figure 28 : Temps de génération (a), populations maximales (b), activités protéasiques (c) et coefficients de transfert (c) de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différentes conditions d'aération et d'agitation.

Dans tous les cas, on a une influence sur chaque critère mettant en évidence une valeur optimale de chaque paramètre. L'analyse statistique nous permet dans un premier temps de déterminer, pour chaque critère retenu, la meilleure agitation et la meilleure aération ((1) et (2), tab.12 ci-dessous). On voit que, dans le cas du temps de génération, toutes les conditions d'agitation se valent sauf une. Dans un second temps, on détermine la meilleure interaction (3), c'est dire un couple agitation/aération. La dernière étape du traitement statistique consiste à éliminer les couples donnant un temps de génération, une population maximale ou une activité protéasique non satisfaisants, ce dernier critère n'étant pris en compte qu'à titre qualitatif (4).

Tableau 12 : Résultats de l'analyse statistique

	Temps de génération	Population maximale	Production protéasique
(1) Meilleure agitation	toutes sauf 200 tours.min-1	500 tours.min-1	
(2) Meilleure aération	1,0 vvm	1,5 vvm	
(3) Meilleure interaction	400 tours.min-1 & 0,5 vvm	200 tours.min-1 & 1,0 vvm	
(4) Meilleure interaction globale	300 tours.min-1	et	1,5 vvm

En conclusion, pour produire une quantité optimale de biomasse et d'activité protéasique excrétée par *Tetrahymena*, la concentration en oxygène dissout doit être maintenue à un niveau suffisant dans le milieu avec respectivement comme agitation et aération des valeurs de 300 tr/min et 1,5 vvm. De façon générale, il apparaît que pour une agitation donnée, l'aération la plus importante n'est pas la plus profitable en ce qui concerne le temps de génération et la population maximale ; cela est le cas pour la production protéasique pour les agitations 0 et 300 tours.min⁻¹.

III.3.3. Discussion

Les cultures aérobies comme celle de *Tetrahymena* exigent l'introduction d'un gaz d'oxygénation, ici de l'air comprimé, dans le bioréacteur, qui crée au sein de la suspension microbienne une turbulence plus ou moins forte selon le débit, la pression et le mode d'introduction. L'agitation existante est due alors à la seule injection de gaz comprimé. Les opérations de mélange et de mise en suspension font dans le cas de notre fermenteur appel à de l'énergie mécanique au moyen de la pièce mobile que représente l'agitateur à pâles.

Cette agitation mécanique, en plus de réaliser les opérations de mélange et de mise en suspension, améliore l'émulsion en divisant les bulles de gaz introduites dans le fermenteur et en les faisant circuler dans le liquide.

Par ailleurs, il est probable que l'importance des forces de cisaillement réduit d'autant la taille des particules du milieu de culture, améliorant ainsi l'efficacité de l'apport nutritionnel.

La question est de savoir si les cellules supportent une forte agitation du milieu de culture et jusqu'à quelles vitesses périphériques des turbines, vitesses dont dépendent en partie les forces de cisaillement, on peut monter sans endommager les cellules. En effet, le coefficient de transfert de l'oxygène moléculaire vers le milieu dépend, pour une température, un milieu de culture et des dimensions données du fermenteur, du débit d'air (aération) et de la vitesse d'agitation.

Dans le cas de notre modèle de fermenteur utilisé, le mobile d'agitation est à débit radial : bien adapté à l'agitation des fluides peu visqueux, l'action de cisaillement de ce type de turbine facilite le transfert d'oxygène ; par contre il ne convient pas à des cultures de microorganismes particulièrement fragiles ; or nous savons que les cellules de protozoaires sont plus fragiles que les bactéries, ce qui pourrait expliquer les résultats peu satisfaisants obtenus avec des agitations de 400 ou 500 tours.min⁻¹.

Ces observations nous ont permis de mettre en évidence l'importance de l'aération pour une culture exigeant l'aérobiose, l'agitation ne constituant qu'un facteur d'amélioration de la quantité de biomasse maximale.

Les différentes études réalisées précédemment nous ont montré l'importance :

- du choix du milieu en fonction du type d'activité enzymatique recherchée, en l'occurrence le milieu MYE pour l'activité protéasique ;
- du maintien du pH initial de 6,8 pour une phase stationnaire plus longue ;
- de la définition d'un couple optimal agitation/aération de 300 tours.min⁻¹ et 1,5 vvm favorisant l'obtention de critères de croissance satisfaisants. Ces valeurs sont relativement proches de celles appliquées jusqu'alors, à savoir 300 tours.min⁻¹ et 1,0 vvm.

Par ailleurs nos études ont permis de montrer qu'il était possible d'allier qualité de milieu, faible coût et simplicité de préparation de celui-ci.

Les conditions d'amélioration d'une fermentation en batch étant définies, il restait à les appliquer à un procédé en continu avec couplage à une unité de microfiltration, dans le but de produire une plus grande quantité de biomasse et de stabiliser la production enzymatique. Ce procédé a fait l'objet de la troisième partie de notre travail.

III.4. CULTURE EN CONTINU AVEC COUPLAGE A UNE UNITE DE MICROFILTRATION

Les méthodes générales de culture en continu consistent à l'heure actuelle à utiliser :

- soit des techniques classique de type chemostat
- soit des fermentation en batch répétée
- soit des techniques d'immobilisation
- soit des fermenteurs perfusés
- soit enfin le recyclage des cellules impliquant l'utilisation de modules de microfiltration comme ceux à fibres creuses, la centrifugation ou des souches floculantes de microorganismes.

Nous avons choisi ici de nous intéresser au recyclage des cellules en continu par microfiltration, technique la moins agressive pour *Tetrahymena*, non encore testée au demeurant sur notre souche BIII à la différence de la centrifugation.

Une boucle de microfiltration a donc été couplée à un fermenteur dans le double but :

- de produire le maximum de cellules en les faisant recirculer dans la membrane d'une part, et ce à volume constant ;
- en récupérant le filtrat (surnageant de culture), d'envisager la production en continu d'activité protéasique d'autre part.

L'expérimentation a été menée en utilisant le milieu de culture MYE ; la résistance de *Tetrahymena* au passage dans la boucle de microfiltration située à l'extérieur du fermenteur a été testée lors de nos essais précédents visant à la récupération du système cellulaire. Ces essais ont montré un taux de destruction cellulaire de 30%, taux certes élevé mais restant acceptable dans l'optique d'une fermentation en continu, et qui en outre peut être diminué en modérant la pression de microfiltration. L'ensemble du dispositif est présenté figure 29 (page 128).

Le but de la culture en continu avec microfiltration était de maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance en apportant du milieu frais et en soutirant en continu le milieu dans lequel peuvent s'accumuler des toxines ou des produits inhibiteurs de la croissance, mais également des enzymes ou des métabolites qui seraient donc produits en continu.

La culture en continu a été lancée dès le début de la fermentation. En principe, la totalité des cellules retourne dans le fermenteur, il n'y a donc pas de soutirage de biomasse au cours de la culture en continu si ce n'est la perte par lyse des cellules en cours de microfiltration.

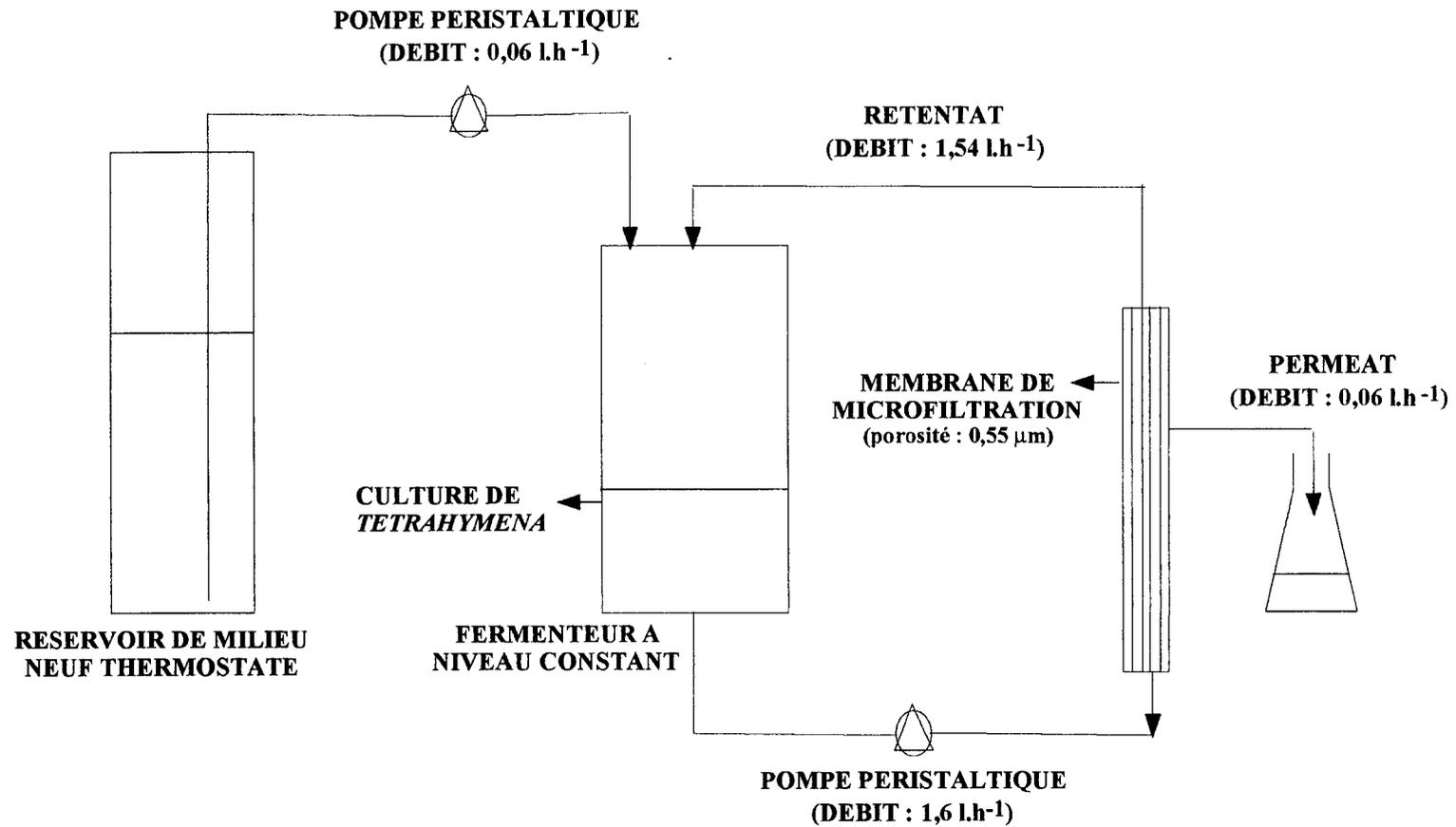


Figure 29 : Représentation schématique d'une culture en continu avec une membrane de microfiltration de *T. thermophila*

III.4.1. Cinétique de croissance cellulaire

La population finale après 123h de culture est de $1,15 \cdot 10^7$ cellules/ml, mais elle a atteint $1,24 \cdot 10^7$ cellules/ml après 52 heures de culture (figure 30a, page 130) ; ce résultat est d'autant plus satisfaisant que nous travaillons avec un dispositif relativement simple. Nous n'avons pu mesurer précisément le temps de génération mais nous pouvons l'estimer aux environs de 110 min. sur les quatre premiers points de mesure.

III.4.2. Cinétique de détection de l'activité hexokinasiq ue et des protéines

L'activité hexokinasiq ue totale (figure 30b, page 130) se révèle être un bon marqueur de l'état de la biomasse au sein du fermenteur, quoiqu'il se produise probablement une consommation de l'enzyme par les protéases lorsque celles ci apparaissent dans le milieu de culture. L'activité hexokinasiq ue dans le perméat est inexistante, preuve que la lyse occasionnée par le passage des cellules dans la boucle de microfiltration est faible. La concentration en protéines (figure 30b) baisse en phase exponentielle, puis se stabilise.

III.4.3. Cinétique de détection d'activité protéasiq ue

Lors des fermentations en batch, nous n'avions observé qu'une faible excréti on protéasiq ue dans le milieu en phase exponentielle, ce qui n'est pas le cas ici. La faible lyse dans le surnageant (figure 30a) témoigne d'une activité excrétoire élevée avec ce système.

Cette lyse explique aussi probablement l'augmentation plus rapide de l'activité dans le perméat par rapport au surnageant de culture. Rappelons que le perméat est le produit exempt de cellules obtenu par microfiltration, soit l'équivalent du surnageant de centrifugation. On note dans les deux cas une stabilisation de cette activité parallèlement à l'arrivée en phase plateau de la biomasse, ce qui témoigne d'une absence de lyse au sein du fermenteur, assurée par ailleurs grâce à une régulation du pH.

Ce profil d'appariti on et de stabilisation de l'activité protéasiq ue est tout à fait intéressant dans l'optique d'une production industrielle car elle permet de s'affranchir d'une étape d'extraction cellulaire.

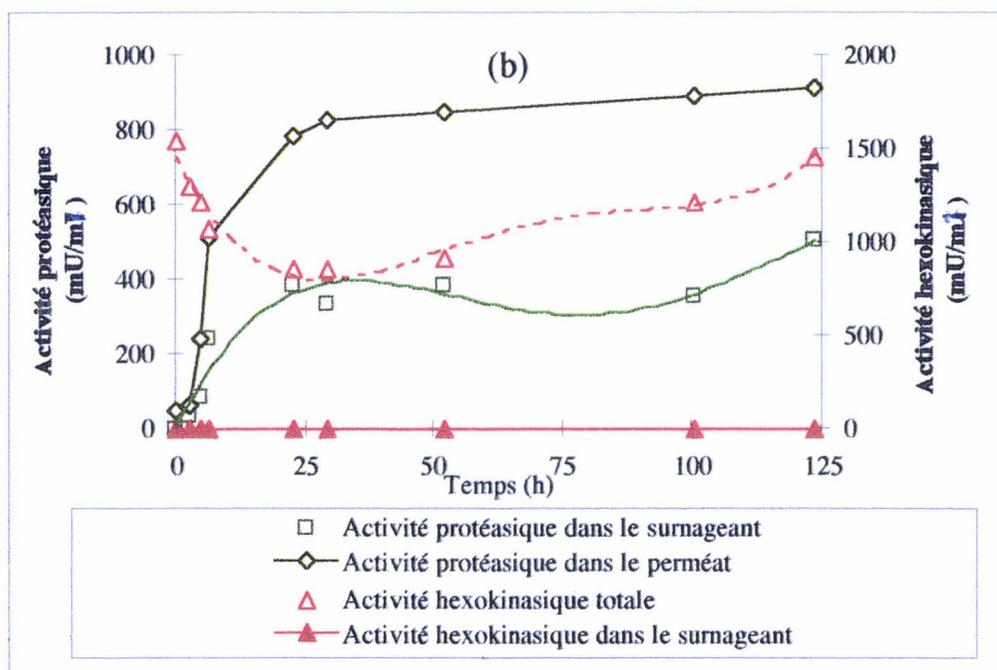
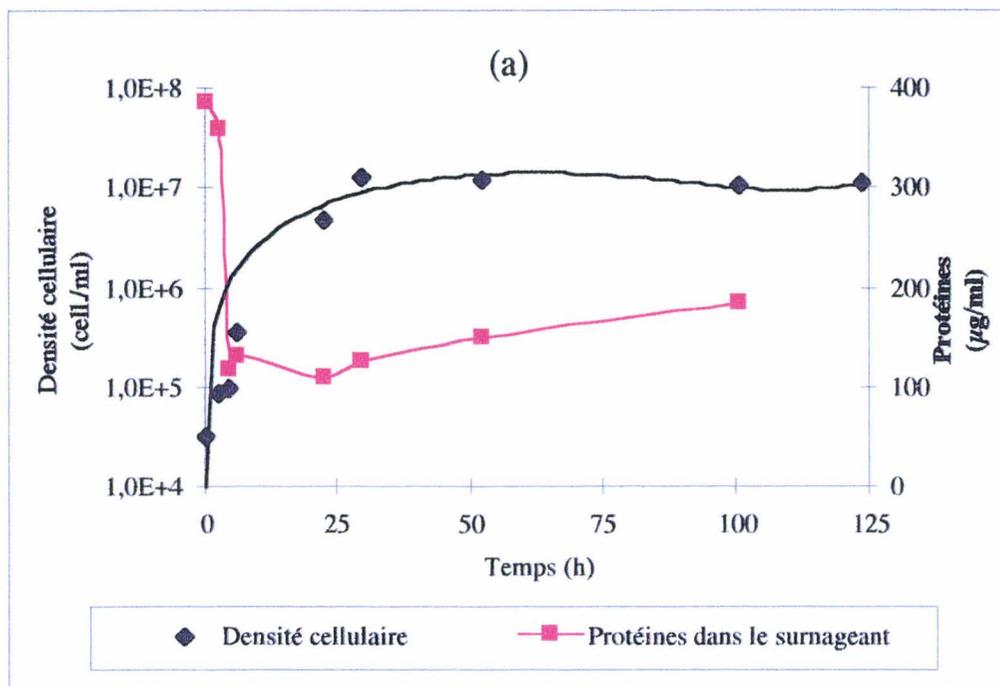


Figure 30 : Culture en continu de *T. thermophila* avec membrane de microfiltration. Suivi de la croissance cellulaire et de l'évolution des protéines (a), des activités hexokinases et protéasiques (b)

Fermenteur de 2 litres - Milieu MYE

III.4.4. Discussion

Ces résultats sont satisfaisants tant sur le plan de la production de biomasse que sur celui de la production enzymatique, sachant que dans le premier cas, une amélioration de la densité cellulaire est envisageable par un meilleur réglage du module de microfiltration permettant une lyse moins importante des cellules. En effet, si dans le cas de cultures bactériennes, le principal écueil lié à la microfiltration est le colmatage des pores de la membrane par de petits fragments de membranes et des précipités du milieu de culture (Santos *et al.*, 1992), dans notre cas cet écueil est évité par la relative fragilité des cellules, d'une part et par la porosité de la membrane, plus importante que pour une microfiltration bactérienne (0,55 μm contre 0,1 μm)(Santos *et al.*,

Toutefois nous parvenons à des résultats satisfaisants avec un dispositif simple, si nous les comparons à ceux de Kiy et Tiedtke, soit à immobiliser les cellules de *Tetrahymena* dans des billes d'alginate (1991), soit à perfuser un module de fermentation spécialement conçu à cet effet (1992). Les populations maximales obtenues par ces deux procédés sont respectivement de 9.10^6 et $2.2.10^7$ cellules/ml.

Le matériel requis pour chacun de ces procédés, plus complexe, peut constituer un obstacle économique à une mise en œuvre à plus grande échelle.

Schiloach *et al.* (1985), utilisant un dispositif comparable au nôtre mais sur des volumes de culture de 100 à 300 L (tableau 4, page 42), obtiennent des résultats nettement moins performants que ceux obtenus lors de nos essais, ce qui peut s'expliquer par la nature du milieu (CDM) d'une part, et part le volume de culture 10 fois plus important, d'autre part.

La fermentation microbienne à des densités cellulaires importantes représente depuis quelques dizaines d'années déjà un moyen efficace d'améliorer la productivité de métabolites d'intérêt industriel. Des études menées sur ce procédé mais concernant des culture bactériennes ont déjà donné elles aussi des résultats prometteurs. Groot *et al.* (1993), ont montré que la production d'éthanol en continu avec couplage à un dispositif de microfiltration permettait un coût de production plus faible qu'une culture en continu conventionnelle grâce à l'augmentation de la productivité en éthanol. Dans la même optique de production d'éthanol, Domakyaara et Ishizaki (1997) ont utilisé deux fermenteurs en série, le second étant couplé à un module de microfiltration tangentielle à fibres creuses, lui-même relié au premier fermenteur.

Enfin, plus proches de nos préoccupations en termes de métabolites, Santos *et al.* (1992) combinent dans un même dispositif, en série, le fermenteur, la boucle de microfiltration puis la boucle d'ultrafiltration (10 kDa) pour récupérer des protéases alcalines produites lors de la culture de *Bacillus* sp. Leur étude des matériaux dans lesquels sont fabriquées les membranes montrent l'importance de ceux-ci pour limiter le colmatage et améliorer les

vitesse de microfiltration et d'ultrafiltration. Les membranes en polysulfone, comme celle que nous utilisons se révèlent être les plus performantes, notamment comparées moins hydrophiles.

L'étape suivante de notre travail sur la culture en continu de *Tetrahymena* pourrait consister dans ce double couplage de la microfiltration et de l'ultrafiltration.

Le tableau 13 résume les performances comparées des procédés en batch et en continu que nous avons utilisés. Il apparaît ainsi plus nettement la population maximale la plus élevée, obtenue sur une durée plus longue, permet une production d'activité protéasique aussi importante qu'en batch.

Tableau 13 : Evaluation des performances des différents procédés pour la production en masse de *Tetrahymena*

PROCÉDÉ	BATCH	CONTINU
Durée du processus (h)	24	120
Milieu consommé (L)	1,5	192
Quantité de biomasse produite sur milieu MYE (mU/mL)	$3,30 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^7$
Quantité d'activité protéasique sur milieu MYE en fin de culture (mU/mL)	986	915

Pour terminer cette étude, nous avons réalisé une évaluation économique des différents procédés expérimentés. Les dispositifs de régulation de pH font partie du module de régulation. Le tableau 14a (page 133) présente une estimation du prix de revient de 1L de milieu de culture MYE. On trouvera en annexe C les estimations comparées des prix des différents milieux de cultures utilisés dans performances obtenues avec les différents procédés.

Le tableau 14b (page 133) fournit une estimation du coût en matériel du procédé que nous avons utilisé.

Tableau 14a : Evaluation des coûts de milieu pour la production de 1L de culture de *Tetrahymena thermophila* en fermenteur de 2 L

	Quantité	Prix/unité	Coût total (F HT)
Eau permutée	1L	0,73 F/L	0,73
Extrait de levure	10 g	350 F/KG	3,5
Lait écrémé	10 g	32 F/KG	0,32
			4,55

Tableau 14b : Evaluation du coût des équipements nécessaires pour la production en masse de *Tetrahymena thermophila* et la récupération de métabolites, avec un amortissement sur 5 ans (montants en Francs Hors Taxe).

MATERIEL	PRIX
Fermenteur 2L complet	20 000
Module micro & ultrafiltration	10 840
Cartouche de microfiltration	300
Cartouche d'ultrafiltration (récupération de métabolites)	300
COÛT TOTAL	31 440

Tableau 15 : Bilan du traitement de cellules de *Tetrahymena thermophila* par l'homogénéiseur de Potter.

L'extrait cellulaire a été obtenu par microfiltration d'une culture de fermenteur sur membrane à fibres creuses 0,55µm. Le volume de culture traité est de 2,5ml

L'activité protéasique à pH 4,5 observée sur l'extrait initial est une activité résiduelle car les activités issues de la lyse ont été éliminées par lavage des cellules. Essai réalisé précédemment à la mise en évidence d'un optimum à pH 9,0.

	Densité cellulaire (cell./mL)	Act. protéasique (mU/mL)	Act. libérée/cellule lysée (mU/10 ⁶ cellules)
Extrait initial	4,23.10 ⁶	19,2	
Extrait final	2,55.10 ³	312,7	69,42

Tableau 16 : Influence des cycles de congélation sur la lyse cellulaire et les activités protéasiques dans le surnageant

L'extrait cellulaire a été obtenu par microfiltration d'une culture de fermenteur sur membrane à fibres creuses 0,55µm. Le volume de culture traité est de 50 ml. L'activité protéasique observée sur l'extrait initial est une activité résiduelle car les activités issues de la lyse ont été éliminées par lavage des cellules.

Nombre de cycles	Densité cellulaire (cellules/mL)	% de la densité initiale	Activité protéasique		Activité protéasique libérée/ cellule lysée		Rapport des activités pH9,0/pH4,5
			mU/ mL		mU/ 10 ⁶ cellules		
			pH4,5	pH9,0	pH4,5	pH9,0	
Milieu initial	9,98.10 ⁶	100	18,9	16,7			0,88
1	1,32.10 ⁶	13,2	118,5	129,8	11,5	13,1	1,10
2	5,89.10 ⁵	5,9	225,7	253,3	22,0	25,2	1,12
3	2,70.10 ⁵	2,7	451,5	471,8	44,6	46,9	1,04
4	1,16.10 ⁵	1,2	859,2	888,4	85,2	88,4	1,03

IV / CARACTÉRISATION PARTIELLE DES ACTIVITÉS PROTÉASIQUES

Cette seconde étape vise à caractériser puis à essayer de purifier l'activité protéasique mise en évidence au cours des fermentations.

Lors de la première partie de notre travail, la réalisation de cinétiques de croissance cellulaire en parallèle avec celles de la production des activités protéasiques et glycosidasiques nous a permis d'observer que les activités protéolytiques apparaissent dans le milieu conjointement avec un début de lyse des cellules (figure 23, page 112). Le taux élevé de protéines observé en début de fermentation est dû ici à une quantité élevée de cellules lysées dans l'inoculum. Nous savons que durant la fermentation, les protéines sont le premier substrat consommé par *Tetrahymena* au moyen de ses enzymes (Tiedtke *et al.*, 1993). Ceci implique la présence de protéases extracellulaires, dont l'origine commune serait une protéase intracellulaire ayant subi un processus de fragmentation avant excrétion (Dickie et Liener (1962a, 1962b).

D'autre part, une étude préliminaire sur le surnageant de culture nous a permis de déterminer le pH optimal de l'activité protéolytique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence 2 optima de pH, l'un à pH 4,5, l'autre à pH 9,0.

L'hétérogénéité en termes de pH optimum de l'activité protéasique a motivé notre choix d'y consacrer la suite de nos travaux. Plusieurs protéases de *Tetrahymena* ont déjà été étudiées appartenant principalement aux catégories des protéases neutres (Straus *et al.*, 1992 ; Viswanatha et Liener, 1956 ; Dickie et Liener, 1962 ; Banno *et al.*, 1982) et acides (Banno *et al.*, 1983) ou les deux en même temps selon la nature du substrat (Levy *et al.*, 1976). Cette variation du pH optimum selon la nature du substrat, pose le problème de l'influence de l'ionisation de celui-ci sur l'activité de l'enzyme; il est possible en effet qu'une seule enzyme agisse sur le même substrat à deux pH différents selon la charge du substrat, mais surtout selon son état de déplissement. Il s'agissait pour nous de déterminer si ces deux activités protéasiques correspondaient à deux ou une seule et même entité moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer ou infirmer l'hypothèse de la localisation endocellulaire des activités protéasiques.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à l'obtention d'un matériel biologique de la meilleure qualité possible, c'est à dire exempt du maximum de protéines non enzymatiques, avec également en vue l'objectif de séparer par l'une ou l'autre de ces techniques les deux activités protéasiques.

La troisième partie de cette étude a consisté en une caractérisation partielle de ces activités protéasiques.

IV.1. LOCALISATION DES PROTÉASES

Un traitement sur des cellules d'une culture âgée de 24 heures par l'homogénéiseur de Potter (tableau 15, page 134) nous avait précédemment montré :

- d'une part que les cellules sont ainsi détruites à 99,94%.
- d'autre part une relation entre lyse des cellules et libération de l'activité protéasique, puisque celle-ci est multipliée par un facteur 16,3 dans le même temps.

Ce travail a été réalisé sur des cultures en flacons de 24 heures. Il faut garder à l'esprit que le Potter est avant tout un homogénéiseur, mais dans le cas des cellules eucaryotes, plus fragiles, cette faculté se transforme en broyage selon la résistance rencontrée.

Les essais suivants concernant la localisation des protéases ont été réalisés sur des cultures en flacons âgées aussi de 24 heures.

IV.1.1. Cycles de congélation/décongélation des cellules

Les résultats sont présentés dans le tableau 16 (page 134). Les densités cellulaires et activités protéasiques sont les valeurs cumulées au cours des cycles dans le surnageant. Il n'y a pas d'élimination de celui-ci entre chaque cycle. L'activité protéasique présente dans le milieu initial est déduite, provenant des cellules avant congélation.

L'augmentation de l'activité protéasique dans le surnageant suit la lyse cellulaire.

La lyse des cellules est de 87% après un cycle, 94% après deux cycles, 97% après trois cycles et 99% après 4 cycles. Autrement dit le premier cycle est le plus destructeur en termes quantitatifs.

Les activités protéasiques sont quant à elles multipliées par plus de 6 au cours du premier cycle, et par plus de 45 entre l'état initial et le quatrième cycle, leurs évolutions sont confondues, ce qui va de pair avec la constance du rapport de leurs activités, entre 0,9 et 1,0. Cette observation plaide en faveur d'une seule entité enzymatique.

Si l'augmentation des activités protéasiques aux deux pH se situe dans les mêmes proportions que la lyse cellulaire au cours des deux premiers cycles, ce n'est plus le cas après 3 puis 4 cycles de congélation : la multiplication des activités protéasiques est deux fois moindre que la lyse cellulaire par rapport au milieu initial.

On peut penser que la destruction des cellules n'entraîne pas forcément une lyse des vacuoles, ce qui se vérifie par l'observation microscopique des culots de centrifugation : celle-ci révèle la présence clairsemée de ces vacuoles (figure 31, page 137) au milieu de débris cellulaires. Nous aurions là l'explication du décalage entre le taux de destruction cellulaire et l'évolution de l'activité protéasique dans le surnageant.

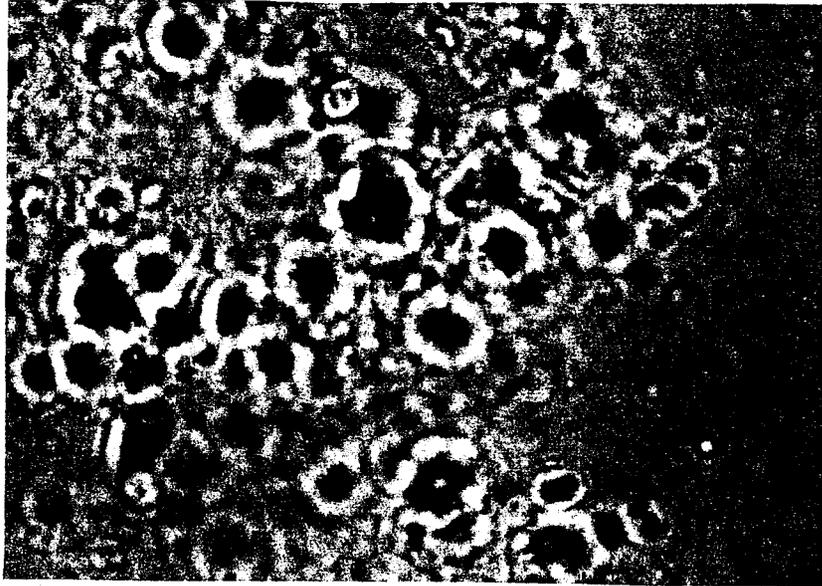


Figure 31 : Débris cellulaires de *T. thermophila* observés au microscope (x1000) après centrifugation. Les sphères sont des vacuoles libérées par la lyse. Etude réalisée sur une culture de 24 heures en fermenteur

IV.1.2. Traitement aux ultrasons

Au préalable de cette manipulation, une étude de l'influence de la durée et de l'intensité du traitement sur la densité cellulaire et sur l'activité enzymatique nous a permis de fixer une intensité et une durée de sonication standard : 100 watts (20 kHz) durant 10 secondes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 17 (page 138).

La faible densité cellulaire et la quantité initiale élevée d'activité protéasique observées ici par rapport à l'essai concernant la congélation s'explique par le fait que nous avons ici travaillé sur des cultures en flacons de 10 ml, sans concentration par microfiltration puis lavage des cellules. L'âge des cultures est de 24 h dans tous les cas. La sonication détruit 99,7% des cellules ; par contre on observe une libération proportionnellement faible des activités protéasiques, dans un rapport 1,4 à 1,6 pour les deux, ce qui laisse penser que la sonication dénature l'activité enzymatique. Cette hypothèse a été confirmée lors d'un essai de sonication sur un extrait enzymatique obtenu par chromatographie sur hydroxyapatite (figure 32, page 138). Lors du traitement appliqué dans les mêmes conditions que précédemment, on observe une perte d'activité de 60% aux deux pH. Cette perte n'augmente plus que d'environ 20% si le traitement est prolongé de 10 secondes, et de 3 % s'il est encore prolongé de la même durée ; tout se passe donc comme si seule l'intensité du premier contact avec les ultrasons comptait et non la durée de ce contact. Il faut toutefois garder à l'esprit la possibilité d'autodigestion des protéases qui pourrait être stimulée par les ultrasons (artefact).

Enfin, une étude plus poussée de la sonication sur des cultures d'âges différents (tableau 18, page 138) nous montre :

Tableau 17 : Influence d'un traitement par ultrasons sur la lyse cellulaire de *T. thermophila* et la libération d'activité protéasique.

Etude réalisée sur des cultures de cellules de 24h en flacons sur milieu MYE.

	Densité cellulaire (cell./ml)	% de la densité cellulaire	Activité protéasique (mU /ml)		Activité libérée/ cellule lysée (mU/10 ⁶ cellule)		Rapport des activités pH 9,0/pH 4,5
			pH 4,5	pH 9,0	pH 4,5	pH 9,0	
Culture non traitée	5,88.10 ⁵		132,30	152,18			1,15
Culture traitée	1,54.10 ³	0,26	207,40	205,43	128,06	90,80	0,99

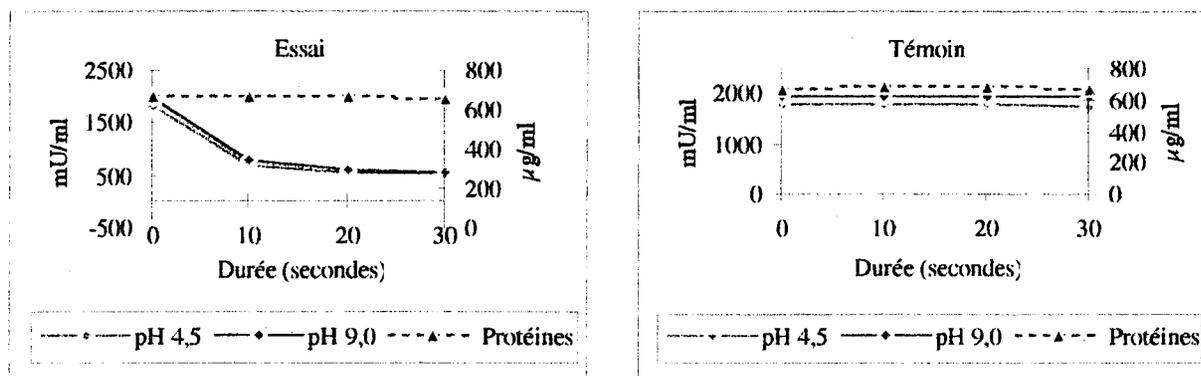


Figure 32 : Influence d'un traitement par ultrasons sur l'intensité des activités protéasiques de *T. thermophila*. Essai réalisé sur un extrait enzymatique obtenu après chromatographie sur hydroxyapatite, exposé aux ultrasons pendant des durées variables.

Tableau 18 : Influence de l'âge des cellules sur la libération des activités protéasiques par sonication.

Age de la culture (h)	Densité cellulaire (cell. /ml)		Pourcentage de lyse par sonication (%)	Activité protéasique libérée par cellule (mU/10 ⁶ cellules lysées)		Rapport des activités pH 9,0 /pH 4,5	
	Culture non traitée	Culture traitée		pH 4,5	pH 9,0	Culture non traitée	Culture traitée
24	5,88.10 ⁵	1,54.10 ³	99,74	128,0	90,8	1,15	0,99
48	5,76.10 ⁵	1,43.10 ³	99,75	416,0	388,1	0,96	0,94
96	9,78.10 ⁴	9,87.10 ²	98,99	2745,5	2426,6	0,97	0,91
120	6,59.10 ⁴	5,67.10 ²	99,14	3300,2	3101,8	0,91	0,93

- que si l'âge de la culture fait baisser la densité cellulaire, le taux de lyse par les ultrasons ne varie pas ;
- que la quantité d'activité protéasique libérée par cellule lysée augmente avec l'âge de la culture, ce qui laisse penser que des cellules âgées libèrent leurs enzymes plus facilement par suite d'une plus grande fragilité de leurs vacuoles. Toutefois il faut aussi considérer que des cellules âgées, n'étant donc plus en phase de division, ont un nombre de vacuoles plus important (Hill, 1972), donc une quantité d'enzymes lysosomales relarguées en phase de lyse elle aussi plus importante.
- que les rapports entre les deux activités restent constants et équilibrés, et cette stabilité est à mettre au crédit de l'hypothèse d'une seule entité enzymatique ; on note toutefois que ce rapport est ici en faveur de l'activité à pH 4,5.

IV.1.3. Discussion

Bien que les trois méthodes de lyse cellulaire n'aient pas été appliquées avec le même échantillon cellulaire, il apparaît que le traitement par ultrasons et la congélation produisent des résultats comparables en termes de rapport entre lyse et libération d'activité protéasique, l'effet destructeur des ultrasons sur l'activité protéasique étant compensé par une libération plus importante d'activité protéasique (tableau 19). L'origine endocellulaire de l'activité protéasique apparaît plus nettement en ramenant ainsi l'activité libérée au nombre de cellules lysées. Toutefois, la fragilité des vacuoles n'est pas tout à fait en accord avec les résultats obtenus pour les cycles de congélation/décongélation.

Des expériences plus poussées de localisation dans les organites subcellulaires restent à envisager.

Tableau 19: Comparaison des différentes méthodes de lyse cellulaire de *T. thermophila*

Méthode de lyse	Activité libérée/ cellule lysée (mU/ 10 ⁶ cellules)	
	pH 4,5	pH 9,0
Homogénéiseur de Potter	69,42	ND
Cycles de congélation (4)	85,2	88,4
Ultrasons (culture de 24h)	128,06	90,8

Tableau 20: Précipitation des protéines d'un surnageant d'une culture en fermenteur avant lyse cellulaire (24h) de *Tetrahymena thermophila* par du sulfate d'ammonium

50 ml de surnageant de culture, contenant

26,8mg de protéines
6,5 U d'activité à pH 4,5
8,8U d'activité à pH 9,0

ont été utilisés pour cette manipulation.

Taux de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	RÉPARTITION (% de la		LE CULOT (initiale)		Rapport des activités spécifiques pH 9,0/pH 4,5
	Protéines	DANS quantité Activité pH 4,5	protéasique pH 9,0		
40	14,1	9,6	11,0	1,15	
45	18,6	10,9	11,6	1,03	
50	24,4	11,8	14,6	1,24	
55	36,1	22,6	31,0	1,37	
60	51,4	34,8	57,4	1,65	
65	68,2	50,9	66,5	1,31	
70	70,8	56,9	70,5	1,24	
75	75,4	72,1	82,3	1,14	
80	78,6	77,5	84,9	1,10	
85	84,0	79,8	87,4	1,10	
90	86,6	84,5	93,8	1,11	
95	82,7	88,1	95,7	1,09	
100	92,3	97,5	98,6	1,01	

IV.2. PURIFICATION PARTIELLE

IV.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Ces essais ont eu pour but, outre de concentrer les protéines, d'initier une séparation éventuelle des activités protéasiques par précipitation sélective en présence d'une variation de force ionique. Le suivi de l'évolution du rapport des deux activités constitue un bon témoin de leur dissociation ou non.

A l'observation des résultats (tableau 20) on voit que les activités protéasiques à pH 4,5 et pH 9,0 sont toutes deux majoritaires dans le surnageant jusque 65% de sulfate d'ammonium. Les deux activités présentent le même comportement vis-à-vis de l'agent précipitant. La précipitation, qui n'intervient que pour des concentrations élevées en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, indique que les molécules possèdent une masse moléculaire relativement faible.

Les rapports entre les deux activités spécifiques montrent une prédominance générale de l'activité à pH 9,0, avec une moyenne de 1,20 au bénéfice de celle-ci. Les fluctuations sont probablement dûes à l'incertitude liée à la nature du substrat utilisé pour la détermination de l'activité protéolytique, à savoir l'hémoglobine. L'insolubilisation des protéines suit celle des activités protéasiques et il est possible d'expliquer la presque absence de différenciation entre les deux optima par le fait qu'il y ait co-précipitation des protéines, peu concentrées par ailleurs. Il convient de préciser que nous travaillons ici sur un surnageant de culture non lysée, mais néanmoins sur des activités protéolytiques pour une part excrétées pendant la croissance, et pour une autre part libérées par lyse cellulaire en début de phase stationnaire.

Il serait intéressant de réitérer cette expérience sur un extrait cellulaire traité par ultrasons. Cette méthode ne nous a pas donné de résultats satisfaisants ; une ultrafiltration avec un seuil de coupure de 10 kDa reste préférable pour concentrer l'activité protéolytique.

IV.2.2. Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite

Le profil d'élution est représenté par la figure 33 (page 142) et les résultats de cette étape sont résumés dans le tableau 21 (page 142).

Cette chromatographie nous permet d'obtenir une fraction enrichie en protéases, appelée ici HA150 ; elle est éluée avec le tampon phosphate de sodium 150mM et renferme les deux activités protéasiques, le facteur de purification est de 3,5 (pH 4,5) et 3,1 (pH 9,0). Toutefois, on trouve également une fraction non négligeable d'activité dans la fraction éluée à la concentration de 250 mM. Le rendement global de la chromatographie est de 97,8% pour l'activité à pH 4,5 et de 89,9% pour l'activité à pH 9,0 par rapport à l'activité protéolytique initiale.

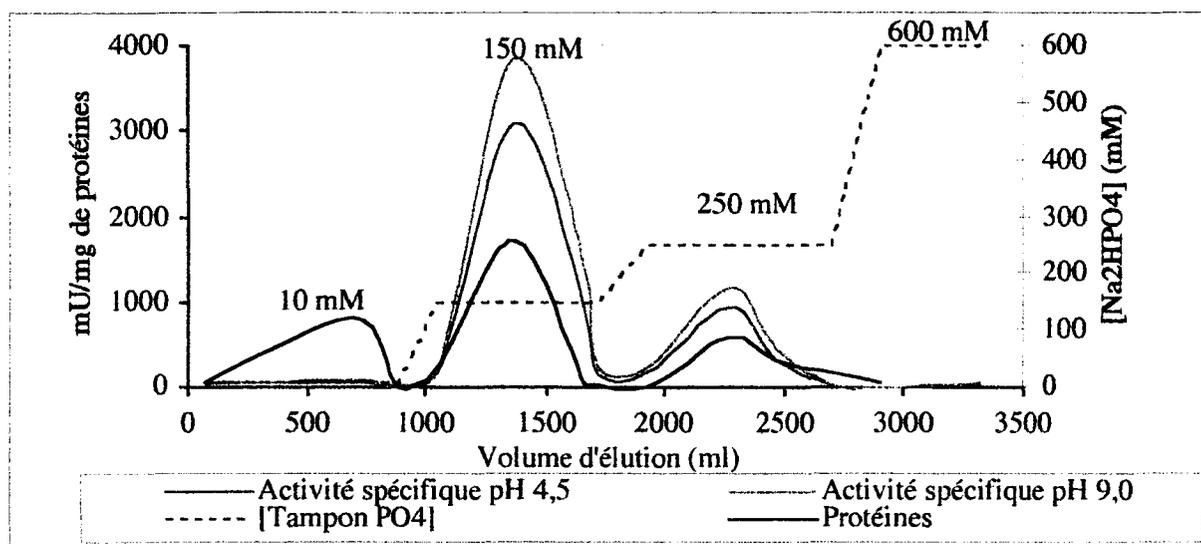


Figure 34 : Profil d'élution sur colonne d'hydroxyapatite .

95 ml de surnageant de culture concentré contenant 0,9U/mg à pH 4,5 et 1,2U/mg à pH 9,0 ont été déposés sur une colonne (45mm x 160mm) ULTROGEL® dans les conditions suivantes : Vitesse papier 0,2 mm/min. ; Débit élution 0,5 ml/min ; fractions de 10 ml ; rinçage par du tampon phosphate pH 6,8 10 mM ; élution par du tampon phosphate de sodium pH 6,8 150 mM (activité spécifique la plus intéressante) puis 600mM

Tableau 21: Bilan de chromatographie sur hydroxyapatite

	Surnageant concentré	HA 150	HA250	Rendement global (%)
Protéines (mg)	337,3	82,2	30,1	97,8
Activité protéasique (U) pH 4,5	303,7	255,4	27,7	97,8
pH 9,0	418,1	316,4	35,5	89,9
Rapport des activités pH 9,0/pH 4,5	1,38	1,24	1,28	
Activité spécifique (U/mg) pH 4,5	0,90	3,11	0,92	
pH 9,0	1,24	3,85	1,18	
FP protéase pH 4,5	1,00	3,46	1,02	
pH 9,0	1,00	3,10	0,95	

HA150 fraction éluee en tampon phosphate 150mM

HA250 fraction éluee en tampon phosphate 250mM

FP protéase facteur de purification

On note que le facteur de purification pour l'activité à pH 4,5 est légèrement supérieur à celui de l'activité à pH 9,0. De façon générale, ce facteur n'excède pas 3,5, ce qui montre que l'on récupère encore beaucoup de protéines en même temps que les activités. Le rapport des deux activités (pH 9,0/pH 4,5) est assez stable, de l'ordre de 1,3 en faveur de l'activité à pH 9,0, valeur comparable à celle observée lors des essais de précipitation par le sulfate d'ammonium (1,23). Comme lors de ces derniers, on peut émettre quelques réserves sur la précision du dosage de l'activité protéolytique avec l'hémoglobine, eut égard à la complexité de ce substrat. On peut penser que le choix d'un substrat plus simple comme la sérum albumine bovine, ou d'un substrat synthétique, donnerait un rapport plus stable entre les deux activités. Cette manipulation nous a permis d'obtenir une solution enzymatique à activité spécifique sensiblement plus élevée, mais sans séparation des deux activités. Cette observation est en faveur de l'existence d'une seule et même entité moléculaire. Les différentes fractions HA150 ont été réunies, concentrées sur membrane Amicon 5000 Da et utilisées pour les essais de séparation ultérieurs ainsi que pour la caractérisation des activités

IV.2.3. Gel filtration

Un échantillon de la fraction HA150 obtenue précédemment sur colonne d'hydroxyapatite a été utilisé pour cette manipulation. Le rendement global était de 98,3% en protéines, et pour les activités protéasiques de 80,8% à pH 4,5 et 85% à pH 9,0. Au vu du profil d'éluion obtenu, présenté figure 34 (page 144), il semblerait qu'il y ait eu séparation de l'ensemble des protéines contenues dans la fraction 150 en deux fractions, dont l'une contient les deux activités protéasiques, avec un facteur de purification de 2,5 pour l'activité à pH 4,5 et 2,9 pour celle à pH 9,0. Il serait sans doute possible d'affiner cette séparation en réduisant l'amplitude de la zone d'exclusion.

L'écart entre le rendement global en protéines et le rendement des activités protéasiques est à mettre en relation avec le problème de la stabilité du système enzymatique.

IV.3. CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS PROTÉASIQUES

Viswanata et Liener (1956) ont décrit une seule protéase extra-cellulaire ayant un pH optimum de 7,0 sur hémoglobine traitée par l'urée 3M et de 4,0 sur carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine, substrat synthétique. Dickie et Liener (1962) ont isolé deux protéases intracellulaires différentes ayant un pH optimum neutre, et une protéase acide intracellulaire ayant un pH optimum de 5,5 sur hémoglobine traitée par l'urée 3M. Müller (1972) a observé la libération d'une protéase acide ayant un pH optimum de 3,3 sur l'hémoglobine. Levy *et al.* (1976) ont isolé plusieurs isoformes d'une protéase intracellulaire ayant un pH optimum

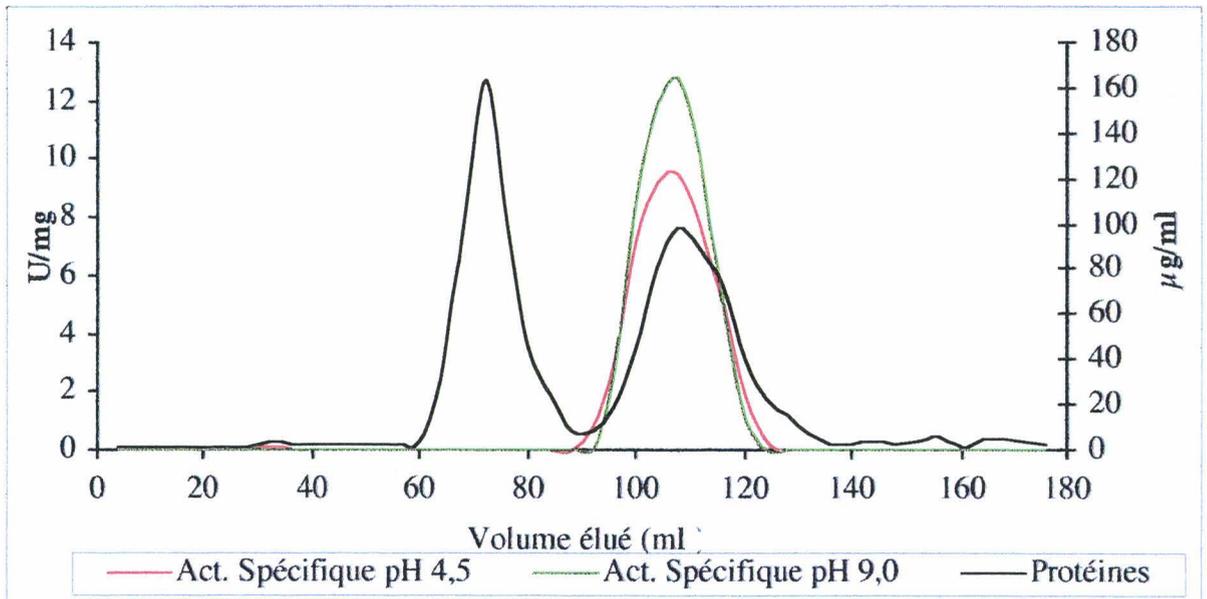


Figure 34 : Gel filtration réalisée avec la fraction 150 sur colonne SEPHACRYL® HR100 (1,6*90 cm), équilibrée en tampon phosphate de sodium 50mM NaCl 0,5M pH6,8 sous un débit de 20 ml/heure. La zone de linéarité chromatographique de la colonne est comprise entre 10 et 100 kDa. Le rendement global en protéines était de 98,3%, et, pour l'activité protéasique, de 80,8% à pH 4,5 et 84,9% à pH 9,0.

neutre envers un substrat synthétique et l'azocaséine, et un pH optimum de 3,3 sur hémoglobine traitée par l'urée 3M. Ces résultats sont-ils en lien avec l'état d'ionisation du substrat ?

Partant de ces observations, nous avons ici essayé de répondre à la question suivante : Y-a-t-il deux entités enzymatiques différentes ou une seule structure? La solution enzymatique utilisée est la fraction HA150, obtenue par chromatographie sur hydroxyapatite. Le substrat de référence utilisé est toujours l'hémoglobine ; toutefois, la mise en évidence avec ce substrat de deux pH optimaux nous a conduit à effectuer une comparaison avec d'autres substrats naturels ou synthétique afin de mieux comprendre l'origine de ce double optimum, et savoir notamment s'il était dû au substrat ou à l'activité enzymatique elle même.

Concernant les études relatives à la stabilité au pH ou au pH optimum, elles ont nécessité l'emploi de solutions tampon citrate/phosphate/borate balayant une large gamme de pH. Nous avons donc vérifié au préalable que leur emploi ne modifiait pas significativement le comportement des activités protéasiques.

IV.3.1. Propriétés enzymatiques

IV.3.1.1. pH optimal

Les pH optimaux ont été déterminés selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel & Méthodes en utilisant pour les différents substrats retenus pour cette étude le système tampon citrate/phosphate/borate couvrant une zone de pH de 2,0 à 12,0. Différents substrats naturels et synthétiques ont été testés, les substrats naturels étant choisis soit pour leur taux d'hydrolyse important (sérum albumine bovine, globine), soit pour leur pHi extrême (lysozyme), soit pour leur action à un pH extrême (1,1 pour la pepsine). Les résultats nous ont permis de vérifier que les rapports d'hydrolyse obtenus avec les systèmes tampons acétate (pH 4,5) et Tris/HCl (pH 9,0) se retrouvent avec le système tampon citrate/phosphate/borate, bien que les activités, en valeur absolue, obtenues avec ce dernier soient inférieures.

Les courbes d'activité relative sont présentées sur les figures 35 (substrats naturels) et 36 (substrats synthétiques), page 146.

IV.3.1.1.1. Sur hémoglobine

L'existence de deux optima d'activité mise en évidence sur les surnageants de culture est ici confirmée ; il s'agit des pH 4,5 et 9,0, que le substrat soit natif ou dénaturé. On note toutefois que sur le substrat natif, l'optimum de pH est plus marqué à pH 4,5 qu'à pH 9,0 (100% contre 60%).

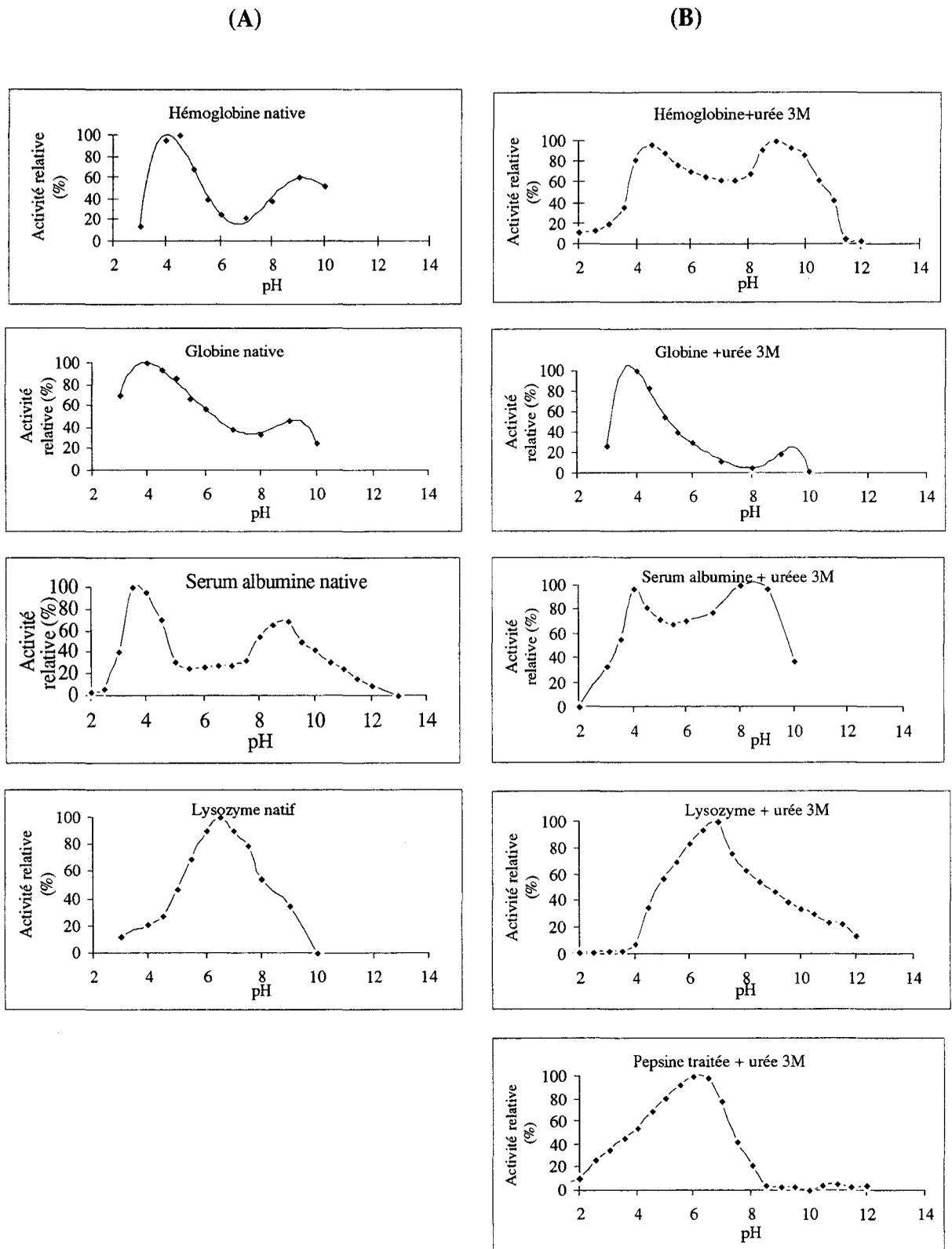


Figure 35 : Détermination du pH optimum de l'activité protéasique de *T. thermophila* BIII sur hémoglobine (a), globine (b), sérum albumine bovine (c), lysozyme (d), et pepsine (e)

Les substrats sont natifs (A) ou additionnés d'urée 3M (B) - Essais réalisés en double, en système tampon citrate/phosphate/borate

D'après le pHi de l'hémoglobine cité dans la littérature (pHi=8,19) il faut envisager le fait que ce double optimum soit dû à un changement de conformation du substrat ou un déplissement. La question s'est donc posée de savoir si nous aurions la même allure de courbe avec un autre substrat. En effet, les variations d'activité en fonction du pH peuvent informer davantage sur la capacité du substrat à être hydrolysé que sur la capacité de l'enzyme à hydrolyser ce substrat. Au cours des étapes suivantes de caractérisation, nous avons systématiquement travaillé en parallèle avec les deux pH 4,5 et 9,0.

IV.3.1.1.2. Autres substrats

Pour la globine, on retrouve le même optimum à pH 9,0 que pour l'hémoglobine, mais l'autre optimum est déplacé vers 4,0 au lieu de 4,5 avec là aussi une prédominance de l'activité à pH 4,5 (100% contre 20% sur substrat natif, 100% contre 46% sur substrat dénaturé). On peut poser l'éventualité d'un phénomène d'oxydation de l'hème lors de la réaction enzymatique qui influencerait sur le comportement du substrat.

Les deux optima se déplacent légèrement pour la sérum albumine bovine, pour laquelle on a des optima aux pH 3,5 et pH 9,0 sur substrat natif, pH 3,5 et pH 8,0 sur substrat dénaturé.

Avec ces deux substrats, nous avons toujours deux optima de pH, ce qui n'est plus le cas pour le lysozyme et la pepsine : nous n'observons plus qu'un seul optimum, respectivement de 6,5 à 7,0 pour le lysozyme, et de 6,0 pour la pepsine.

Les substrats synthétiques donnent des résultats variables quoique restant dans une plage de pH assez réduite :

- le N-benzoyl-arginine-para-nitroaniline (BAPNA) nous donne deux pics dont on peut se demander s'il ne s'agit pas d'un artefact : pH 6,5 et 7,5 (figure 36, page 148)
- le Pyr-PHE-LEU-para-nitroaniline ne présente qu'un seul pic à pH 5,0

IV.3.1.1.3. Conclusion

Nous nous trouvons dans une plage de pH optimum allant de 3,5 à 9,0 selon les substrats. Ces résultats plaident en faveur d'une action du pH sur la conformation du substrat, avec un comportement particulier pour la pepsine et le lysozyme pour lesquels on n'observe qu'un seul optimum. Il n'est pas possible de relier la présence d'un ou deux optima à la masse moléculaire ou aux pHi de ces substrats. Par contre l'existence de deux optima sur les substrats synthétiques permet de penser que le pH influe également sur le comportement de l'enzyme et plus particulièrement en zone acide (aux environs de 6,5 –7,0).

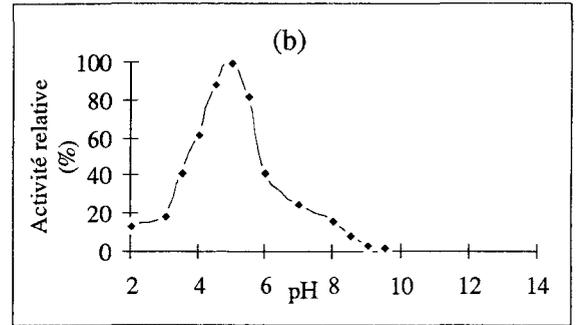
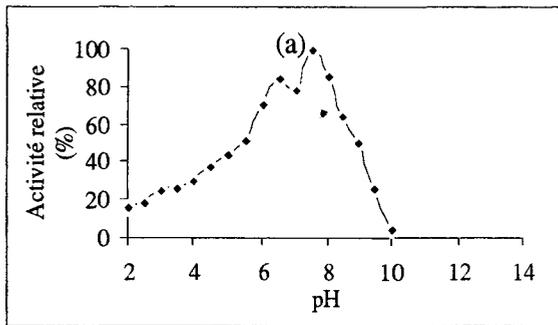


Figure 36: Détermination du pH optimum de l'activité protéasique de *T. thermophila* BIII sur BAPNA (a) et pyr-PHE-LEU-Na (b)

Essais réalisés en double, en système tampon citrate/phosphate/borate

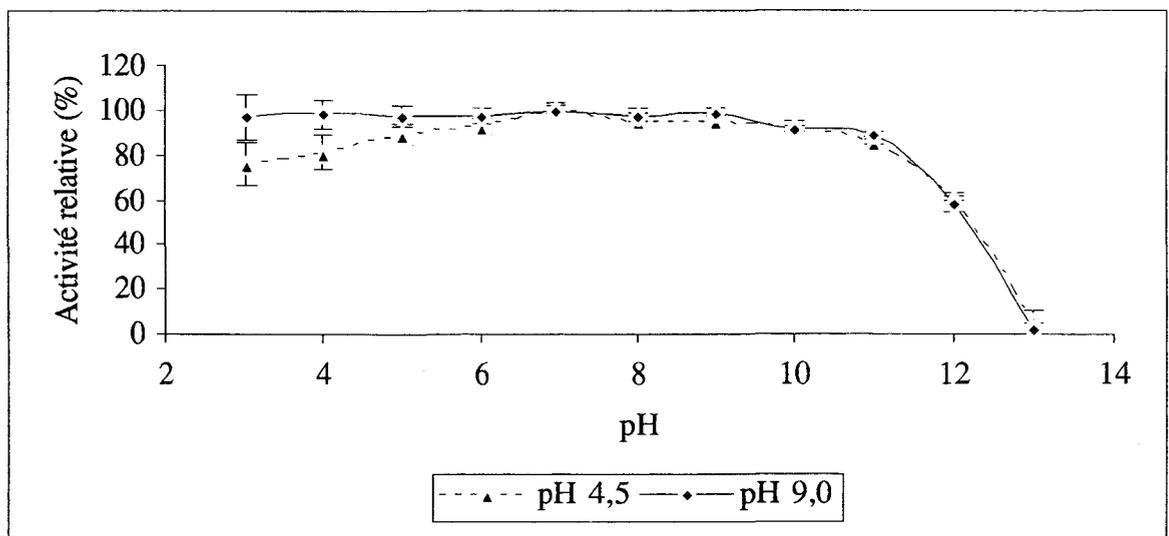


Figure 37 : Stabilité des activités protéasiques de *T. thermophila* en fonction du pH.

La fraction pré-purifiée "HA150" est préincubée 2 heures à 37°C dans des tampons citrate/phosphate/borate.

Essais réalisés en triple.

Les études déjà réalisées sur des protéases intra-cellulaires et extra-cellulaires de *Tetrahymena* ont montré certaines variations du pH optimum : Banno *et al.* (1983) ont testé le pH optimum d'une protéase extracellulaire sur plusieurs substrats, synthétique et naturels. Le pH optimum est neutre sur substrat synthétique, ce qui recoupe notre résultat sur BAPNA ; il est de 8,0 sur azocaséine et sensiblement plus bas sur hémoglobine (4,5 sur verdohémoglobine et 5,5 sur hémoglobine acide, préparée à pH 2,0 ou traitée par l'urée 3M). Comme Murakami *et al.* (1979) ont montré que la verdohémoglobine constituait un substrat adapté à toutes les valeurs de pH pour les enzymes protéolytiques, Banno *et al.* (1983) en déduisent que les variations de pH optimum sont dues à des modifications conformationnelles des substrats et non à la présence d'une seconde protéase.

IV.3.1.2. Stabilité au pH du système enzymatique

La détermination de la stabilité au pH a été menée à 37 °C pendant 2 heures. Les résultats exprimés en activité relative sont présentés sur la figure 37.

Le comportement des deux activités est comparable si l'on prend en compte les écart-types. De façon générale, il est intéressant de constater la grande stabilité des deux activités en milieu acide, et la perte de stabilité pour ces deux activités simultanément, correspondant à un traitement par l'urée 3M du système enzymatique.

IV.3.1.3. Température optimale

Les activités ont été mesurées avec l'hémoglobine traitée par l'urée 3M comme substrat dans les conditions optimales de pH soit 4,5 et 9,0 et à des températures variables.

Les courbes d'activité sont présentées sur la figure 38 (page 150).

Les températures optimales aux deux pH ne varient que de 5°C ; elles sont respectivement à pH 4,5 et 9,0 de 55°C et 60°C, avec toutefois des écart-types permettant de confondre ces deux valeurs. Elles sont en accord avec la température choisie au début de notre travail (55°C, déterminée par Ethuin (1993)), et que nous conserverons par la suite dans un souci de concordance des résultats. Dans la littérature, les essais d'activité protéasique sont tous réalisés à 37°C mais nous n'avons pas relevé d'étude de température optimale.

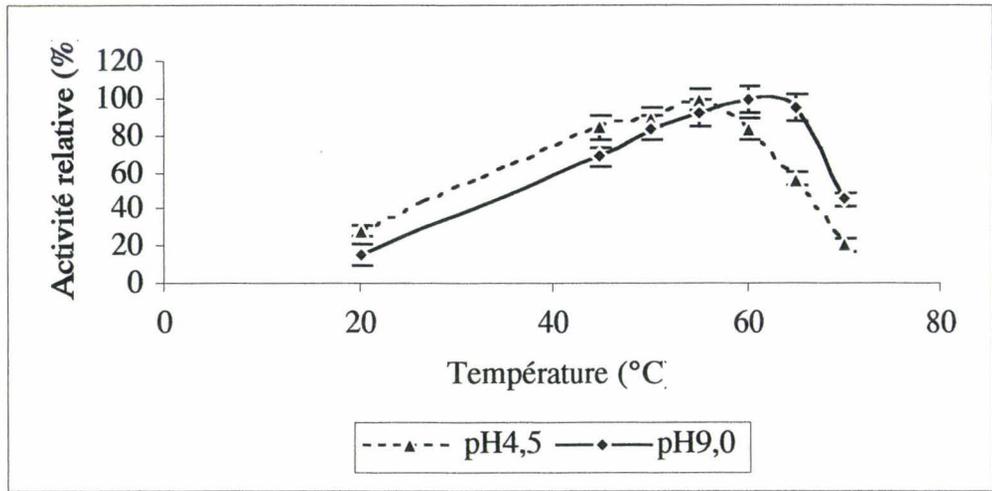


Figure 38. : Détermination de la température optimale des activités protéasiques sur hémoglobine dénaturée. Essais réalisés en triple

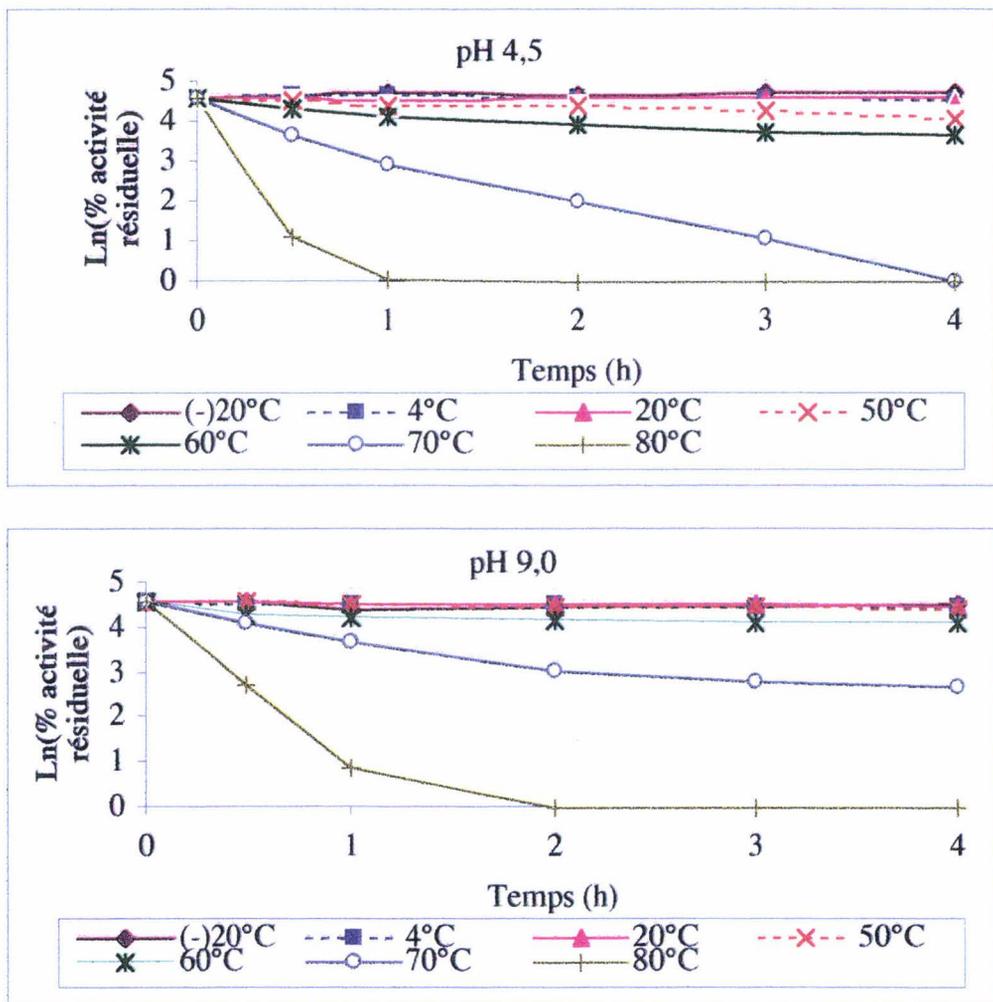


Figure 39 : Stabilité des activités protéasiques en fonction de la température.

L'extrait enzymatique est pré-incubé durant 1 heure à différentes températures. Essais réalisés en triple.

IV.3.1.4. Stabilité à la température du système enzymatique

Des cinétiques avec pré-incubation à différentes températures ont été réalisées en milieu tampon phosphate de sodium 10 mM, pH7,0, avant de mettre l'extrait enzymatique en présence de substrat à pH 4,5 ou 9,0.

Les résultats exprimés en activités relatives sont présentés figure 39. Nous avons retenu comme critère de stabilité une activité relative supérieure ou égale à 90% de l'activité initiale. Les deux activités sont stables jusque 50°C, valeur proche de la température optimale à pH 4,5 (55°C), oscillant entre 100% et 80%. A 60°C par contre elle se montre plus stable à pH 9,0 ce qui n'a rien de surprenant, 60°C étant la température optimale à pH 9,0. A 70 et 80°C, les activités s'effondrent, toujours plus rapidement à pH 4,5. Nous voyons donc ici une différence de comportement entre les deux activités, qui contraste avec ce qu'on observait au niveau de la stabilité vis-à-vis du pH.

IV.3.1.5. Détermination des paramètres cinétiques : constante d'affinité (Km) et vitesse maximale (Vm)

Cette étude a été réalisée aux pH 4,5 et 9,0 sur un substrat naturel (hémoglobine traitée par de l'urée 3M) et sur un substrat synthétique (BAPNA).

Nous avons choisi la représentation de Lineweaver et Burk ($1/V = f(1/[S])$) pour déterminer le Km et la vitesse maximale pour l'activité protéasique aux deux optima de pH.

IV.3.1.5.1. Hémoglobine

Les concentrations en hémoglobine varient de 0 à 20g/l ; dans ces conditions, la proportionnalité a été vérifiée jusque 10g/l d'hémoglobine.

L'affinité pour le substrat est comparable entre les deux activités (figure 40 et tableau 22, page 152). La vitesse maximale est 1,4 fois plus importante pour l'activité à pH 9,0.

L'intérêt d'une telle détermination sur ce substrat naturel réside dans la mesure où nous l'avons utilisé exclusivement tout au long de notre étude dans des conditions standard de pH, température et composition de milieu tampon. De plus elle nous permet une comparaison de comportements entre les deux activités étudiées. Dans notre cas précis, les comportements des deux activités ne nous permettent pas de conclure à deux entités enzymatiques différentes, les affinités étant comparables si l'on passe d'une représentation à l'autre. Une détermination sur des peptides (insuline B par exemple) devrait permettre de confirmer les valeurs obtenues.

En ce qui concerne le présent travail, nous avons effectué cette même détermination sur un substrat synthétique fréquemment rencontré dans la littérature.

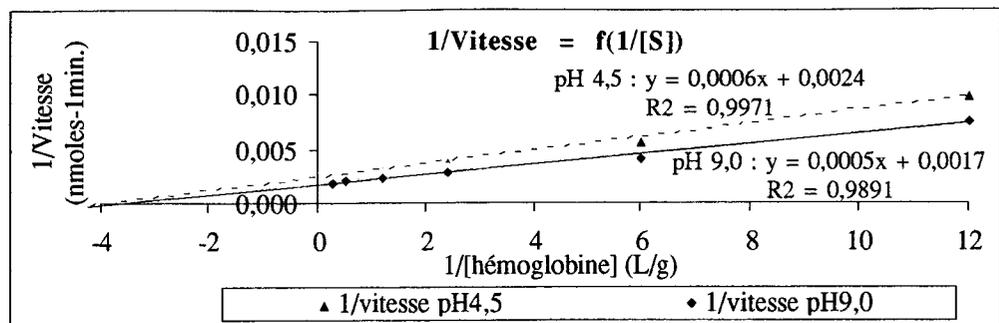


Figure 40 : Influence de la concentration en hémoglobine (substrat) sur l'activité protéasique à pH 4,5 et pH 9,0. Représentation de Lineweaver -Burk pour la détermination de V_m et K_m . Moyenne de deux déterminations. La concentration en hémoglobine indiquée en abscisse est celle du milieu réactionnel, soit : 1 ml d'hémoglobine de concentration donnée + 0,2 ml d'extrait enzymatique.

Tableau 22 : Valeurs de K_m et V_{max} obtenues avec l'hémoglobine comme substrat par la représentation graphique de Lineweaver et Burk.

	Activité aux pH optimaux		Rapport pH 9,0/pH 4,5
	pH 4,5	pH 9,0	
K_m (g.L-1)	0,25	0,29	1,16
V_m (nmole de tyrosine libérées.min-1)	417	588	1,41
V_{max}/K_m	1668	2027	1,22

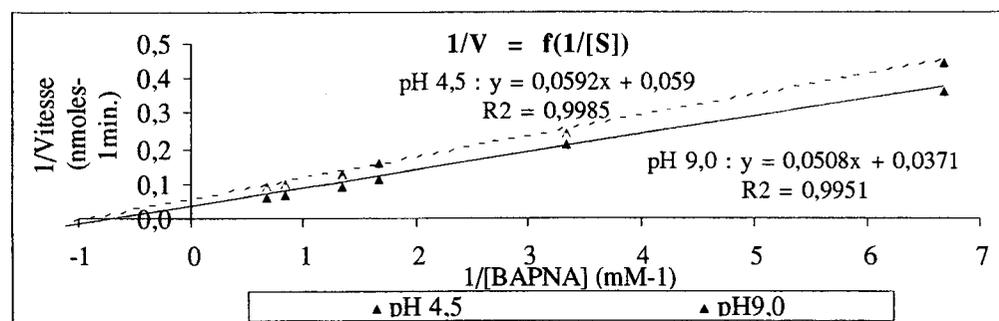


Figure 41 : Influence de la concentration en BAPNA (substrat) sur l'activité protéasique à pH 4,5 et pH 9,0. Représentation de Lineweaver -Burk pour la détermination de V_m et K_m . Moyenne de deux déterminations. La concentration en BAPNA indiquée en abscisse est celle du milieu réactionnel, soit : 50 μ l d'extrait enzymatique + 335 μ l de tampon pH 4,5 ou pH 9,0 + 15 μ l de substrat.

Tableau 23 : Valeurs de K_m et V_{max} obtenues avec le BAPNA comme substrat par la représentation graphique de Lineweaver et Burk.

	Activité aux pH optimaux		Rapport pH 9,0/pH 4,5
	pH 4,5	pH 9,0	
K_m (mM)	1,00	1,37	1,37
V_m (nmole de nitroaniline libérées.min-1)	17,00	26,95	1,59
V_{max}/K_m	17	19,67	1,15

IV.3.1.5.2. *N- α -benzoyl-DL-argininine-para-nitro-aniline (BAPNA)*

Les représentations en double inverse (figure 41) et le tableau 23 présentent les résultats obtenus sur le BAPNA.

Ces K_m sont comparables à ceux observés par Banno *et al.* (1983) sur une protéase extracellulaire de *T. pyriformis*. En effet, sur BAPNA également, ils obtiennent un K_m de 1,6mM ; d'autre part, ces valeurs sont proches du K_m de la cathepsine B qui est de 2mM (Banno *et al.*,1983). Les rapports des vitesses et des K_m entre les deux activités observées sont similaires avec une vitesse maximale 1,6 fois supérieure dans le cas de l'activité à pH 9,0 (contre 1,4 avec l'hémoglobine) et un K_m 1,4 fois supérieur, alors que nous les avons trouvés comparables dans le cas de l'hémoglobine ; toutefois, l'allure des courbes peut laisser penser que l'affinité des deux activités pour le substrat est la même, et que seule la vitesse varie.

Le tableau 24 résume les résultats précédemment obtenus. On observe peu de différences entre les deux optima de pH si ce n'est :

- une plage de stabilité au pH plus grande pour l'optimum pH 9,0.
- une vitesse maximale plus grande qui peut s'expliquer par une meilleure réactivité du système enzymatique à pH 9,0 du fait du traitement par l'urée 3M du substrat.

Tableau 24 : Récapitulatif des paramètres physico-chimiques et enzymatiques des activités protéasiques de *T. thermophila*. La stabilité est définie par une activité relative supérieure ou égale à 90% de l'activité initiale

Paramètre	pH optimal	
	pH 4,5	pH 9,0
Température optimale	55°C	55/60°C
Stabilité à la température	2h/50°C	2h/50°C
Stabilité au pH	3,0 À 9,0	3,0 À 9,0
V_m sur hémoglobine	450 nmol.min ⁻¹	625 nmol.min ⁻¹
sur BAPNA	17 nmol.min ⁻¹	26,95 nmol.min ⁻¹
K_m sur hémoglobine	0,25 g.L ⁻¹	0,29 g.L ⁻¹
sur BAPNA	1,00mM	1,37mM

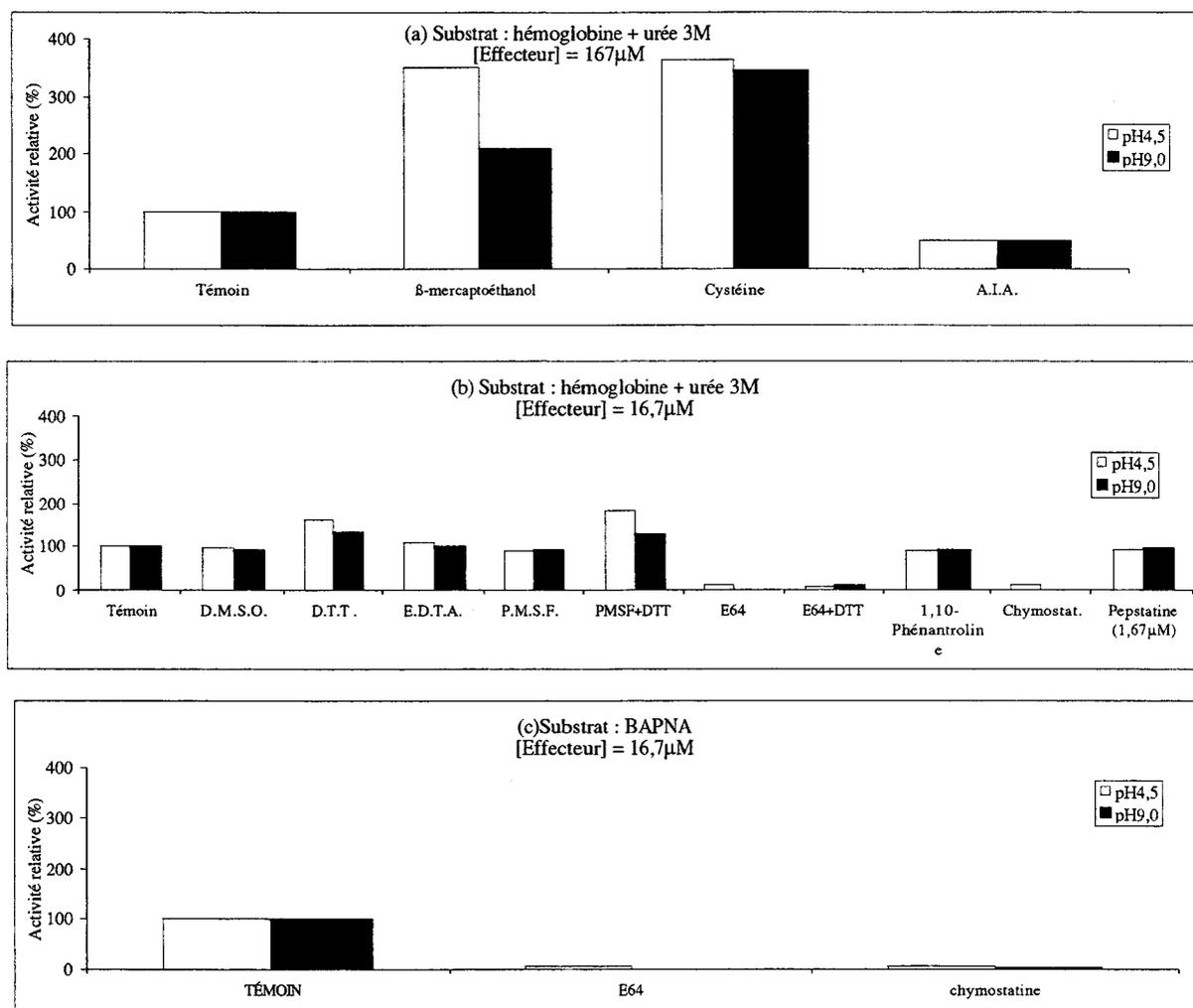


Figure 42 : Influence d'effecteurs spécifiques sur les activités protéasiques de *T. thermophila* testées sur hémoglobine (a&b) et sur BAPNA (c).

L'extrait enzymatique a été pré-incubé durant 1h à 25°C en présence de l'inhibiteur avant incubation avec le substrat. Les concentrations indiquées sont celles de l'inhibiteur dans le milieu réactionnel lors de l'incubation.

IV.3.1.6. Influence des effecteurs

IV.3.1.6.1. Effecteurs spécifiques des protéases

Nous avons cherché à déterminer dans quelle famille de protéases il était possible de ranger chacune des deux activités.

La figure 42 nous permet de constater que notre système est inhibé par le E64, la chymostatine et l'acide iodo-acétique, sans pouvoir toutefois faire une différence dans leur comportement sur les activités à pH 4,5 et 9,0.

L'EDTA se conduit ici de façon neutre, contrairement à ce qu'avaient observé Levy *et al.* (1976) ; son rôle serait de piéger les métaux susceptibles de catalyser l'oxydation des groupements SH et diminuer de cette façon la formation de radicaux libres, mais l'EDTA n'est pas un antioxydant primaire. Par contre, l'addition de DTT, ajouté en même temps qu'un inhibiteur étudié, semble jouer un rôle protecteur en diminuant l'oxydation des groupements SH. Nous avons pu aussi constater le rôle activateur du β -mercaptoéthanol et de la cystéine, à pH 9,0 et plus encore à pH 4,5, les deux produits ayant la propriété d'être de puissants agents réducteurs. Il ne s'agit pas d'un réel effet activateur mais plutôt d'un rôle de restauration de la structure des cystéines protéases suite à une oxydation. Ce rôle serait à confirmer en testant d'autres substances analogues comme le bisulfite, par ailleurs très utilisé en IAA. Levy *et al.* (1976), ainsi que Banno *et al.* (1983) ont observé ce rôle d'"activateur" avec les souches *T. pyriformis* W et E.

Par cette étude de l'action des principaux effecteurs spécifiques et d'après le tableau 25, nous pouvons conclure que nous sommes en présence d'un système de type "cystéine-protéase".

Tableau 25: Classification des protéases selon leur sensibilité à différents effecteurs spécifiques

Type de protéase	Inhibiteurs spécifiques	Activateurs
Sérine-protéases	Chymotrypsine, PMSF	
Cystéine protéases	E64, acide iodo-acétique, chymostatine	Dithiothréitol (DTT), β -mercaptoéthanol
Métalloprotéases	EDTA, 1,10-phénantroline	
Aspartate protéases	pepstatine	

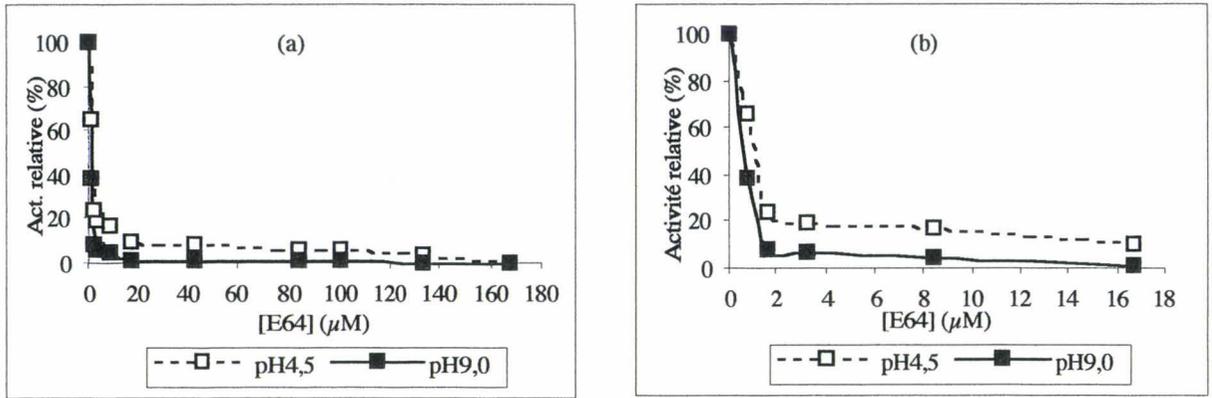


Figure 43 : Influence de la concentration en E64 sur l'activité protéasique de *T. thermophila* sur hémoglobine traitée par de l'urée 3M.

La figure (b) est un "zoom" de la figure (a). L'extrait enzymatique a été pré-incubé durant 1h à 25°C en présence de l'inhibiteur avant incubation avec le substrat. Les concentrations indiquées sont celles de l'inhibiteur dans le milieu réactionnel lors de l'incubation.

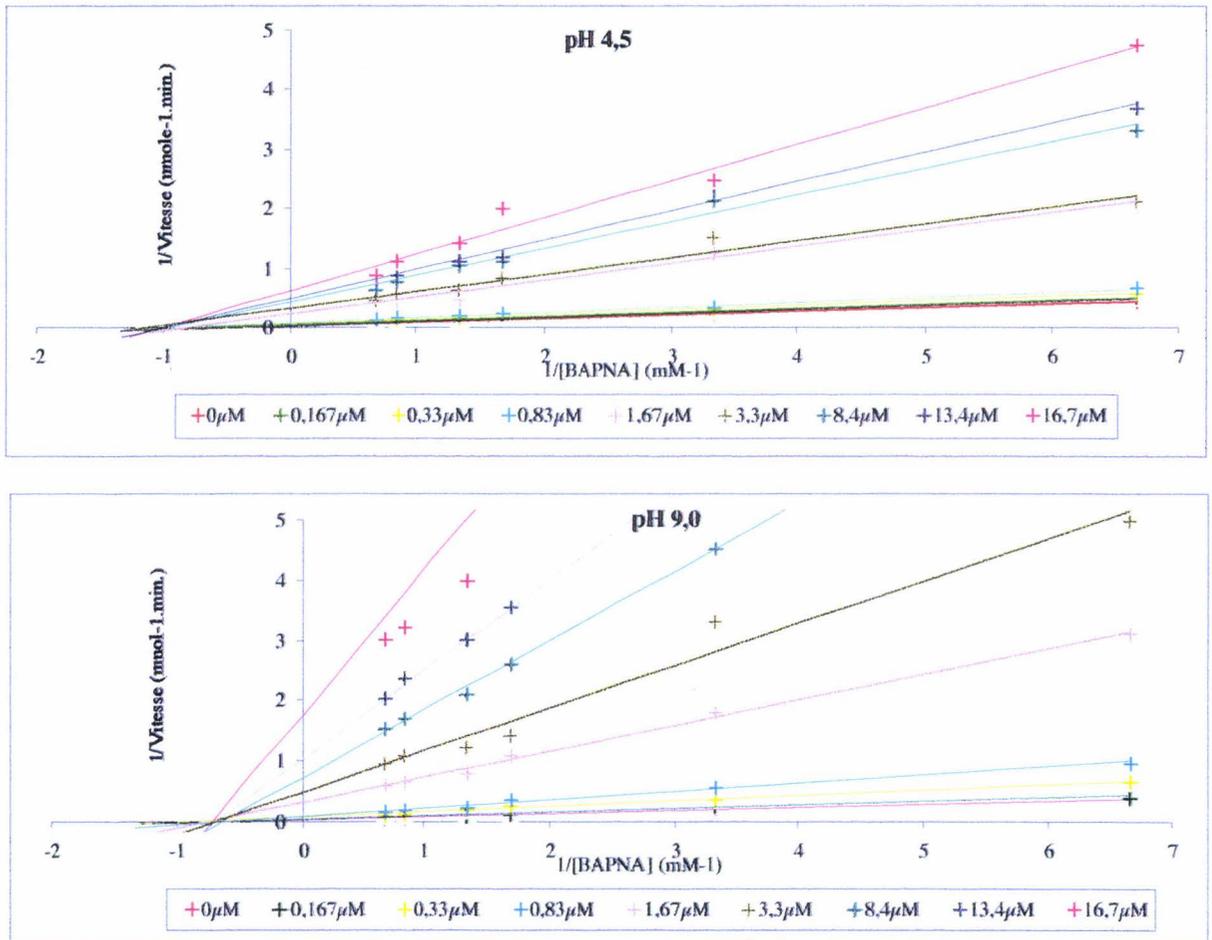


Figure 44 : Influence de la concentration en E64 sur l'activité protéasique sur BAPNA.

Essais réalisés à volume constant de milieu réactionnel.

Le dosage des groupements thiols libres du système enzymatique par le 5-5'-bis-dithiodinitrobenzène pourrait renforcer nos hypothèses, mais il nécessite de travailler sur une enzyme purifiée, condition non obtenue en l'état actuel des travaux.

Il nous a donc paru intéressant de cerner davantage le seuil d'inhibition de l'activité protéasique sur hémoglobine par le E64. La figure 43 montre que celui-ci est très faible.

Enfin nous avons réalisé une détermination du type d'inhibition par ce même effecteur avec le BAPNA comme substrat (figure 44 et tableau 26). Les représentations en double inverse nous permettent de conclure qu'il s'agit d'une inhibition non compétitive ce qui signifie que le E64 peut se fixer à la fois à l'enzyme (E) et au complexe enzyme-substrat (ES) pour former des complexes enzyme-inhibiteur (EI) et enzyme-inhibiteur-substrat (ESI), tous deux inactifs (figure 45). Dans ce cas, l'inhibiteur se fixe en un site éloigné du centre actif, il n'empêche pas l'approche de celui-ci par le substrat, il n'y a donc pas d'effet de compétition entre ces ligands, mais la fixation de l'inhibiteur peut provoquer une déformation de l'enzyme telle que le fonctionnement de celle-ci soit perturbé.

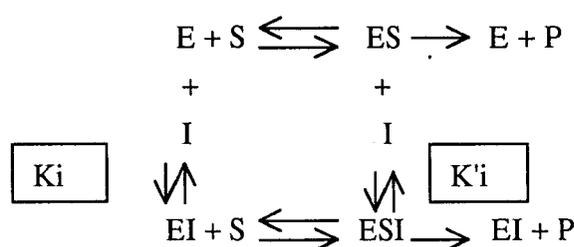


Figure 45 : Inhibition non compétitive pure

Le E64 est sans ressemblance structurale avec le substrat, cas de ce type d'inhibiteur, que l'on ne peut contrecarrer par déplacement du complexe enzyme-inhibiteur. Quand un tel inhibiteur se fixe avec la même affinité à l'enzyme et au complexe ES (constantes d'équilibre ou d'association $K_i = K'_i$), cette dernière étant la constante d'inhibition de la réaction $ES \rightleftharpoons ESI$, on parle d'inhibition non compétitive pure, ce qui se traduit par une diminution de V_{max} sans modification de K_m .

Tableau 26 : Valeurs des K_m et V_{max} obtenues en fonction de la concentration en E64

[E64] milieu réactionnel (μM)	K_m (mM)		V_{max} (nmoles.min. ⁻¹)	
	pH 4,5	pH 9,0	pH 4,5	pH 9,0
0	1,00	1,37	17,00	26,95
0,167	0,97	1,41	15,08	24,39
0,33	0,94	1,24	11,98	13,91
0,83	1,02	1,47	11,82	10,87
1,67	1,20	1,28	4,22	3,01
3,33	1,04	1,44	3,30	2,05
8,4	1,07	1,57	2,39	1,37
13,4	1,03	1,46	2,08	0,98
16,7	0,98	1,42	1,59	0,58

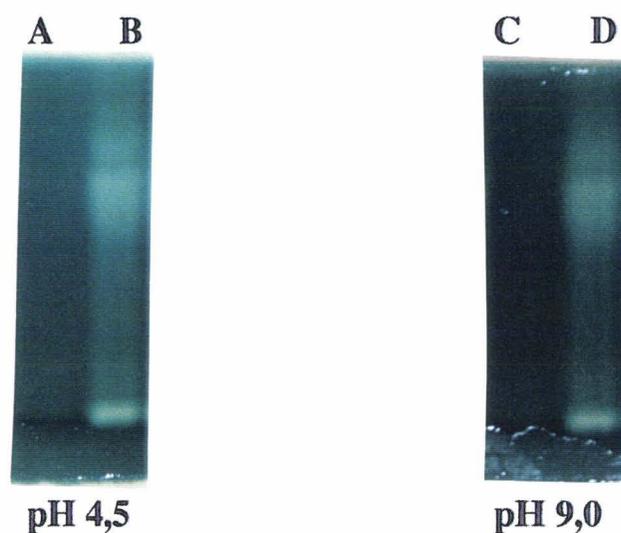


Figure 46 : Profils électrophorétiques de lyse de la gélatine obtenus avec l'extrait enzymatique de *T. thermophila*, en présence et en l'absence de E64

2 μ l d'extrait enzymatique HA de *T. thermophila*, contenant 1 μ g de protéines, additionné (pistes A et C) ou non (pistes B et D) de E64 à la concentration de 0,1 mM ont été déposés. Après migration sous courant de 15 mA, le gel est mis à incuber à 37 °C durant 5 heures, dans un tampon acétate de sodium 200 mM, pH 4,5 (pistes A et B) ou Tris/Hcl 200 mM, pH 9,0 (pistes C et D). Les zones de digestion de la gélatine apparaissent en clair par rapport au reste du gel coloré par l'amidoblack.

Dans le cas de l'inhibition non compétitive mixte, l'inhibiteur se fixe avec des affinités différentes à E et ES ; V_{max} est alors abaissé et K_m peut être augmenté ou diminué selon que K_i est respectivement inférieur ou supérieur à K'_i .

L'examen des K_m apparents obtenus en fonction de la concentration en inhibiteur (tableau 26, page 157) nous montre qu'ils se situent de part et d'autre de la valeur du K_m en l'absence de E64 ($[E64] = 0$ mM), avec une moyenne de $1,03 \pm 0,08$ mM à pH 4,5, de $1,41 \pm 0,10$ mM à pH 9,0 ce qui nous oriente vers le premier cas de figure. On peut émettre l'hypothèse de la présence de groupements SH au niveau du site de catalyse, d'une part, qui seraient impliqués dans l'interaction enzyme-inhibiteur, mais aussi à d'autres endroits (SH de structure) avec lesquels le E64 pourrait réagir une fois les SH du site actif bloqués. Une visualisation du site de catalyse du système enzymatique après une purification plus poussée permettrait de mettre en évidence les groupements SH les plus réactifs, ou tout du moins les plus accessibles et de déterminer si leur rôle premier réside dans la réactivité du site actif ou dans le maintien de la conformation du système.

Nous avons pu observer en marge de ces essais, après avoir laissé incuber 1h notre extrait enzymatique en présence de E64, puis réalisation d'une électrophorèse en gélatine SDS PAGE, une sensible atténuation, voire une disparition des bandes de lyse (figure 46).

Les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence des différences de réactivité entre les deux activités. Nous avons choisi de tester d'autres effecteurs moins spécifiques.

IV.3.1.6.2. Effecteurs enzymatiques

Les effecteurs classiques (métaux, agents chélatants et certains composés utilisés dans les méthodes analytiques) ont été ajoutés à des concentrations variables à l'extrait enzymatique selon leur nature. L'examen de la figure 47 (page 160) permet de constater qu'aucun des effecteurs n'est du type activateur.

L' $HgCl_2$, connu pour bloquer les groupements thiol, inhibe de façon identique les deux activités mais ne peut servir pour caractériser une activité du fait de son manque de spécificité. La sensibilité au PCMB (para-chloro-mercuri-benzoate, qui devient le para-hydroxy-mercuri-benzoate en solution)), inhibiteur des groupements SH, mise en évidence par Ethuin (1993) va dans le même sens.

Le NaCl augmente la force ionique du milieu, et de ce fait peut entraîner une diminution du degré d'hydratation, voire une modification de conformation de la protéine ; ceci justifie donc son étude comme effecteur ; de plus il peut être utilisé à des concentrations variables lors de certaines chromatographies préparatives. Il fallait donc vérifier son activité vis-à-vis de l'activité protéasique.

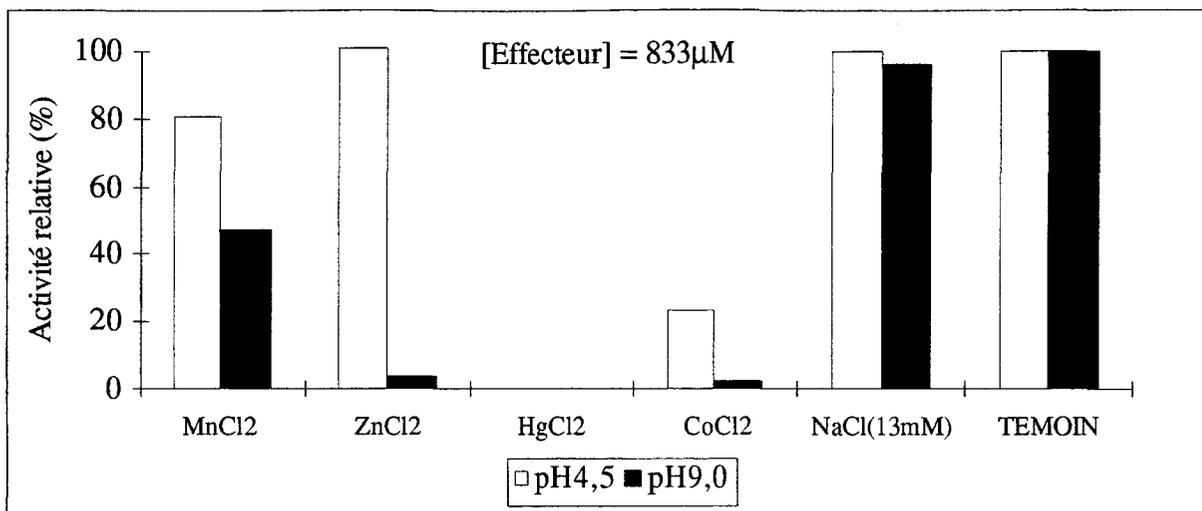


Figure 47 : Influence de différents effecteurs sur les activités protéasiques de *T. Thermophila* sur hémoglobine traitée par l'urée 3M.

L'extrait enzymatique a été pré-incubé durant 1h à 25°C en présence de l'inhibiteur avant incubation avec le substrat. Les concentrations indiquées sont celles de l'inhibiteur dans le milieu réactionnel lors de l'incubation. Chaque effecteur a été testé en double.

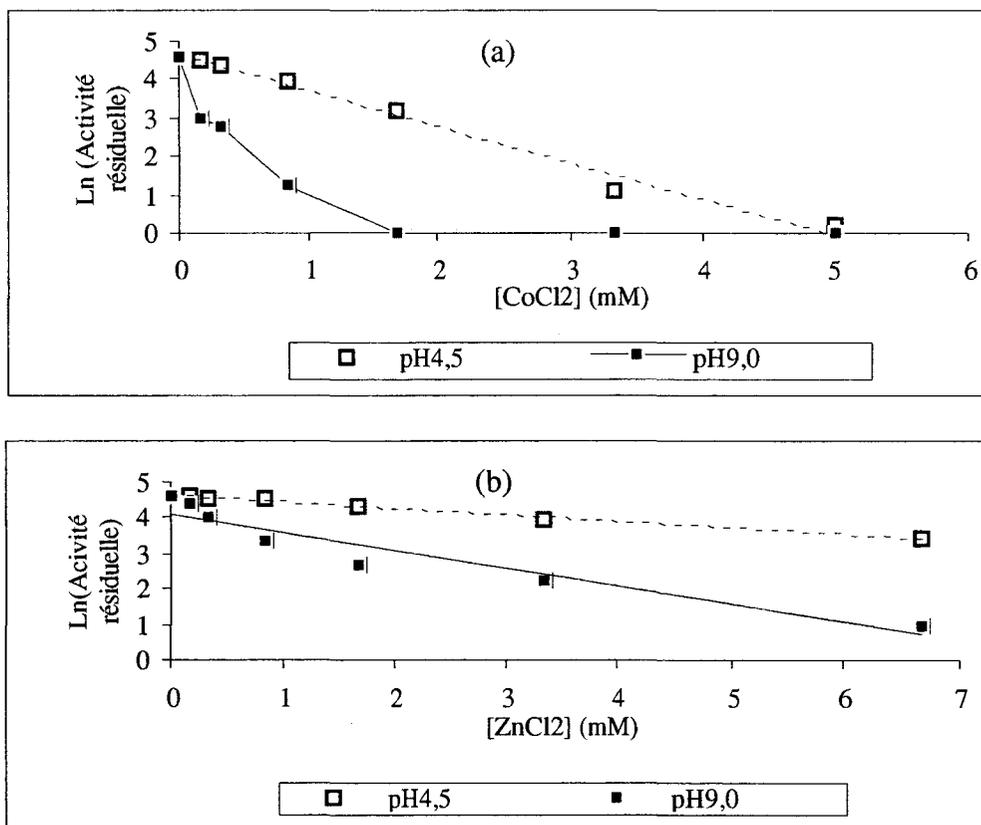


Figure 48 : Influence de la concentration en CoCl₂ (a) et en ZnCl₂ (b) sur les activités protéasiques de *T. thermophila*. Les concentrations sont celles du milieu réactionnel. L'interaction du Cobalt avec le réactif de Folin a été corrigée en faisant un témoin. Chaque essai a été réalisé en double

Parmi les autres effecteurs, certains nous ont davantage intéressé non seulement pour leur intensité d'action, mais surtout pour le fait que cette action est totalement inhibitrice à un seul des deux pH. Il s'agit du CoCl_2 et du ZnCl_2 . Le CoCl_2 inhibe à 78% l'activité à pH 4,5, et à 93% l'activité à pH 9,0. Le ZnCl_2 est plus intéressant encore car il n'inhibe pas du tout l'activité à pH 4,5 (100,5% d'activité relative) et totalement celle à pH 9,0 (3,6% d'activité relative). Le manganèse lui aussi semble avoir une action différenciée, puisque inhibant l'activité à pH 9,0 d'environ 50%. Cet effet n'a pas été observé par d'autres auteurs. Par contre un effet inhibiteur du magnésium est signalé par Banno *et al.* (1983) ce qui n'est pas le cas ici. Le MnCl_2 pour sa part a un effet inhibiteur deux fois supérieur sur l'activité à pH 9,0 (52,5%) par rapport à l'activité à pH 4,5 (20%), mais nous restons à un taux d'activité relative assez élevé.

Nous avons donc poussé un peu plus avant les études sur le cobalt et le zinc, dans l'idée de pouvoir utiliser cette inhibition sélective pour différencier les deux optima d'activité.

IV.3.1.6.2.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN COBALT

Nous avons voulu étudier plus en détails l'influence du cobalt pour essayer de trouver une concentration à inhibition plus sélective de ce sel vis-à-vis des deux activités. L'effet observé plus haut est confirmé, mais le cobalt présente une forte interférence avec le réactif de Folin lors des dosages d'activité protéasique, même à 0,17mM (figure 48a). L'étude de l'influence de ce sel n'a donc pas été poussée plus avant. Par contre, nous n'avons pas observé de précipitation à pH 9,0 des sels de cobalt lors de la mise en présence de la solution enzymatique avec le substrat.

IV.3.1.6.2.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ZINC

On observe ici le même type de courbe (Figure 48b) que pour le CoCl_2 . Il s'avère plus intéressant de se placer à 1,67 mM, car l'activité relative à pH 4,5 bien que réduite de 25% est encore bien préservée, et l'activité à pH 9,0 n'est plus que de 14,4%. Nous avons choisi d'étudier plus précisément l'action sélective du zinc, car, à la différence du précédent inhibiteur, nous n'observons pas d'interférence avec le réactif de Folin.

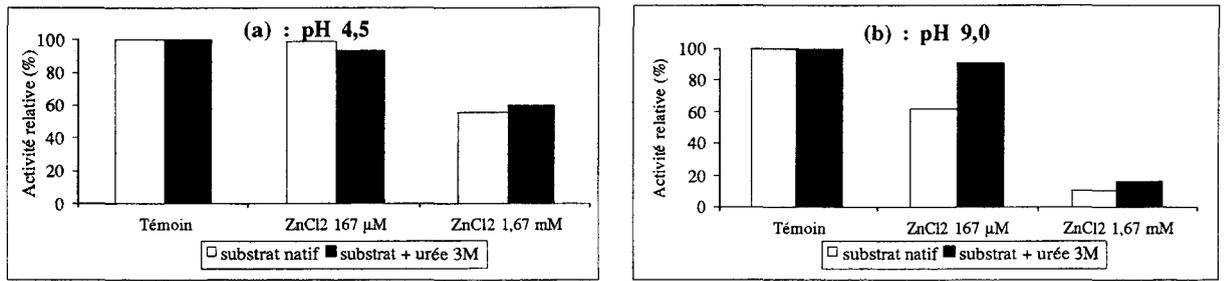


Figure 49 : Addition de zinc au substrat - Influence du traitement du substrat (hémoglobine) par l'urée 3M sur l'activité protéasique. Le zinc a été ajouté au substrat au cours de sa préparation

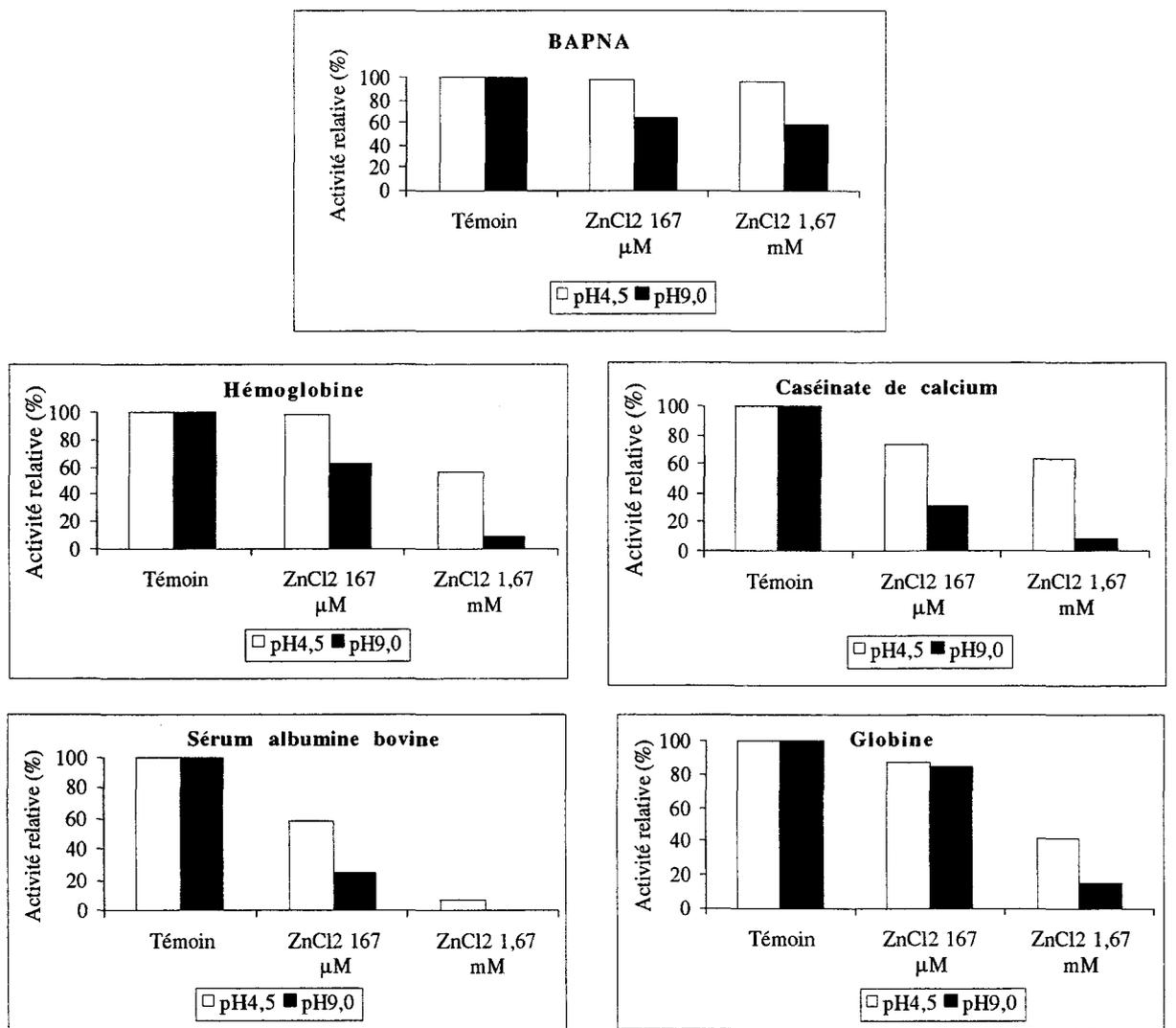


Figure 50 : Addition de zinc au substrat - Influence de la nature du substrat sur l'effet du zinc. Le zinc a été ajouté au substrat au cours de sa préparation. Les substrats sont à l'état natif.

IV.3.1.6.3. Influence du zinc

Nous avons cherché à savoir si ce métal agissait sur le substrat, modifiant ainsi sa conformation et l'accessibilité de l'enzyme, d'une part, et si la nature du substrat pouvait avoir d'autre part une influence.

Il nous a semblé intéressant de savoir si l'hémoglobine subit ou non une modification de conformation en présence de zinc. Pour cela nous avons essayé d'approcher, par mesure de fluorescence, la dynamique moléculaire du substrat.

IV.3.1.6.3.1. INFLUENCE DU ZINC AJOUTE AU SUBSTRAT

□ Influence du traitement du substrat par l'urée

Nous avons ici choisi de travailler en parallèle sur le substrat natif et dénaturé, en ajoutant le chlorure de zinc à l'hémoglobine pour obtenir une concentration finale dans le milieu réactionnel de 167 μM ou de 1,67 mM, valeur permettant une bonne discrimination entre les deux optima d'activité comme nous l'avons vu au paragraphe précédent (figure 49). Les résultats montrent une sensibilité légèrement supérieure du substrat natif vis-à-vis du zinc, et ce toujours à pH 9,0. Ceci suggère que le traitement par l'urée 3M du substrat protègerait d'une certaine façon celui-ci de l'action du zinc. Mais il reste à déterminer si l'action du zinc a lieu sur le substrat, le rendant inaccessible au système enzymatique, ou sur ce système enzymatique ou encore les deux en même temps. En effet, il est impossible ici de différencier l'action possible du zinc sur l'enzyme et/ou sur le substrat puisqu'il se trouve dans le milieu réactionnel. Nous pouvons simplement souligner le fait qu'à faible concentration en zinc, celui-ci ne montre pas de réactivité sur le système enzymatique, alors qu'à la concentration dix fois supérieure, l'effet inhibiteur à pH 9,0 seulement est confirmé. L'état du substrat joue par ailleurs sur le niveau d'expression du système enzymatique.

□ Influence de la nature du substrat

Les résultats obtenus avec l'hémoglobine (figure 49) montrent que le zinc est un inhibiteur de l'activité enzymatique, que ce soit à pH 4,5 ou pH 9,0. On remarque que la diminution de la réactivité est plus marquée à pH 9,0 qu'à pH 4,5. Lorsque les réactions sont réalisées en présence d'urée 3M, il n'y a pas de différence de comportement à pH 4,5. Par contre à pH 9,0, on note une inhibition moins importante du zinc sur la réactivité enzymatique. L'urée et le zinc semblent avoir des actions antagonistes.

Lorsque les activités protéolytiques sont testées vis-à-vis des autres substrats non traités par l'urée, les résultats rassemblés dans la figure 50 montrent que :

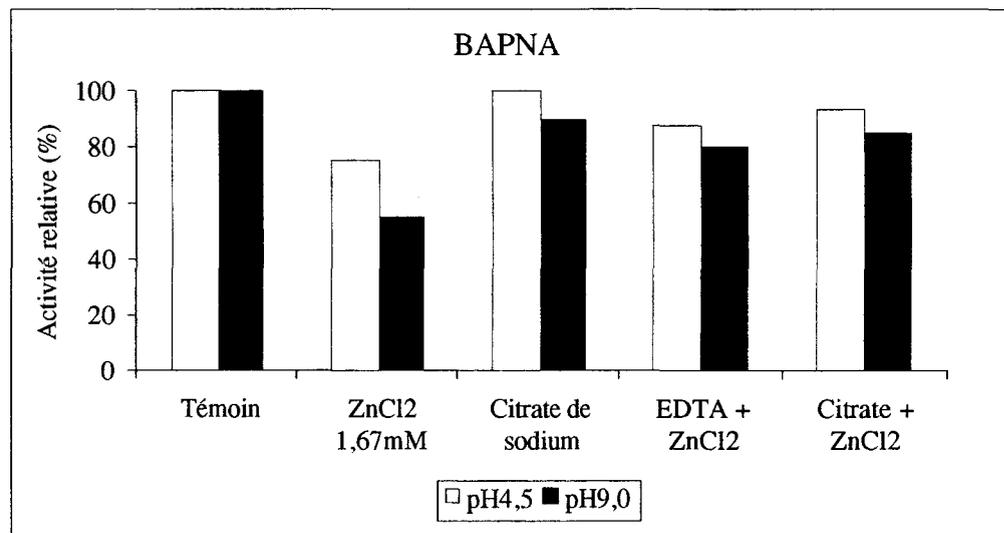
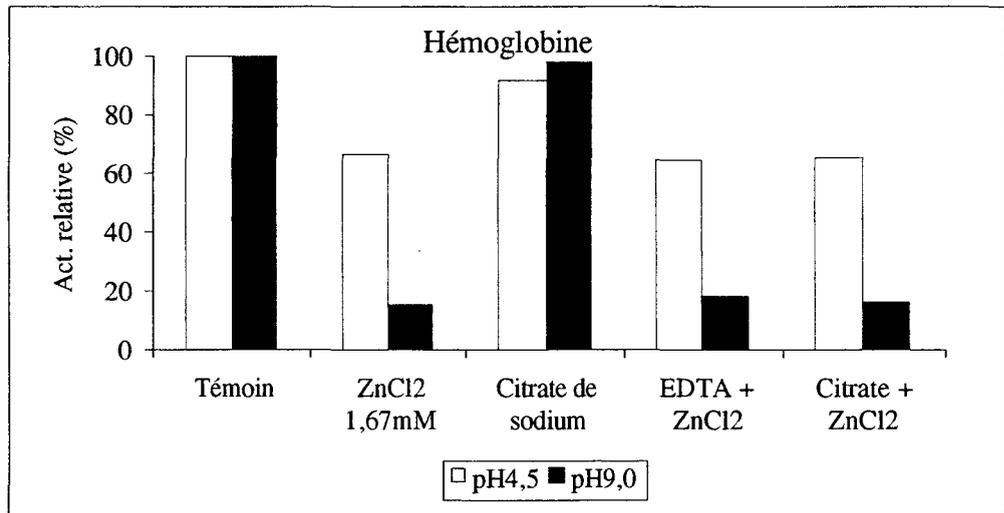


Figure 51 : Influence du zinc ajouté à l'extrait enzymatique sur l'activité protéasique de *T. thermophila* : effet de l'ajout préalable d'EDTA ou de citrate de sodium à la même concentration (1,67 mM)

- le zinc est un inhibiteur de l'activité dès les faibles valeurs de concentration ;
- le zinc a une action plus marquée à pH 9,0 qu'à pH 4,5 ;
- le zinc possède une action modérée sur la réactivité vis-à-vis de la globine ;
- la réponse est indépendante de la concentration dans le cas du substrat de synthèse.

IV.3.1.6.3.2. INFLUENCE DU ZINC AJOUTE A L'ENZYME

Il s'agissait de savoir si l'EDTA, ou un acide polyfonctionnel tel que le citrate de sodium permettaient de limiter l'action inhibitrice du zinc. Ces composés ont donc été ajoutés à la solution enzymatique avant le $ZnCl_2$ et avant mélange avec le substrat (figure 51).

L'EDTA et le citrate de sodium, ajoutés seuls, ne sont pas inhibiteurs des cystéines protéases, ce que nous vérifions ici. Ajoutés préalablement au $ZnCl_2$, et sur substrat naturel, ces composés ne lèvent pas l'effet inhibiteur du zinc, à pH 4,5 comme à pH 9,0. Cela peut s'expliquer par le fait que l'EDTA ne peut chélater qu'en milieu basique, quand toutes ses fonctions sont ionisées. Si les groupements sulfhydryles ont déjà été touchés, il est peu probable de pouvoir restaurer l'activité ; pratiquement, cela sous-entend qu'il faille dès le début de la purification travailler en milieu réducteur.

Par contre, les acides polyfonctionnels, permettent de capter, en milieu acide et par chélation, les ions métalliques susceptibles de produire l'oxydation des groupements sulfhydryle ; on aurait donc pu s'attendre à un effet "restaurateur" du citrate de sodium, si ce n'est dans la solution enzymatique (en milieu tampon phosphate 10 mM, pH 7,0), du moins à pH 4,5.

Avec le substrat synthétique par contre, cet effet restaurateur est observé aux deux pH.

IV.3.1.6.3.3. CONCLUSION SUR L'INFLUENCE DU ZINC

Après avoir confirmé l'action inhibitrice sélective du zinc à pH 9,0, le phénomène de compensation entre activité enzymatique et modification probable du substrat par l'urée à pH 9,0, observé figure 48 (page 160), a orienté la suite de nos expérimentations sur l'influence de l'urée.

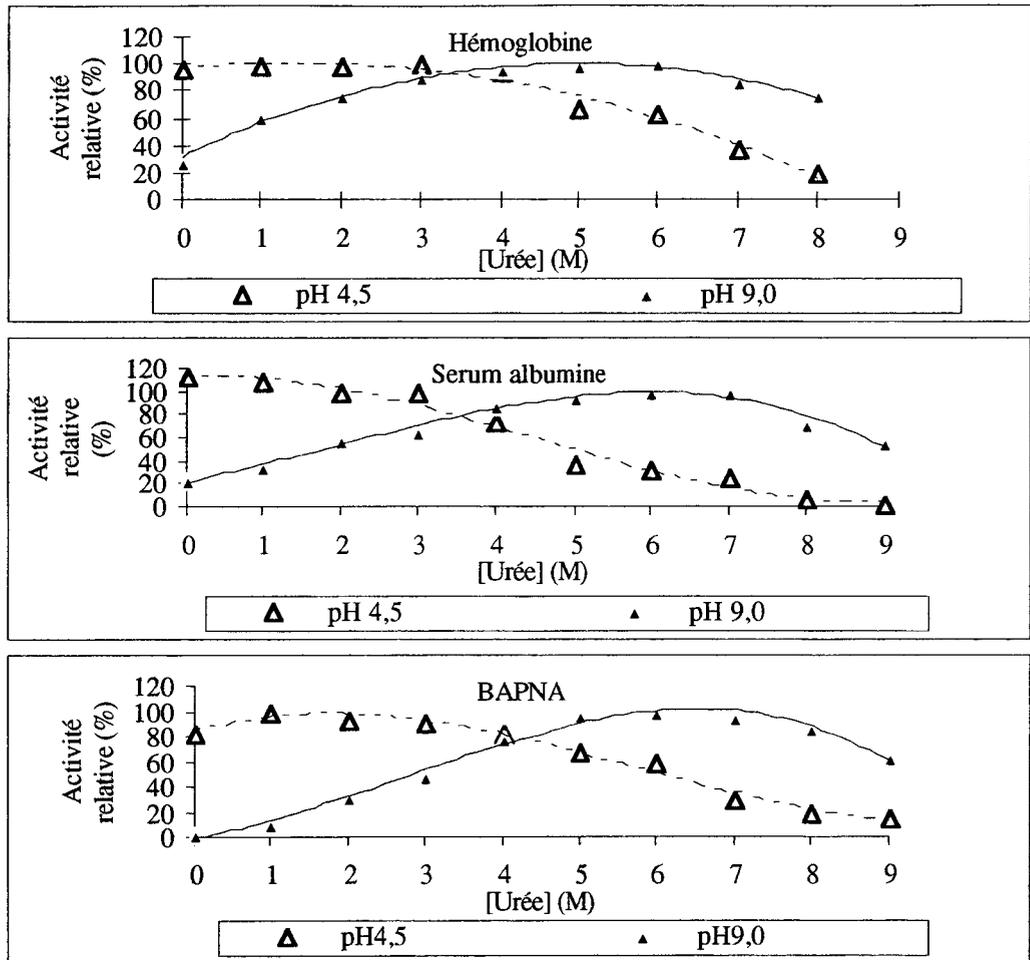


Figure 52 : Influence de l'urée ajoutée au substrat sur l'activité de *T. thermophila*.

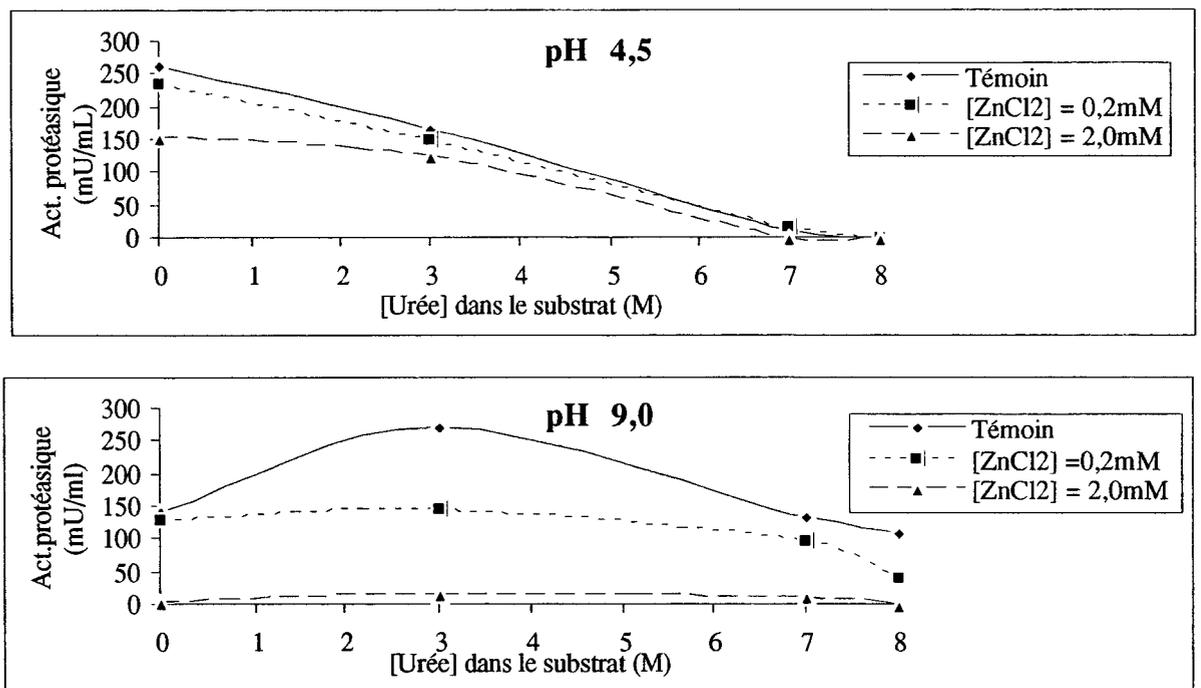


Figure 53 : Influences combinées du zinc et de l'urée ajoutées au substrat (hémoglobine) sur l'activité protéasique.

IV.3.1.7. Influence particulière de l'urée

IV.3.1.7.1. Influence de la concentration en urée ajoutée au substrat - Influence de la nature du substrat

Outre l'hémoglobine, deux autres substrats ont été testés dont un synthétique.

Les trois profils sont similaires (figure 52) Ajoutée au substrat, l'urée augmente l'activité à pH 9,0 jusqu'à une concentration de 6M ; à pH 4,5 l'effet inhibiteur de l'urée apparaît au delà d'une concentration de 3M. Le fait que les courbes obtenues sur le substrat synthétique sont identiques à celles obtenues sur substrat naturel nous conduit à penser que l'urée n'a d'effet que sur le système enzymatique. Le comportement de l'activité à pH 9,0 apparaît alors décalé par rapport à ce qu'on observe à pH 4,5 : de faibles concentrations en urée induisent une faible réactivité mais on retrouve plus loin un effet inhibiteur.

IV.3.1.7.2. Influence combinée du zinc et de l'urée ajoutés au substrat

La figure 53 confirme les hypothèses émises à l'observation de la figure 49.

A pH 4,5 l'action du zinc est fonction de la concentration en urée dans le substrat, ce qui sous-entend sinon sa neutralité vis-à-vis du système enzymatique à ce pH, du moins son moindre rôle par rapport à celui de l'urée ; celle-ci ne modifie donc pas le substrat à pH 4,5.

A pH 9,0 on retrouve l'action inhibitrice du zinc par la baisse de réactivité du système enzymatique alors même que la concentration critique en urée n'est pas atteinte. L'effet de ce métal est donc indépendant, il y a conjonction de deux actions, mais au final, l'effet du zinc supplante celui de l'urée. L'action bénéfique de l'urée à 0,2mM de $ZnCl_2$ est freinée par le zinc. L'action du zinc à pH 9,0 a donc bien lieu sur le système enzymatique.

IV. 3.1.7.3. Influence de la concentration en urée ajoutée au substrat et à l'enzyme

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de deux concentrations en urée : 3M et 7M. Les résultats obtenus avec l'hémoglobine ou la serum albumine bovine sont rassemblés dans la figure 54.

La présence d'urée à la fois dans le substrat et la solution enzymatique à la concentration de 7M inhibe totalement l'activité à pH 4,5, mais diminue aussi légèrement celle à pH 9,0. Par contre avec 7M d'urée dans le substrat et 3M d'urée dans la solution enzymatique, on a une activité exacerbée à pH 9,0 et affaiblie de 93% à pH 4,5.

Les résultats obtenus méritant d'être affinés, nous avons réitéré l'expérience, sur hémoglobine seulement, en "balayant" une gamme plus large de concentrations en urée (figure 55). Le tableau 27 donne la correspondance entre les concentrations en urée dans l'extrait enzymatique et dans le substrat d'une part, et la concentration en urée résultante dans le milieu réactionnel d'autre part.

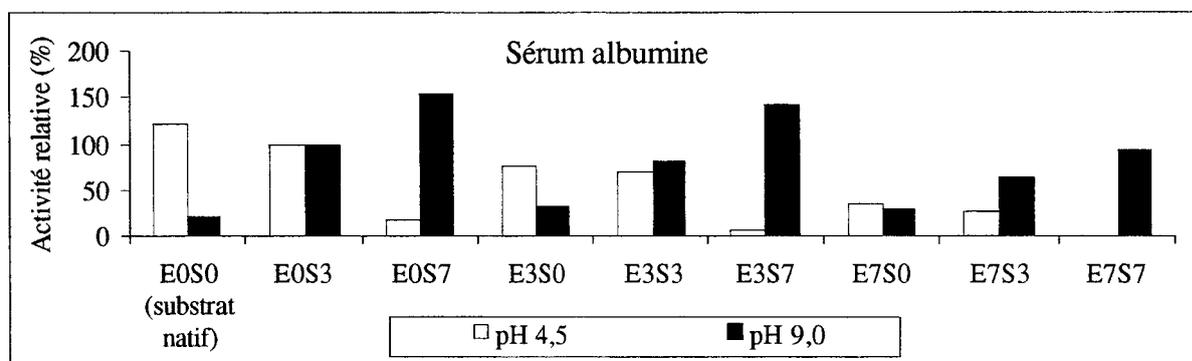
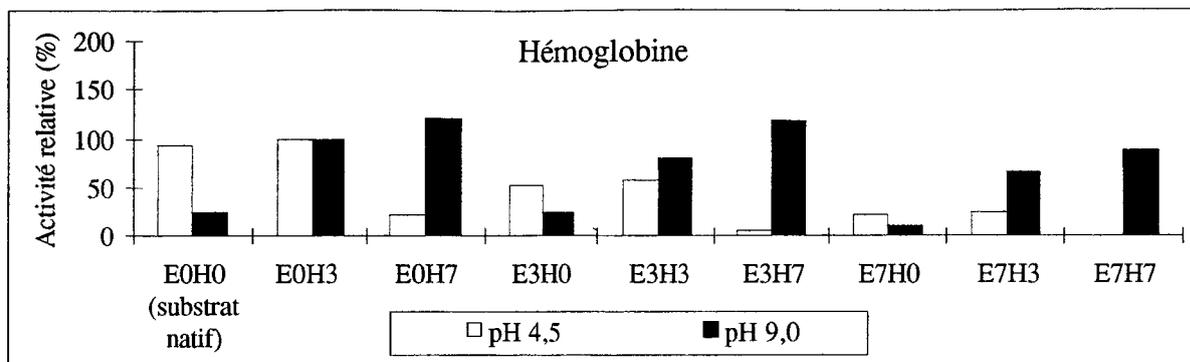


Figure 54 : Influence de la concentration en urée dans l'extrait enzymatique et dans le substrat (hémoglobine, sérum albumine). La lettre indique fait référence soit au substrat (H ou S) soit à l'extrait enzymatique (E) ; le chiffre suivant la lettre est la concentration molaire en urée ajoutée. L'extrait enzymatique a été pré-incubé pendant 1h avant d'être mis au contact du substrat.

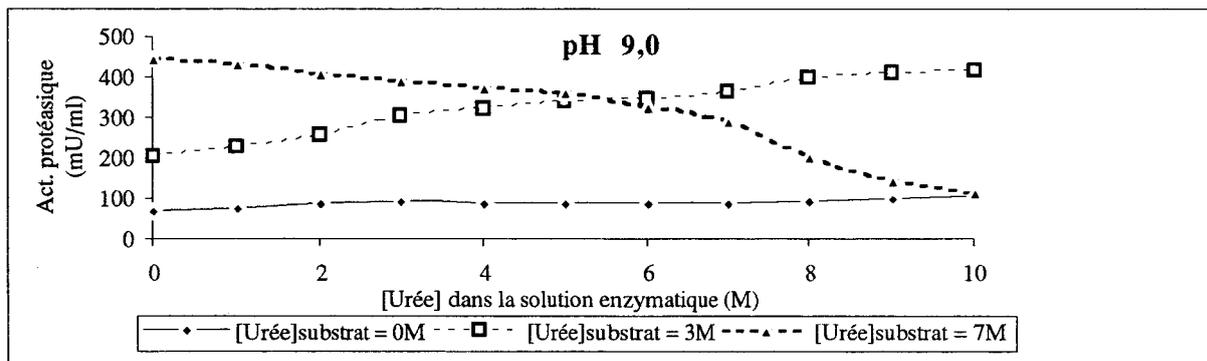
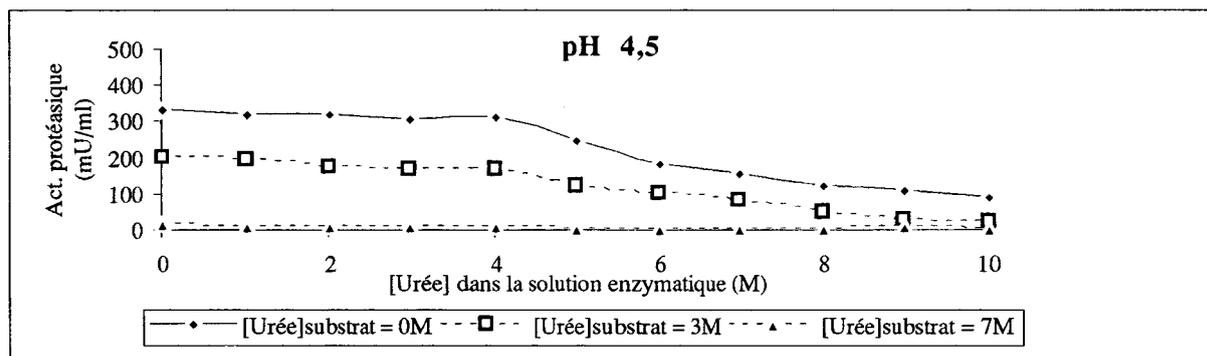


Figure 55 : Influence de la concentration en urée dans l'extrait enzymatique et dans le substrat (hémoglobine) . L'urée a été ajoutée à l'extrait enzymatique (pré-incubation de 1h) et à l'hémoglobine aux concentrations indiquées. Puis la détermination de l'activité protéasique a été réalisée.

Tableau 27 : Correspondance entre les taux d'urée ajoutée à l'extrait enzymatique et au substrat et la concentration résultante en urée dans le milieu réactionnel.

[Urée] ENZYME (M)	[Urée] SUBSTRAT (M)		
	0	3	7
	[Urée] dans	le milieu	réactionnel
0	0	2,5	5,83
1	0,17	2,67	6
2	0,33	2,83	6,17
3	0,5	3	6,33
4	0,67	3,17	6,5
5	0,83	3,33	6,67
6	1	3,5	6,83
7	1,17	3,67	7
8	1,33	3,83	7,17
9	1,5	4	7,33
10	1,67	4,17	7,5

Ainsi, à pH 4,5, l'effet inhibiteur de l'urée dans la solution enzymatique n'apparaît qu'à partir de 4M d'urée dans la solution enzymatique, quelque soit la concentration en urée dans le substrat, ce qui signifie qu'une concentration finale dans le milieu réactionnel de 0,67M se répercute déjà, à ce pH, sur l'activité enzymatique.

A pH 9,0, l'activité est très faible lorsque le substrat n'est pas additionné d'urée, celle-ci est favorable à l'activité même à 7M dans le substrat, jusqu'à 2M dans l'enzyme, soit un peu plus de 6M en milieu réactionnel. L'activité à ce pH n'est donc pas sensible à l'urée mais au déplissement de la protéine : de plus en plus de structures deviennent accessibles à l'enzyme, c'est le phénomène inverse de celui qui a lieu à pH 4,5. Il y a compensation de la modification du substrat par le pH par la concentration en urée, ce que l'on avait observé déjà sur la figure 51 avec la même allure de courbe pour ce pH ; toutefois, cette hypothèse ne s'applique pas pour le substrat synthétique.

IV.3.1.7.4. Dégradation de l'activité protéasique à pH 4,5 par l'urée et récupération par dialyse

La figure 56 (page 170) met en évidence le caractère réversible de l'action de l'urée sur le système enzymatique, tant à pH 4,5 qu'à pH 9,0. Après 2 heures de dialyse, les activités respectives à pH 4,5 et pH 9,0 ne se situent pas tout à fait au même niveau que pour le témoin, preuve que l'élimination de l'urée n'est pas totale.

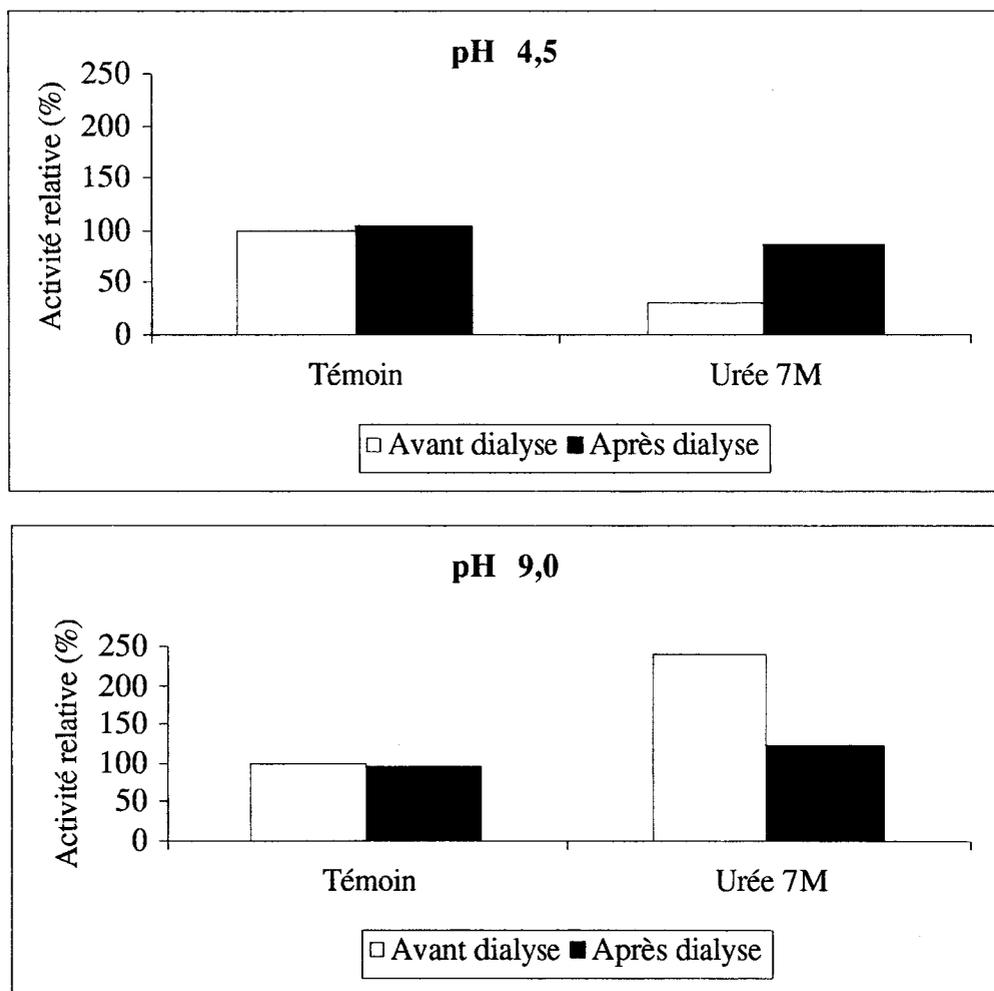


Figure 56 : Influence de la dialyse après addition d'urée à l'extrait enzymatique sur l'activité protéasique de *T. thermophila*.

L'extrait enzymatique, additionné ou non d'urée à la concentration de 7M, subit une dialyse à l'aide d'une cartouche d'ultrafiltration tangentielle de 5000Kda, contre du tampon phosphate de sodium pH 7,0, 10 mM. La durée de dialyse est de 2 heures. Les activités relatives sont exprimées par rapport à l'activité du témoin avant dialyse.

IV.3.1.7.5. Recherche de modifications conformationnelles de l'hémoglobine par le spectre d'émission en fluorescence.

La fluorescence mesurée lors de ces essais est produite par les résidus tryptophane de l'hémoglobine. L'observation des graphiques en figure 57 (page 172) nous conduit à considérer deux aspects : l'addition d'urée a un double effet sur la longueur d'onde du maximum d'émission d'une part, et sur l'intensité d'autre part. L'addition de chlorure de zinc n'a d'effet que sur l'intensité.

En fluorescence il est admis, quand on observe l'environnement des tryptophanes, qu'un glissement des spectres vers les courtes longueurs d'onde est corrélé avec un environnement hydrophobe, que le glissement vers des longueurs d'ondes plus grandes est corrélé avec un environnement hydrophile.

IV.3.1.7.5.1. VARIATION DES SPECTRES D'EMISSION DE FLUORESCENCE EN FONCTION DU pH

Le spectre obtenu à pH 4,5 présente un maximum dans la zone 340-350 nm ; dans le cas du pH 9,0, nous observons un glissement de spectre vers des valeurs comprises entre 350 et 360 nm. La modification de pH entraîne des mouvements de la protéine et le tryptophane de l'hémoglobine se retrouve dans un environnement plus hydrophile, plus favorable à l'action ou à l'interaction de l'enzyme avec le substrat.

IV.3.1.7.5.2. VARIATION DE FLUORESCENCE EN FONCTION DE L'UREE

L'urée sur un système protéique peut jouer deux rôles :

- le premier concerne la modification de l'hydratation de la molécule ;
- le deuxième consiste, de par sa petite taille, à jouer les molécules perturbatrices dans un système réactionnel.

Dans un milieu à pH 4,5, l'addition de l'urée ne modifie pas le spectre de fluorescence ; il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence, ce qui peut se traduire par une meilleure accessibilité du tryptophane dûe à une modification de conformation de la protéine.

Dans le cas d'un milieu à pH 9,0, on observe un glissement de spectre vers de plus faibles longueurs d'onde pour obtenir un spectre identique à celui d'une hémoglobine à pH 4,5 ; il y a peu de variation de l'intensité de fluorescence, celle-ci est pratiquement identique à la valeur obtenue pour un pH 4,5 en urée 8M.

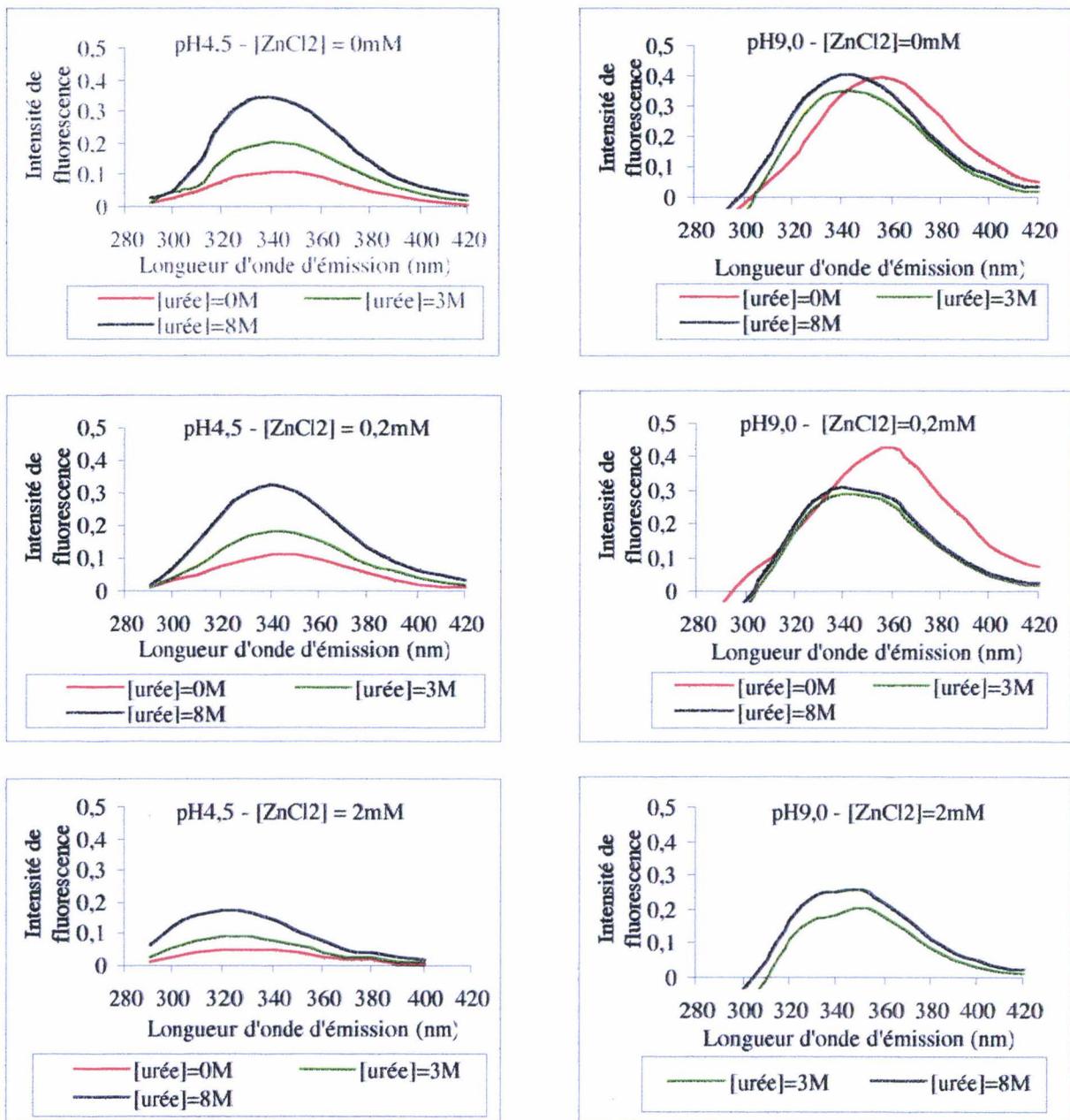


Figure 57 : Spectres de fluorescence du tryptophane de l'hémoglobine native ou additionnée d'urée (3M ou 8M), avec ou sans ZnCl₂ (0,2 mM, 2,0 mM). Excitation à 275 nm.

Le spectre sur hémoglobine à pH 9,0, contenant 2 mM de ZnCl₂ n'a pu être réalisé pour cause de turbidité de l'échantillon.

IV.3.1.7.5.3. VARIATION DE FLUORESCENCE EN PRÉSENCE DE ZINC

Le chlorure de zinc ne modifie pas le maximum d'émission, on note une diminution de l'intensité de fluorescence.

IV.3.1.7.6. Conclusion

Dans le cadre de l'utilisation de l'urée et du zinc sur l'activité protéolytique, nous pouvons donner les explications suivantes :

L'urée est un agent dénaturant dont la réactivité va se faire ressentir à deux niveaux. L'un au niveau du substrat, l'autre au niveau du système enzymatique.

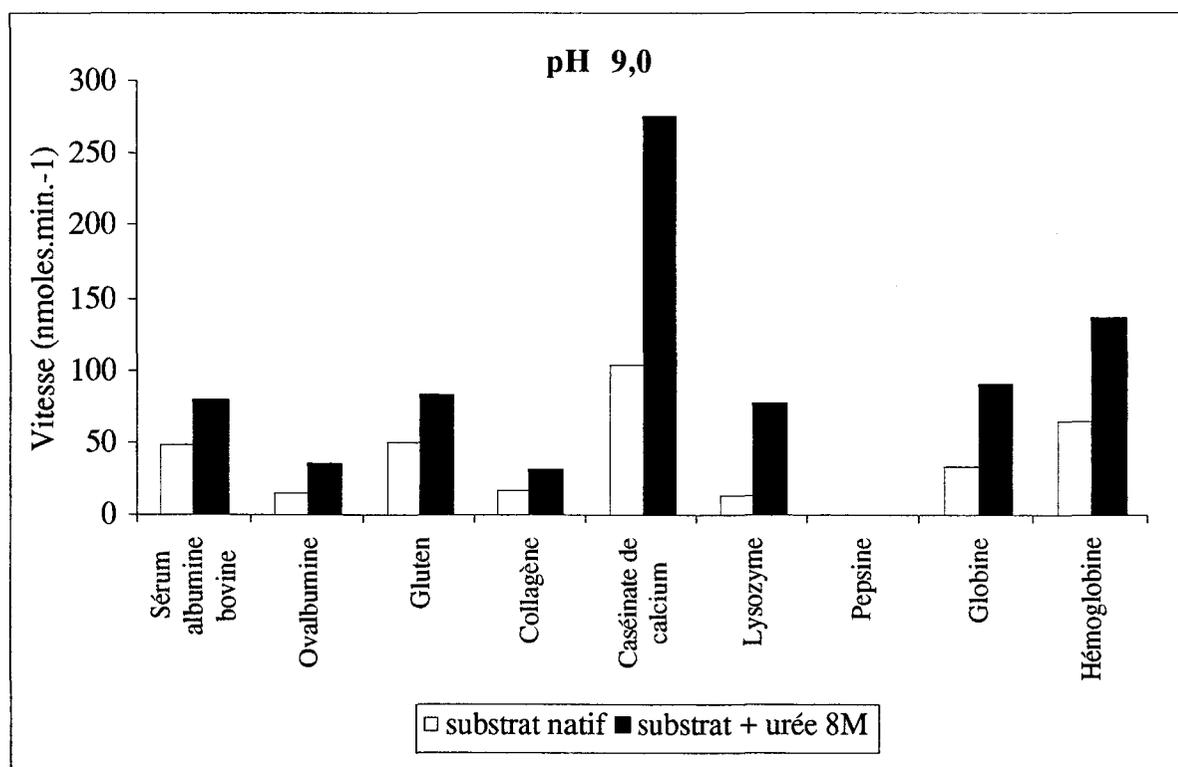
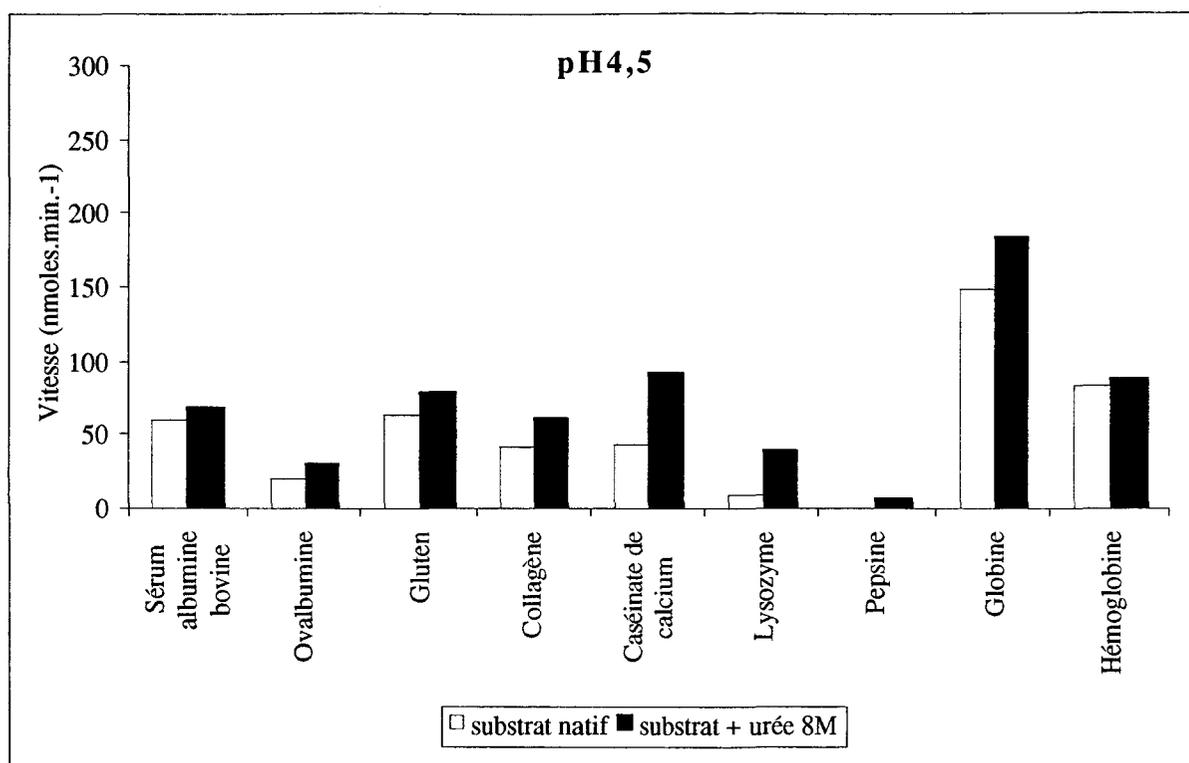
Au niveau du substrat, à pH 9,0, l'urée semble diminuer l'hydrophilie au niveau du tryptophane sans qu'on obtienne de modification de l'enfouissement du tryptophane. Cette perte d'hydrophilie est à rapprocher du comportement de l'enzyme à pH 4,5. L'ionisation globale de l'enzyme à ce pH doit être telle que l'hydratation de la molécule atteint peut être son minimum. Cette baisse d'hydrophilie se répercute sur la réactivité de l'enzyme (k_{cat} plus petit mais K_m plus petit). Dans le cas d'une enzyme à pH 9,0, k_{cat} augmente de même que le K_m . Cela pourrait sous-entendre que l'enzyme va réagir plus facilement avec des parties hydrophobes de la molécule de substrat.

Au niveau de l'enzyme, l'urée va entraîner une dénaturation et une perte de réactivité.

Dans le cadre de l'action du zinc, celle-ci se situe essentiellement au niveau du système enzymatique ; du point de vue de la réactivité, il se comporte comme un antagoniste de l'urée. A pH 9,0, l'action inhibitrice de ce métal est ressentie de façon plus importante qu'à pH 4,5. Là aussi la mise en conformation de l'enzyme est importante. L'effet de l'urée est contrebalancé par la présence de zinc. Pour le moment, nous ne savons pas quels sont les sites sur lesquels se produit l'action de ces effecteurs.

IV.3.2. Etude de la spécificité de substrat

Dans le but de caractériser notre système enzymatique, et en l'absence de connaissances sur son mode de clivage, il nous a paru intéressant de comparer son action aux deux pH optimaux mis en évidence, sur différents substrats, naturels ou synthétiques d'une part, et pour les premiers, différents par leur masse moléculaire, leur conformation et leur composition en acides aminés.



Figures 58 : Etude de la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat. Le témoin est l'hémoglobine traitée par l'urée 3M, substrat habituellement utilisé dans nos expérimentations. La pepsine n'a été étudiée qu'après traitement par l'urée, étant donné sa nature protéasique. Les substrats ont tous été utilisés à la même concentration pondérale de 20g.L⁻¹, et dans les mêmes conditions que l'hémoglobine.

IV.3.2.1. Substrats naturels

Outre l'hémoglobine, les substrats suivants ont été testés :

- la globine : intéressante dans la mesure où le comportement du système enzymatique vis-à-vis de ce substrat peut nous renseigner, par défaut, sur le rôle de l'hème ici absent.
- le lysozyme caractérisé par son pHi élevé (env.11,0)
- la pepsine caractérisée par son faible pHi (env.4,0)
- la serum albumine bovine, caractérisée par sa richesse en ponts disulfure et sa grande solubilité dans l'eau
- l'ovalbumine : c'est une glycoprophosphoprotéine représentant les 2/3 des composés azotés du blanc d'oeuf
- le collagène : constituant majeur du tissu conjonctif et de la matrice protéique du tissu osseux, c'est un sous produit de l'industrie d'écarissage caractérisé par sa richesse en proline (env.20%) et hydroxyproline (5 à 14%). La présence en grande quantité de ces acides aminés entraîne l'absence de structure α ou β . Le collagène est indigestible sous sa forme native par les enzymes du tube digestif humain, et peu soluble dans l'eau.
- le caséinate de calcium : obtenu à partir de la caséine précipitée à pH 4,6, remise à pH 6,5 -7,0 avec du lait de chaux.
- le gluten : c'est l'ensemble de protéines de l'amande de blé, composé de glutéline et de prolamine, toutes deux faiblement solubles dans l'eau. La prolamine est en outre riche en proline comme le collagène.

Il convient de rappeler ici que l'hémoglobine est facile à obtenir des abattoirs à l'état pur et de composition constante car génétiquement déterminée. Comme le caséinate de calcium, c'est donc une protéine dont l'obtention sous forme hautement purifiée est relativement aisée.

Nous avons classé ces substrats dans le tableau 28 (page 176) en fonction de leur masse moléculaire, mais nous avons fait également figurer le pHi pour chacun d'entre eux.

Lors de ces essais, nous avons également testé l'influence d'un traitement préalable de chaque substrat par l'urée 3M, dans les mêmes conditions que l'hémoglobine. Rappelons que l'action de l'urée consiste en un déroulement désordonné de la chaîne peptidique et de ce fait une modification de la conformation spatiale de la protéine, mais nous avons aussi pu observer précédemment, grâce aux spectres d'émission de fluorescence, que l'urée rendait le substrat plus hydrophobe. Les résultats sont présentés sur la figure 58.

Tableau 28 : Masse moléculaire et pHi, des différents substrats utilisés

Substrat	Masse moléculaire	pHi
gluten	10896	8,18
lysozyme	14507	9,10
caséinate	24529	4,98
globine	40000	4,92
pepsine	42750	4,4
hémoglobine	64500	8,19
ovalbumine	42750	5,19
sérum albumine	69293	5,82
collagène	70346	9,25

L'observation conjointe de la figure 58 (page 174) et du tableau 28 ne nous permet pas de mettre en évidence une corrélation systématique entre la vitesse d'hydrolyse des substrats natifs et leur masse moléculaire d'une part, leur pHi d'autre part.

Le traitement par l'urée 3M du substrat est toujours bénéfique à son hydrolyse (tableau 29, page 177), dans des proportions variables, mais contrairement aux conclusions d'Ethuin (1993) concernant l'hémoglobine, le système protéasique dégrade cependant aussi la plupart des substrats natifs. D'autre part, ce traitement par l'urée 3M est en général plus favorable, ce qui corrobore nos hypothèses précédentes liées à l'observation des spectres de fluorescence.

Le collagène, le lysozyme et la pepsine sont les substrats les moins bien utilisés par le système enzymatique ; sans doute faut-il attribuer ce fait à une solubilisation difficile de ces composés, *a fortiori* à l'état natif ; ceci serait à mettre en relation avec la composition en acides aminés de ces protéines ou encore au pH optimal du système enzymatique vis à vis de ces substrats. Après la globine, l'hémoglobine et la sérum albumine bovine, native et traitée par l'urée 3M sont les substrats les mieux hydrolysés.

Le résultat concernant la globine nous semble intéressant dans la mesure où il ne diffère de l'hémoglobine que par l'absence de l'hème, ce qui conduit à faire l'hypothèse que la suppression de celui-ci diminue l'action de l'enzyme tout en conservant les mêmes rapports entre molécule native et dénaturée.

Le tableau 29 (page 177) nous amène à remarquer :

- d'une part une variation du rapport des activités à pH 9,0 et 4,5, comme si celui-ci était influencé par la composition en acides aminés et/ou l'état d'ionisation du substrat.
- d'autre part une variation de l'influence du substrat, plus ou moins bénéfique selon la nature de celui-ci.

Tableau 29 : Etude de la spécificité du système enzymatique vis-à-vis du substrat en système tampon acétate (pH 4,5) ou Tris/HCl (pH 9,0)

Substrat	Rapport des vitesses pH 9,0 /pH 4,5		Rapport des vitesses substrat+ urée/ substrat natif	
	Substrat natif	Substrat + urée 3M	pH 4,5	pH 9,0
globine	0,23	0,49	1,24	2,70
hémoglobine	0,40	0,92	1,05	2,14
gluten	0,79	1,04	1,26	1,64
lysozyme	1,41	1,59	4,50	6,08
caséinate de calcium	2,31	1,51	2,08	2,70
pepsine	ND	0,06	ND	ND
sérum albumine	0,79	1,18	1,15	1,70
ovalbumine	0,71	1,52	1,44	2,40
collagène	0,41	0,48	1,44	1,80

On note toutefois que sur le substrat natif, l'optimum de pH est plus marqué à pH 4,5 qu'à pH 9,0 (100% contre 60%). Ceci avait été observé plus haut de façon plus accentuée (fig.36) avec des systèmes tampons différents.

Le caséinate de calcium donne une interaction moins importante en milieu dénaturant : on peut imaginer à ce niveau, comme les caséinates possèdent très peu de structures organisées, du fait d'une teneur en proline importante, qu'il y a une surdénaturation, avec apparition de structures α et β , plus résistantes à l'action de l'enzyme.

Pour compléter cette étude, il nous a paru intéressant de comparer les produits d'hydrolyse d'un même substrat à pH 4,5 et 9,0 par électrophorèse, afin de savoir s'ils présentaient un profil similaire ou non. Nous avons choisi pour cette expérience la sérum albumine bovine (SAB). L'influence de l'urée a aussi été étudiée afin de déterminer si elle porte sur le substrat ou sur l'enzyme. La figure 59 (page 178) nous montre des profils de digestion assez similaires à pH 4,5 et à pH 9,0 lorsque le système enzymatique est mis en présence d'urée ajoutée à forte concentration (7M) ou plus faible concentration (3M) au substrat : on observe des bandes moins accentuées à pH 4,5 dans le premier cas, et l'inverse dans le second cas.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de résultats concernant ces différents substrats, en dehors de l'hémoglobine traitée par l'urée 3M, mais celle-ci reste le substrat le plus adéquat en termes de rapport qualité/prix.

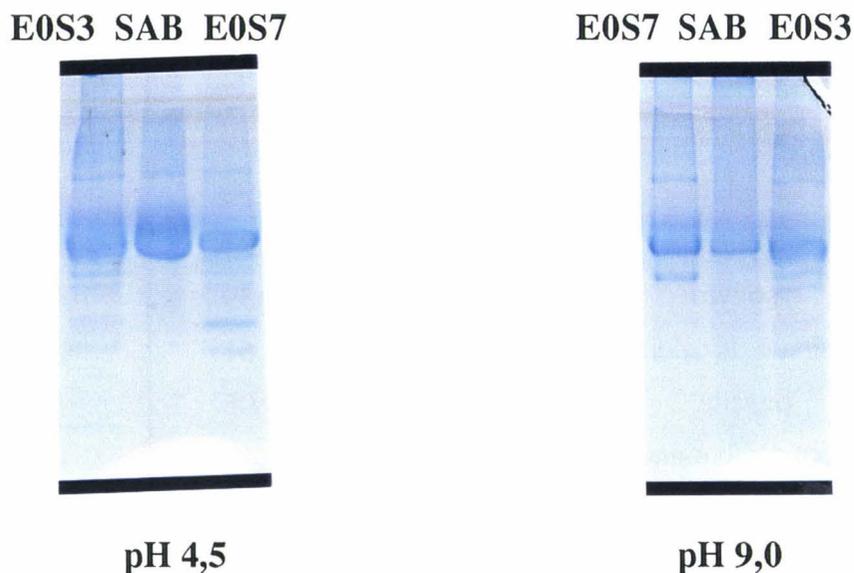


Figure 59 : Profils électrophorétiques de digestion de la sérum albumine bovine par l'extrait enzymatique de *T. thermophila* , à pH 4,5 et pH 9,0.

L'incubation préalable a été réalisée dans les conditions classiques (20 min., 55°C), avec des concentrations en urée dans le substrat variables (0, 3M et 7M). Puis des volumes correspondant à 10µg de protéines ont été déposés.

E0S3 sérum albumine + urée (3M)

E0S7 sérum albumine + urée (7M)

SAB sérum albumine native

Tableau 31 : Proportion du nombre d'acides aminés totaux de chaque substrat en arginine, leucine et phénylalanine.

	lysozyme	collagène	caseine	SAB	ovalbumine	gluten	hémoglobine bovine	globine humaine	pepsine
Arg (%)	10,1	4,9	2,8	4,3	3,9	3,0	2,8	2,1	2,4
Leu (%)	6,2	2,4	10,3	10,7	8,3	8,9	11,1	14,2	8,7
Phe (%)	0,8	1,3	3,7	4,9	5,2	0,0	2,8	5,0	5,2

IV.3.2.2. Substrats synthétiques

Les résultats concernant ces substrats synthétiques (tableau 30) ne sont pas directement comparables à ceux obtenus sur les substrats naturels car on ne mesure pas le même produit d'hydrolyse ; ils permettent d'attribuer l'action peptidasique à une coupure précise (1 seul site de coupure). D'autre part ils nous permettent de déterminer si la spécificité de substrat est fonction de la modification de conformation engendrée par le pH du milieu réactionnel ou du système enzymatique. Dans le cas présent, s'il est impossible d'exclure une modification possible du substrat en fonction du pH ou de la présence d'urée, il est possible d'envisager un action de ces paramètres sur le système enzymatique.

Dans le cas du BAPNA, le traitement par l'urée 3M n'a pas d'effet (pH 4,5) ou un effet positif très marqué sur l'hydrolyse (pH 9,0). D'autre part on remarque ici que le rapport des activités se situe nettement en faveur du pH 9,0, surtout en présence d'urée, ce que nous avons observé sur la figure 52 (page 166), mais il faut rappeler ici que le pH optimum observé sur ce substrat est aux alentours de 7,0, et de 5,0 pour le Pyr-PHE-LEU. L'action de l'urée sur le système enzymatique à pH 9,0 se fait beaucoup plus ressentir qu'avec les substrats naturels pour lesquels la dénaturation qui facilite la protéolyse joue un rôle important comme nous l'avons observé en fluorescence.

Tableau 30 : Etude de la spécificité du système enzymatique vis-à-vis de substrats synthétiques en système tampon acétate (pH 4,5) ou Tris/HCl (pH 9,0)

Substrat	Vitesse (nmoles .min ⁻¹)				Rapport pH 9,0/pH 4,5	
	Substrat natif	Substrat +urée 3M	Substrat natif	Substrat + urée 3M	Substrat natif	Substrat +urée 3M
	pH 4,5		pH 9,0			
BAPNA	17,0	13,6	26,95	212,5	1,59	15,63
PyrPHE-LEUNa	21,84	ND	1,07	ND	0,05	ND

Le tableau 31 nous montre qu'il est difficile d'établir à ce niveau de nos résultats une corrélation entre le taux des résidus d'acides aminés présents dans chacun des substrats étudiés, d'une part, et l'activité du système enzymatique sur les substrats synthétiques testés d'autre part. Un screening plus important de substrats synthétiques serait nécessaire.

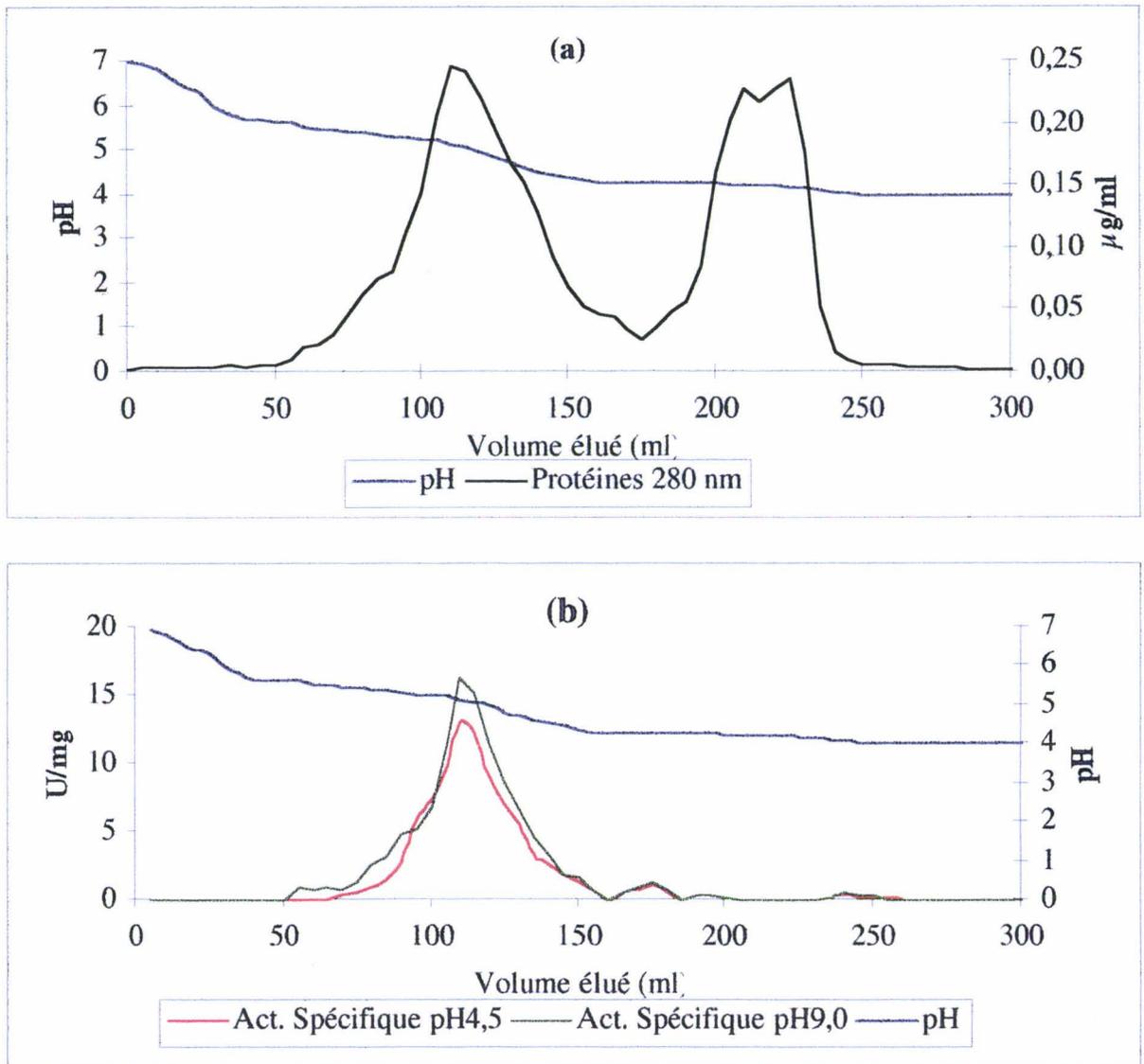


Figure 60 : Profil de chromatofocalisation sur colonne MonoP® HR 5/20 effectué sur un extrait enzymatique de *T. thermophila* : protéines & pH (a), activité spécifique à pH 4,5 et pH 9,0 (b)

La colonne, (0,5* 20 cm) est équilibrée en tampon Bis-Tris 25mM. Le débit est de 30 ml.h-1. L'éluion est effectuée par passage sur @POLYBUFFER 74 (Pharmacia-LKB® Biotechnology) couvrant la zone de pH de 4,0 à 7,0, dilué au 1/10 et ajusté à pH 4,5. Lors de l'éluion, les protéines sont suivies à 280nm, les fractions recueillies de 4 ml. Essai réalisé à partir d'une fraction 150 contenant 4,75 mg de protéines, 17,4U d'activité à pH 4,5 et 20,9 U à pH 9,0.

IV.3.3. Détermination des paramètres physico-chimiques

IV.3.3.1. Masse moléculaire

L'étalonnage de la colonne de gel filtration utilisée plus haut par des témoins nous permet de proposer une seule et même masse moléculaire pour la fraction protéasique qui serait de 32 kDa.

Cette valeur est à rapprocher de celles proposées par Murrucaine (1986) pour une protéase de type cathepsine B de *T. pyriformis* (28000) d'une part, par Suzuki *et al.* (1997, 1998) pour une protéase de type cathepsine L de *T. pyriformis* également (28000) d'autre part.

IV.3.1.2. Point isoélectrique

Il s'agissait de savoir si l'on pouvait obtenir deux entités différentes du point de vue du pHi. Celui-ci a été déterminé par chromatofocalisation sur colonne MonoP®.

Les dosages des protéines et celui de la tyrosine libérée par les protéases n'ont pu être réalisés qu'à 280 nm, du fait des interférences entre l'ampholyte et le réactif, l'ampholyte ne semblant pas cependant altérer l'activité protéasique. Bien que les ampholytes soient des polypeptides, aucune interaction n'a été observée entre l'ampholyte et les activités protéasiques lors d'essais réalisés en l'absence de séparation. Le profil d'élution (figure 61) révèle deux pic superposés correspondants aux deux activités, ainsi qu'un pic de protéines dépourvu d'activité.

Les rendements globaux et facteurs de purification sont satisfaisants et le rapport des deux activités est stable ($\text{pH}9/\text{pH}4,5 = 1,26$).

Le pic d'activité se situe au pH 5,12 valeur que l'on peut rapprocher de celle trouvée lors d'un essai en focalisation isoélectrique sur Rotofor® (pHi de 5,2), essai qui n'avait pas cependant permis de distinguer nettement un ou plusieurs pics.

Nous ne disposons pas dans la littérature de données concernant le pHi de protéases de *Tetrahymena* isolées et purifiées, mais la valeur ici obtenue est comparable à ce qui a été trouvé pour des cystéines protéases d'autres origines, notamment pour la cathepsine B du rat pour laquelle est proposée une fourchette de pHi comprise entre 4,0 et 5,0 (Lushbaugh *et al.*, 1985).

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tetrahymena thermophila BIII s'adapte bien à des conditions de culture identiques à celles des bactéries, dans des conditions industrielles et sur des milieux simples à préparer. Ceci est d'autant plus important que l'une des raisons de l'absence d'une optique industrielle jusqu'à une époque récente était probablement liée au coût élevé des milieux de culture, problème ici largement résolu. Si l'on s'en tient au milieu MYE par exemple, largement utilisé dans nos manipulations, le faible prix des ingrédients entrant dans sa composition permet d'obtenir un prix de revient quatre fois moins élevé que le milieu semi-synthétique PPYS (cf Annexe C)

Lors de l'analyse bibliographique, nous avons cerné un certain nombre d'éléments indispensables. Nous avons pu suivre la progression de certains d'entre eux au cours de fermentations, tels que le pH, l'oxygène dissous, les protéines, et les courbes de chacun de ces paramètres suivent assez fidèlement celle de la croissance : elles sont linéaires pendant la phase exponentielle de croissance puis s'infléchissent quand la multiplication cellulaire ralentit.

Nous avons pu observer que le comportement de *Tetrahymena* en culture, est fondamentalement comparable à celui des autres microorganismes (levures, bactéries,...) chez lesquels le substrat et l'O₂ dissous constituent, dans des conditions de pH optimum, les facteurs limitatifs de la croissance. Les fermentations ont montré que *Tetrahymena* est très exigeant en O₂ : ce besoin est lié à la croissance. La production en masse de *Tetrahymena thermophila* peut être améliorée en jouant sur le couple aération/agitation, dont dépend directement l'oxygénation, et la biomasse peut être maintenue en phase plateau plus longtemps si l'on procède à un maintien du pH initial grâce à une régulation. Par contre une régulation de l'apport en O₂ s'avère difficile car nécessitant rapidement une augmentation de l'agitation au delà de ce qui est supportable par les cellules.

La composition du milieu influe sur la croissance et la production enzymatique ; selon le type d'activité enzymatique recherchée, nous avons vu qu'il est possible de s'orienter sur un milieu plutôt qu'un autre. Production protéasique et de biomasse peuvent être réalisées en continu avec couplage à une membrane de microfiltration. Mais la conduite de la fermentation devra se faire avec le choix défini d'un objectif : production d'enzymes ou bien privilégier le maintien d'une biomasse en bon état.

Ces considérations nous amènent à choisir un des deux objectifs suivants pour la culture de *Tetrahymena*, qui nous guidera dans la définition de conditions pour une fermentation type, à savoir la production de biomasse ou bien la production enzymatique, ici plus spécialement protéasique.

Dans le cas d'une culture ayant pour objectif la seule production de biomasse, temps de génération et population maximale seront les seuls critères d'appréciation de la conduite des opérations, notamment pour le choix du couple agitation/aération. Dans les conditions de nos expérimentations, nous avons pu définir deux couples adaptés à la production de biomasse :

- 200 tours/min. et 60 litres d'air/heure pour favoriser une population maximale élevée ;
- 400 tours/min. et 30 litres d'air/heure pour favoriser un temps de génération faible.

Le milieu de culture le plus adapté tant au niveau économique que pour ses performances sera celui à base de lait écrémé et d'extrait de levure (MYE). Une régulation du pH du milieu à 6,8 permettra de retarder la lyse des cellules, mais si elle contrecarre l'effet pH lié à la consommation des nutriments, elle ne peut empêcher l'accumulation de métabolites inhibiteurs de la croissance, facteur limitant de la croissance de *Tetrahymena* dans une culture en batch. Cet inconvénient plaide pour l'installation d'un système de culture en continu qui permet de s'affranchir de la lyse des cellules sur une plus grande durée et d'éviter ainsi la libération de grandes quantités d'enzymes.

Dans le cas d'une culture ayant pour objectif la production enzymatique, le choix du milieu se fera selon le type d'enzyme recherché, sachant qu'un milieu MYE ou YEP (extrait de levure et solubles de pomme de terre) favorise une production d'activité protéasique, alors qu'un milieu YEG (extrait de levure et glucose) ou YEX (extrait de levure et @Glucidex) favorise une production d'activité glycosidasique. Le couple agitation/aération adapté à cet objectif sera le suivant, toujours d'après nos conditions expérimentales : 300 tours/min. et 90 litres d'air/heure.

Deux cas de figure sont possibles dans le cas d'une production enzymatique :

- si on recherche une production massive d'enzymes, on pourra se contenter d'un système en batch dans lequel les enzymes sont produites par lyse cellulaire en fin de culture associée à l'excrétion de certaines activités en croissance exponentielle.
- si on préfère stabiliser une excrétion en cours de croissance exponentielle, on utilisera un système de culture en continu comme pour la production de biomasse. La production des enzymes sera toutefois moindre qu'en batch.

Dans les deux cas de figure, il faut prévoir l'emploi d'un dispositif d'ultrafiltration afin de concentrer le surnageant de culture.

L'ensemble des travaux réalisés dans la littérature et nos résultats montrent donc que *Tetrahymena* se prête avec succès aux différentes techniques de culture offertes par la biotechnologie (fermentation classique, culture en continu avec microfiltration, encapsulation...). Mais la microfiltration reste certainement la méthode à développer pour sa simplicité, et ce d'autant que nous savons désormais pratiquer une régulation de pH et déterminer statistiquement les meilleures conditions de culture (aération, agitation...).

Il reste à modéliser la croissance de *Tetrahymena* et les différents paramètres qui l'influencent. Récemment, l'Unité de Microbiologie a développé l'utilisation des plans d'expériences pour le choix des facteurs influençant la croissance et la production enzymatique de *Tetrahymena* (De Coninck *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus laissent espérer une amélioration sensible des conduites de fermentation. La diminution du temps de génération et l'augmentation des populations maximales devraient autoriser la production industrielle de *Tetrahymena*. Les moyens mis en oeuvre se situant à l'interface laboratoire de recherche/milieu industriel, il s'agit de démontrer la faisabilité de la production de ce protozoaire à l'échelle industrielle. En ce sens, une confirmation de l'étude réalisée sur fermenteur pilote (20L), puis 100L sera une étape décisive pour envisager le passage au stade industriel.

En ce qui concerne la caractérisation des activités protéasiques, ayant observé l'existence de deux optima de pH (pH 4,5 et pH 9,0) de l'activité protéasique sur l'hémoglobine traitée par l'urée 3M, la recherche du pH optimum sur d'autres substrats naturels et synthétiques (traités ou non par l'urée 3M) nous a permis d'établir, une « plage » allant de pH 3,5 à pH 9,0, selon la nature de ces substrats, certains d'entre eux ne présentant d'ailleurs qu'un seul optimum (cas du lysozyme et de la pepsine). Bien que l'existence de deux optima sur le substrat synthétique BAPNA laisse penser que le pH du milieu réactionnel influe aussi sur la réactivité de l'enzyme, ces résultats confortent l'hypothèse en faveur d'une action du pH sur le seul substrat quelle que soit sa nature.

L'examen d'autres paramètres enzymatiques pH 4,5 et 9,0 nous a montré pour ce dernier :

- une température optimale légèrement supérieure ;

- une vitesse maximale supérieure de 50%, tant sur hémoglobine que sur BAPNA ; par contre un Km supérieur de 37 % sur BAPNA, mais comparable à celui obtenu à pH 4,5 si l'on prend l'hémoglobine.

- l'action inhibitrice totale du zinc sur cette activité alors que son effet est inexistant à faible concentration, à pH 4,5 ;

- l'absence d'action inhibitrice de l'urée ajoutée à de fortes concentrations, contrairement à ce qui se passe à pH 4,5

Toutes ces observations laissent penser que nous étions en présence de deux entités moléculaires différentes.

D'autres résultats en revanche plaident pour une seule entité enzymatique possédant deux optima d'activité :

- le rapport des deux activités, pouvant être considéré comme constant, à 1,0-1,5 sur substrats naturels traités par l'urée 3M, au bénéfice de celle à pH 9,0, et ce pour l'ensemble des expérimentations ;

- l'impossibilité de séparer deux entités moléculaires par les techniques de purification (précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'adsorption non spécifique, gel filtration)

- le comportement cystéine-protéases pour les deux activités vis-à-vis des inhibiteurs spécifiques, en l'occurrence le E64, la chymostatine et l'acide iodo-acétique, bien que ce dernier se montre moins puissant ; une étude plus détaillée sur l'inhibition par le E64, nous a par la suite permis de conclure à un phénomène non compétitif ;

- les comportements similaires en électrophorèse non dénaturante suivie d'une lyse de gélatine

- l'influence variable de l'urée, ajoutée à différents substrats à la concentration de 3M, sur la vitesse d'hydrolyse, suggérant que ce composé agit sur le substrat et non sur l'enzyme.

Cette dernière hypothèse a été renforcée par les résultats de l'étude de l'hémoglobine en fluorescence, montrant le rôle déterminant du pH sur la conformation du substrat, l'influence de l'urée sur l'évolution du substrat vers un comportement hydrophobe, et le caractère de « perturbateur » du zinc ajouté au substrat. Une expérience de dichroïsme circulaire sur hémoglobine en présence d'urée nous donnerait encore plus d'argument sur le rôle de ce composé dans la conformation et le comportement du substrat (provocation d'un dépliement de la molécule par exemple).

Partant de cette hypothèse, si l'on reprend la vitesse maximale évoquée plus haut, supérieure de près 50% à pH 9,0, tant sur hémoglobine que sur BAPNA, il est possible de l'expliquer par une meilleure réactivité du système enzymatique à ce pH, dans l'hypothèse où nous n'aurions qu'une seule entité moléculaire, d'autant plus que les K_m sont tout à fait comparables sur hémoglobine.

Concernant la spécificité de substrat du système enzymatique, il est difficile de conclure car on ne connaît pas les sites de coupure, si ce n'est au niveau de la leucine et de l'arginine (contenus dans les substrats synthétiques). Une étude du système enzymatique sur les substrats naturels utilisés dans nos travaux, à un stade de purification plus avancé serait nécessaire. D'autre part, des essais sur différents substrats peptidiques fluorogéniques pourraient nous apporter dans une première étape des informations sur son caractère endo ou exopeptidasique ; une seconde étape permettrait d'identifier une certaine spécificité de clivage d'un acide aminé donné (amino ou carboxypeptidase dans le premier cas) ; cela peut parfois donner la famille d'appartenance de l'enzyme et donc des informations possibles sur les protéines-substrats potentiels. Toutefois, une même enzyme peut cliver, selon sa spécificité, en plusieurs sites différents. Ce titre, l'étude de la réactivité sur la chaîne B de l'insuline pourrait être intéressante.

Notre travail montre qu'il existe une nouvelle voie de production d'enzymes, peu explorée jusqu'à présent. La possibilité d'agrandir l'échelle de culture ayant été démontrée, les recherches menées au sein de l'Unité de Microbiologie de l'ISA devront s'orienter vers la purification et la caractérisation totale du système protéasique étudié. Elles devront successivement :

- comparer l'activité protéolytique produite avec ce qui existe actuellement ;
- s'assurer que ces enzymes sont compatibles avec les procédés industriels de transformation
- et comparer leur réactivité aux enzymes bactériennes ou fongiques habituellement utilisées avant d'envisager une production à l'échelle industrielle ou semi-industrielle, basée sur les différentes mises au points réalisées dans les trois premières parties de ce travail. Le caractère GRAS de *Tetrahymena* ajouté au fait que ce protozoaire ne secrète que des protéines glycosylées analogues à celles des cellules de mammifères (à la différence des bactéries et des levures) lui promet un bel avenir. Il faudra déterminer si le système a une activité large (comme dans le cas des bactéries) ou au contraire une activité restreinte. Ce second cas de figure pourrait constituer le véritable intérêt des protéases de *Tetrahymena*, dans la mesure où elles seraient capables d'assurer des réactions impossibles pour les enzymes bactériennes, ce qui leur assurerait une haute valeur ajoutée.

En effet, la valeur technologique des protéases de *Tetrahymena* va reposer sur les aspects innovants de ses potentialités, comme par exemple :

- que leur spécificité d'hydrolyse permette l'obtention de peptides d'activité biologique impossible à avoir avec des protéases d'origine fongique ou bactérienne.
- qu'elles possèdent une activité de transfert permettant la formation de peptides particuliers (équivalents de certaines lipases permettant des réactions d'interestérification).
- que l'on puisse réaliser le clonage de gènes pour l'obtention de molécules intéressantes glycosylées.

Outre la production de protéases, l'Unité de Microbiologie de l'ISA s'intéresse depuis peu à la production de lipases par *T. thermophila* : l'influence de la composition du milieu (MYE modifié) ainsi que des paramètres physico-chimiques de culture sont en cours d'étude (Portois *et al.*, 1999 ; Portois *et al.*, 2000). Enfin, des métabolites composantes de l'horloge biologique, présents chez la plupart des eucaryotes, ont été mises récemment en évidence : la mélatonine et la sérotonine ont de plus un impact sur la production de métabolites. Ceci fait l'objet également d'un thème de recherche au Laboratoire (Leclercq *et al.*, 1998).

Nous avons pu mettre en évidence l'origine intracellulaire de l'activité protéasique, tout en observant une activité extracellulaire lors des cinétiques de fermentation dont nous ne pouvons être certains qu'elle ne provienne d'une lyse cellulaire, même en phase exponentielle ; il reste à s'intéresser de plus près à la localisation cellulaire (lysosomes, membranes) et aux mécanismes d'excrétion des métabolites. Concernant l'activité protéasique en particulier, il faudra isoler les formes intracellulaires, membranaires et extracellulaires de ce système enzymatique, puisque, comme nous l'avons lu dans la littérature, il s'agit d'un seul et même système enzymatique remanié avant excrétion : Que se passe-t-il avant et pendant l'excrétion ?

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALAM M.D.S., NAKASHIMA S., DEYASHIKI Y., BANNO Y., HARA A., NOZAWA Y. 1996.
Molecular cloning of a gene encoding acid α -glucosidase from *Tetrahymena pyriformis*.
J. Eukaryotic Microbiol., 43(4) : 295-303.
2. ALBANI J.R. 1987.
Etude par fluorescence de la dynamique d'hémoprotéines monomériques.
Thèse d'Etat d'Université, Univ. Paris VII.
3. ALLEN S.L. 1967.
Cytogenetics of genomic exclusion in *Tetrahymena*.
Genetics, (55) : 797-822.
4. ANDERSON T.R., ROBBINS D.J., ERBERSDOBLER H.F. 1984.
The stimulation and inhibition of *Tetrahymena pyriformis* W cultures by Maillard-damaged soya-protein samples and the usefulness of this organism for lysine availability determinations.
Food review, 11(1) : 77.
5. AYERBE A. 1980.
Protozoa *Tetrahymena pyriformis* as single-cell protein : fermentation and nutritional aspects.
Enzyme Microb. Technol., 2(1) : 54-58.
6. BAMBAD M., DAVID L., GROLIERE C.A., DUPY-BLANC J., CUER A., TABEL J.C. 1992.
Bioconversion de la nigéricine, antibiotique ionophore, par *Tetrahymena pyriformis* GL.
Détoxification du milieu : transformation de la nigéricine en épiginéricine.
in XXXI^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française.
7. BAMDAD M., BOUSSEAU P., DENIZEAU F. 1999.
Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis* : Evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates.
FEBS Lett., 456(3) : 389-93.
8. BANNO Y., YANO K., NOZAWA Y. 1982.
Biochemical characterization of secreted proteases during growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-14 : Comparison of extracellular with intracellular proteases.
J. Protozool., 29(1) : 91-98.
9. BANNO Y., NOZAWA Y. 1982.
Changes in particulate-bound protease activity during cold acclimation in *Tetrahymena pyriformis*.
Biochim. Biophys. Acta, 719(1) : 74-80.

10. BANNO Y., YANO K., NOZAWA Y. 1983.
Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*.
Eur. J. Biochem., 132 : 563-568.
11. BANNO Y., NOZAWA Y. 1985.
Purification and characterization of lysosomal α -glucosidase secreted by eukaryote *Tetrahymena*.
J. Biochem., (97) : 409-418.
12. BANNO Y., SASAKI N., NOZAWA Y. 1987.
Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in *Tetrahymena pyriformis*.
Exptl Cell Res., (170) : 259-268.
13. BANNO Y., SASAKI N., YOSHINO T., MOCHIZUKI J., HIRATE H., NOZAWA Y. 1989.
A thermostable acid α -glucosidase from *Tetrahymena thermophila* : purification and characterization.
J. Protozool., 36 : 562-567.
14. BANNO Y., OKANO Y., FURUKAWA K., TIEDTKE A., KOBATA A., NOZAWA Y. 1993.
Processing and secretion of lysosomal acid α -glucosidase in *Tetrahymena* wild type and secretion-deficient mutant cells.
J. Euk. Microbiol., 40(4) : 515-520.
15. BARRET A.J. 1972.
A new assay for Cathepsin B1 and other thiol proteinases.
Anal. Biochem., (47) : 280-293.
16. BARTH B., ETHUIN P., BOUQUELET S., DUMORTIER V., DE CONINCK J. 1993.
Production enzymatique chez *Tetrahymena thermophila* - Influence de la mutation vac- et influence du milieu de culture.
in XXXII^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, 20-23 Mai 1993. La Grande Motte: J. of Euk. Microbiol.
17. BENCSATH M., DARVAS Z., CSABA G. 1993.
Secretory response of *Tetrahymena* to insulin : the influence of electric pulses.
Microbios, 78(314) : 27-33.
18. BENITEZ L., MARTIN-GONZALES A., GILARDI P., SOTO T., RODRIGUEZ DE LECEA J., GUTIERREZ J.C. 1994.
The ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* as a biosensor to detect mycotoxins.
Lett. Appl. Microbiol., 19(6) : 489-491.
19. BERLINE J.W., ANTIPA G.A. 1982.
The effect of mass transfert of oxygen of chemostat cultures of *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., (29) : 479.

20. BEYNON R.J. , BOND J.S. 1989.
Proteolytic enzymes, a practical approach. .
Oxford University Press ed. Oxford, England: IRL Press.
21. BIJL J.P., ROUSSEAU D.M., DIVE D.G. , VAN PETEGHEM C.H. 1988.
Potentials of a synchronized culture of *Tetrahymena pyriformis* for toxicity studies of mycotoxins.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71(2) : 282-285.
22. BLUM J.J., GREENSIDE H. 1976.
Particle ejection from the cytoproct of *Tetrahymena*.
J. Protozool., 23(4) : 500-502.
23. BLUM J.J. 1976.
Lysosomal hydrolase secretion by *Tetrahymena* : a comparison of several intralysosomal enzymes with the isoenzymes released into the medium.
J. Cell Physiol., 89 : 457-472.
24. BRADFORD M. 1976.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding.
Anal. Biochem., (72) : 248-254.
25. CAILLERET-ETHUIN P., DUyme F., TONON F., JEANFILS J., DE CONINCK J. 1998.
Optimization of *Tetrahymena rostrata* growth using food by-products as nitrogen source.
Biotechnol. Techn., 12(7) : 177-181.
26. CASTRODAD F.A., RENAUD F.L., ORTIZ J., PHILLIPS D.M. 1988.
Biogenic amines stimulate regeneration of cilia in *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., 35(2) : 260-264.
27. CECH T. 1988.
Ribozymes and their medical implications.
JAMA, 260(20) : 3030-3034.
28. CHENG-KANG L., WE-GWO C., YI-HSU J. 1993.
Air slugs entrapped cross-flow filtration of bacterial suspensions.
Biotechnol. and Bioeng., 41(5) : 525-530.
29. CHRISTENSEN S.T., SCHOUSBOE P., GHILADI M., RASMUSSEN L. 1992.
Nutritional stress in *Tetrahymena* relieved by addition of hemin or phospholipids.
J. Comp. Physiol. B., 162(107-110).
30. CHRISTENSEN S.T., SCHOUSBOE P., NIELSEN D., SONDERGAARD G., RASMUSSEN L. 1993.
Cell multiplication in *Tetrahymena setosa* and *Tetrahymena thermophila* in synthetic nutrient medium. Effects of ethanol, cholesterol and extracellular medium.
Acta Protoz., 32 : 151-156.

31. CHRISTENSEN S.T., WEATLEY, D.N., RASMUSSEN M.I., RASMUSSEN L. 1994.
Signals required for survival and proliferation : kinetics of cell multiplication and death of *Tetrahymena pyriformis* in a nutritionally complete, synthetic medium.
FEMS Microbiol. Lett., 123(1-2) : 33-6.
32. CHRISTENSEN S.T., WHEATLEY D.N., RASMUSSEN M.I., RASMUSSEN L. 1995.
Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*.
Cell Death and Differentiation, 2 : 301-308.
33. CHRISTENSEN S.T., QUIE H., KEMP K., RASMUSSEN L. 1996.
Insulin produces a biphasic response in *Tetrahymena thermophila* by stimulating cell survival and activating proliferation in two separate concentration intervals.
Cell Biol. Inter., 20(6) : 437-444.
34. CONNER R.L., STEWART B.Y. 1976.
The effect of temperature on the fatty acid composition of *Tetrahymena pyriformis* WH-14.
J. Protozool., 23(1) : 193-196.
35. CORLISS J.O. 1953.
Comparative Studies on Holotrichous Ciliates in the *Colpidium - Glaucoma - Leucophrys - Tetrahymena* Group. II. Morphology, Lifecycles and Systematic Status of Strains in pure culture.
Parasitology, (43) : 49-87.
36. CSABA G., NEMETH G., PROHASZKA J. 1979.
Effect of hormones and related compounds on the multiplication of *Tetrahymena*.
Exp.Cell Biol., 47(4) : 307-311.
37. CSABA G., CSERHALMI M. 1985.
Influence of biogenic amines histamine serotonin on the function of the lysosomal enzymes of the *Tetrahymena*.
Acta Protozool., 24(2) : 135-138.
38. DAGNELIE P. 1975.
Théorie et méthodes statistiques. .
Vol. 2., Les presses agronomiques de Gembloux. 463 pages.
39. DE CONINCK J., CAILLIET-ETHUIN P., DUyme F., JEANFILS J., LECLERCQ B. 1998.
Application des plans d'expériences au choix des facteurs influençant la culture de *Tetrahymena* et à leur optimisation.
in XXXVII^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, Tunis, Mai 1998.

40. DE CONINCK J., BOUQUELET S., DUMORTIER V., DUYME F., VERDIER-DENANTES I. 2000.
Industrial media and fermentation processes for improvement growth and proteases production by *Tetrahymena thermophila* BIII.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., (24) : 285-290.
41. DE JESUS S., RENAUD F.L. 1989.
Phagocytosis in *Tetrahymena thermophila* : naloxone-reversible inhibition by opiates.
Comp. Biochem. Physiol., (92C) : 139-42.
42. DE PUYTORAC P., GRAIN J., MIGNOT J.P. 1987.
Précis de Protistologie. .
Fondation Singer-Polignac. Société Nouvelle des Editions Boubée.
43. DHULSTER P., BARBOTIN J.N., THOMAS D. 1984.
Culture and bioconversion use of plasmid-herboring strain of immobilized *E. coli*.
Appl. Microbiol. Biotechnol., (20) : 87-93.
44. DICKIE N., LIENER I.E. 1962a.
A study of the proteolytic system on *Tetrahymena pyriformis* W. I. Purification and partial characterization of the constituent proteinases.
Biochim. Biophys. Acta, 64 : 41-51.
45. DICKIE N., LIENER I.E. 1962b.
A study on the proteolytic system of *Tetrahymena pyriformis* W. II. Substrate specificity of the constituent proteinases.
Biochim. Biophys. acta, 64 : 52-59.
46. DIVE D., TONON F., TRINEL P.A., OCHIN D. 1986.
La culture axénique de *Tetrahymena pyriformis* : Etude de quelques produits de base utilisables pour des milieux de culture destinés à la recherche.
Protistologica, XXII(3) : 271-277.
47. DIVE D., PIOT J.M., SANNIER F., GUILLOCHON D., CHARET P., LUTRAT S. 1989.
Use of hemoglobin enzyme hydrolysates, prepared on a pilot-plant scale, as a nitrogen source for the cultivation of *Tetrahymena*.
Enzyme Microb. Technol., (11) : 165-9.
48. DOMAKYAARA Z. , ISHIZAKI A. 1997.
Continuous culture systems involving *Zymomonas mobilis* and a hollow fiber filter module.
Biotechnol. Techniques, 11(8) : 537-41.
49. DUNHAM E.E., McARDLE E.W. 1982.
Effect of media on heavy metal toxicity in *Tetrahymena pyriformis* W.
in 34th Ann. Meet. of the Soc. Protozoologists. . Dallas, Tex., USA: Journal of Protozoology, 29(2),287.

50. ELLIOTT A.M. , CLEMMONS G.L. 1966.
An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*.
J. Protozool., 13(2) : 311-323.
51. ELLIOTT A.M. 1973.
Biology of *Tetrahymena*.
Dowden, Hutchinson & Ross Inc. 508 pages.
52. ENDOH H. 1994.
Transformation of ciliates with a circular plasmid derived from an overamplified macronuclear DNA of *Stylonychia lemnae*.
Jap. J. Gen., 69(4) :
53. ETHUIN P. 1989.
Contribution à la culture de protozoaires ciliés.,
DEA, Université Technologique de Compiègne.
54. ETHUIN P., DE CONINCK J., DHULSTER P., GUILLOCHON D. 1992.
Mass cultivation of a *Tetrahymena* mutant (vac-) : determination of a practical and efficient medium for biomass and protease industrial production.
in XXXI^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française
55. ETHUIN P. 1993.
Culture en masse de *Tetrahymena* : Etude de milieux industriels et application à la culture en fermenteur du mutant thermodépendant *Tetrahymena thermophila* SJ180.,
Thèse de Doctorat en Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie. Thèse Université Technologique de Compiègne.
56. EVANS E., WITTY R. 1979.
Effects of excesses of individual essential amino acids on the growth of *Tetrahymena pyriformis* W.
Nutr. Report Int., 19(4) : 507-513.
57. EVANS E. 1979.
Alteration of compositions of nutrient media on the growth of *Tetrahymena pyriformis*. II. Vitamins.
Nutr. Report Int., 20(2) : 131-5.
58. EVANS E., WITTY R. 1980.
Use of *Tetrahymena pyriformis* to determine the quality of food proteins : a review.
Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 13(2) : 50-55.
59. FILIPPOVA I.Y., LYSOGORSKAYA E.N., OKSENOIT E.S., RUDENSKAYA G.N. , STEPANOV V.M. 1984.
L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-*p*-nitroanilide - A chromogenic substrate for thiol proteinase assay.
Anal. Biochem., (143) : 293-297.



60. FLORIN-CHRISTENSEN J., FLORIN-CHRISTENSEN M., TIEDTKE A., RASMUSSEN L. 1990.
The role of secreted acid hydrolases in the utilization of complex nutrients by *Tetrahymena*.
Microb. Ecol., 19 : 311-316.
61. FLORIN-CHRISTENSEN J., FLORIN-CHRISTENSEN M., KNUDSEN J., RASMUSSEN L. 1985.
Cytolytic activity released from *Tetrahymena*.
J. Protozool., 32(4) : 657-660.
62. FLORIN-CHRISTENSEN J., FLORIN CHRISTENSEN M., KNUDSEN J., RASMUSSEN L. 1986.
Phospholipases and phospholipids in a ciliate : an attack and defence system?
TIBS, 11(9) : 354-355.
63. FLORIN-CHRISTENSEN M., FLORIN-CHRISTENSEN J., TIEDKE A., RASMUSSEN L. 1989.
New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eucaryotes.
Eur. J. Cell Biol., 48 : 1-4.
64. FOLIN O., CIOCALTEU V. 1927.
On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.
J. Biol. Chem., 73(2) : 637-650.
65. FURGASON W.H. 1940.
The significant cytosomal pattern of the "*Glaucoma-Colpidium* group" and a proposed new genus and species, *Tetrahymena gelei*.
Arch. Protistenk., (94) : 224-266.
66. GABEL C., GOLDBERG D., KORNFELD S. 1983.
Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor : Evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 775-779.
67. GAERTIG J., GOROVSKY M.A. 1993.
Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 9196-9200.
68. GIULIAN G.G., GRAHAM J.M. , DETTINGER W.J. 1982.
New techniques for low cost mass cultivation and harvesting of protozoa.
in 34th Ann. Meet. of the Soc. Protozool., Dec. 27-30. Dallas, Tex., USA.
69. GOSSELIN Y., LOGNAY G., THONART P. 1989.
Improvement of fed batch mass culture for γ -linolenic biosynthesis by *Tetrahymena rostrata* (protozoa).
Biotechnol. Letters, 11(6) : 423-426.

70. GROLIERE C.A., DENIER D., DUPY-BLANC J., BAMDAD M. 1992.
 Mise en évidence de la toxicité du chloprophame (CICP) avec le cilié *Tetrahymena pyriformis*.
 in Communication au Congrès Européen de Protistologie. XXXI^e Réunion Annuelle du
 Groupement des Protistologues de Langue Française. .
71. GROOT W.J., SIKKENK C.M., WALDRAM R.H., VAN DER LANS R.G.J.M.,
 LUYBEN K.C.A.M. 1993.
 Kinetics of ethanol production by baker's yeast in an integrated process of fermentation and
 microfiltration.
 Bioprocess Engineer., 8(1-2) : 39-47.
72. GROOT W.J., KRAAYENBRINK M.R., VAN DER LANS R.G.J.M., LUYBEN
 K.C.A.M. 1993.
 Ethanol production in an integrated fermentation/membrane system. Process simulations and
 economics.
 Bioprocess Engineer., 8(5-6) : 189-201.
73. HAGEMEISTER J.J., GRAVE M., KRISTIENSEN T.B., ASSAAD F., HELLUNG-
 LARSEN P. 1999.
 Interface-mediated death of unconditioned *Tetrahymena* cells : effect of the medium
 composition.
 J. Eukaryot. Microbiol., 46(1) : 6-11.
74. HELLENBROICH D., VALLEY U., RYLL T., WAGNER R., TEKKANAT N.,
 KESSLER W., ROB A., DECKWER W.D. 1999.
 Cultivation of *Tetrahymena* in a 1,5 m³ airlift bioreactor.
 Appl. Microbiol. Biotechnol., (51) : 447-455.
75. HELLUNG-LARSEN P. 1988.
 Parameters affecting the maximum cell concentration of *Tetrahymena*.
 Experientia, 44 : 58-60.
76. HELLUNG-LARSEN P., LYHNE I. 1992.
 Effect of shaking on the growth of diluted cultures of *Tetrahymena*.
 J. Protozool., 39(2) : 345-349.
77. HERSCHLAG D., CECH T.R. 1990.
 DNA cleavage catalysed by the ribozyme from *Tetrahymena*.
 Nature, 344(6265) : 405-409.
78. HILL D.L. 1972.
 The Biochemistry and Physiology of *Tetrahymena*.
 Academic Press, N.Y. 230 pages.
79. HOFFMANN E., CLEFFMAN G. 1981.
 External factors limiting the multiplication potential of *Tetrahymena*.
 J. Cell. Sci., (50) : 407-18.

80. HOFFMANN E.K., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. 1971.
Evidence for a common transport system for a group of amino acids in *Tetrahymena*.
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 38(8) : 133-143.
81. HUNSELER P., SCHEIDGEN-KLEYBOLDT G., TIEDTKE A. 1987.
Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes.
J. Cell Sci., 88 : 47-55.
82. HUNTER B., CHVAPIL M., THARP D., COLVIN B. 1981.
Effect of molecular weight of protein on growth of *Tetrahymena pyriformis*.
Nutr. Reports Int., 24(5) : 1043-1055.
83. HUTNER S.H., BACCHI C.J., SHAPIRO A., BAKER H. 1980.
Protozoa as tools for nutrition research.
Nutr. Rev., 38(11) : 361-364.
84. IKEMURA T. 1985.
Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms.
Mol. Biol. Evol., 2(1) : 13-34.
85. KEULS M. 1952.
The use of the studentized range in connection with an analysis of variance.
Euphytica, (1) : 112-122.
86. KIRK K.E., BLACKBURN E.H. 1995.
An unusual sequence arrangement in the telomeres of the germ-line micronucleus in *Tetrahymena thermophila*.
Gene Develop., 9(1) : 59-71.
87. KIY T., TIEDTKE A. 1991.
Lysosomal enzymes produced by immobilized *Tetrahymena thermophila*.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 35 : 14-18.
88. KIY T., TIEDTKE A. 1992.
Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 37 : 576-579.
89. KIY T., TIEDTKE A. 1992.
Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena* in a perfused bioreactor.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 38 : 141-146.
90. KIY T., VOSSKUEHLER C., RASMUSSEN L., TIEDTKE A. 1993.
Three pools of lysosomal enzymes in *Tetrahymena thermophila*.
Exptl Cell Res., 205(2) : 286-292.

91. KIY T., TIEDTKE A. 1993.
Effects of immobilization on growth morphology and DNA content of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*.
FEMS Microbiol. Lett., 106(1) : 117-122.
92. KIY T., SCHEIDGEN-KLEYBOLDT G., TIEDTKE A. 1996.
Production of lysosomal enzymes by continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* in a perfused bioreactor.
Enz. Microb. Technol., 18(4) : 268-274.
93. KRASKO A., GAMULIN V., SEACK J., STEFFEN R., SCHRÖDER H.C., MÜLLER W.E.G. 1997.
Cathepsin, a major protease of the marine sponge *Geodia cydonium* : purification of the enzyme and molecular cloning of cDNA.
Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 6(4) : 296 - 307.
94. KUNST A., DRAEGER B., ZIEGENHORN J. 1984.
On the determination of hexokinasic activity.,
in Methods in Enzymology., Bergmeyer H.U., Verlag Chemie Weinheim Acad. Press, New-York.: 163-72.
95. LAEMMLI U.K. 1970.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, (227) : 680-685.
96. LE M.S., ATKINSON T. 1985.
Cross-flow microfiltration for recovery of intracellular products.
Process Biochem., 20(1) : 26-31.
97. LECLERCQ B., BOUKROUH H., DUMORTIER V., DUYME F., DE CONINCK J. 1998.
Influence de l'obscurité, de la mélatonine et de la sérotonine sur la croissance et la production d'hydrolases chez *Tetrahymena thermophila*.
in XXXVII^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, Tunis, Mai 1998.
98. LEICK V. 1992.
Chemotactic properties, cellular binding and uptake of peptides and peptide derivatives : studies with *Tetrahymena thermophila*.
J. Cell Sci., (103) : 565-570.
99. LEICK V., KOPPELHUS U., ROSENBERG J. 1994.
Cilia mediated oriented chemokinesis in *Tetrahymena thermophila*.
J. Euk. Microbiol., 41(6) : 546-53.
100. LEVY M.R., SISKIN E.E., MCCONKEY C.L. 1976.
A protease that increases during a period of enzymic and metabolic adjustment in *Tetrahymena*.
Arch. Biochem. Biophys., 172 : 634-647.

101. LHUISSIER M. 1983.
Dosage microbiologique de l'acide pantothénique dans le foie du rat avec *Tetrahymena*.
Internat. J. Vit. Nutr. Res., (53) : 394-397.
102. LINEWEAVER H., BURK D. 1934.
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc., (56) : 658-666.
103. LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J. 1951.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., (193) : 265-275.
104. LUSHBAUGH W.B., HOFBAUER A.F., PITTMAN F.E. 1985.
Entamoeba histolytica : Purification of cathepsin B.
Exp. Parasitol., (59) : 328-36.
105. LWOFF A. 1923.
Sur la nutrition des Infusoires.
C.R. Acad. Sci., (176) : 928-930.
106. MADIREDDI M.T., DAVIS M.C., ALLIS C.D. 1994.
Identification of a novel polypeptide involved in the formation of DNA-containing vesicles during macronuclear development in *Tetrahymena*.
Develop. Biol., 165(2) : 418-431.
107. MARTINDALE W.D. 1989.
Codon usage in *Tetrahymena* and other ciliates.
J. Protozool., 36 : 29-34.
108. MUNRO I.G. 1985.
Protozoa as source of commercially produced enzymes. A review.
Process Biochem., Oct. : 139-144.
109. MURAKAMI T., MURACHI T. 1979.
Verdohemoglobin as a substrate for proteases is applicable to assays over a wide pH range.
Physiol. Chem. Phys., (11) : 249-252.
110. MÜLLER, M. 1972.
Secretion of acid hydrolases and its intracellular source in *Tetrahymena pyriformis*.
J. Cell Biol., 52 : 478-487.
111. NANNEY D.L., CAUGHEY P.A., TEFANKJIAN A. 1955.
The genetic control of mating type potentialities in *Tetrahymena pyriformis*.
Genetics, 40(5) : 669-680.
112. NANNEY D.L., MC COY J.W. 1976.
Characterization of the species of the *Tetrahymena pyriformis* complex.
Trans. Amer. Micros. Soc., 95(4) : 664-682.

113. NANNEY D.L., SIMON E.M. 2000.
Laboratory and evolutionary history of *Tetrahymena thermophila*.
Methods Cell. Biol., (62) : 3-25.
114. NEWMAN D. 1939.
The distribution of range in samples from a normal population expressed in terms of an independent estimate of standard deviation.
Biometrika, (31) : 20-30.
115. NIELSEN T., VILLADSEN I.S. 1985.
Pleiotropic effects of a temperature-sensitive mouthless mutation in *Tetrahymena thermophila* on the excretion of extracellular enzymes.
J. Protozool., 32(4) : 634-639.
116. NILSSON J.R. 1977.
On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL.
J. Protozool., 24(4) : 502.
117. NILSSON J.R. 1979.
Phagotrophy in *Tetrahymena*.
in Biochemistry and Physiology of Protozoa. S.H.H. M. Levandowsky, Editor., Academic Press: New-York. 339-379.
118. NILSSON J.R. 1989.
Tetrahymena in cytotoxicology : with special reference to effects of heavy metals and selected drugs.
Eur. J. Protistol., (25) : 2-25.
119. NILSSON J.R. 1993.
Effect of a gold salt and its intracellular distribution in *Tetrahymena*.
Acta Protozool., 32(3) : 141-150.
120. NISBET B. 1984.
Nutrition and feeding Strategies in Protozoa.
London and Canberra : Croom Helm.
121. NORTH M.J. 1982.
Comparative Biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms.
Microbiological Reviews, 46(3) : 308-340.
122. ORIAS E., RASMUSSEN L. 1976.
Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena* IV. Growth without food vacuoles and its implications.
Exp. Cell Res., 102 : 127-137.
123. ORIAS E., RASMUSSEN L. 1977.
Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. II. Role of the two systems in vitamin uptake.
J. Protozool., 24(4) : 507-511.

124. ORIAS E., RASMUSSEN L. 1979.
Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. V. Utilization of amino acids and proteins.
J. Cell Sci., 36 : 343-353.
125. ORIAS E., LARSON D., HU Y.F., YU G.L., KATTUNEN J., LOVLIE A., HALLER B., BLACKBURN E.H. 1988.
Replacement of the macromolecular ribosomal RNA genes of a mutant *Tetrahymena* using electroporation.
Gene, 70(2) : 295-301.
126. ORIAS E., HAMILTON E.P., ORIAS J.D. 2000.
Tetrahymena as a laboratory organism : useful strains, culture and cell line maintenance.
Methods Cell. Biol., (62) : 189-211.
127. PERLMAN B.S. 1973.
Temperature effects on maturity periods in *Tetrahymena pyriformis* Syngen 1.
J. Protozool., 20(1) : 106-107.
128. PHILLIPS C.A., LLOYD D. 1978.
Continuous flow size selection of *Tetrahymena pyriformis* ST : changes in volume DNA, RNA and protein during synchronous growth.
J. Gen. Microbiol., 105(1) : 95-104.
129. PLESNER P., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. 1964.
Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*.
in Synchrony in cell division and growth. E.Z. Ed., Editor., Interscience Publ.: New-York. 543-563.
130. PORTOIS C., CAILLIERET P., DEWEER C., JEANFILS J., DE CONINCK J. 1999.
Production de lipases chez *Tetrahymena thermophila* : résultats préliminaires.
in XXXVIII^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, Lille - Mai 99.
131. PORTOIS C., CAILLIERET P., DEWEER C., ISADOVSKAYA I., JEANFILS J., DE CONINCK J. 2000.
Influence de la composition du milieu sur la production de lipases de *Tetrahymena thermophila*.
in XXXIX^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, Paris - Mai 2000.
132. QUINONES-MALDONADO V., RENAUD F.L. 1987.
Effect of biogenic amines on phagocytosis in *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., 34(4) : 435-438.
133. RASMUSSEN L., KLUDT T.A. 1970.
Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena* cultures.
Exp. Cell Res., 59(3) : 457-63.

134. RASMUSSEN L., MODEWEG-HANSEN L. 1973.
Cell multiplication in *Tetrahymena* cultures after addition of particulate material.
J. Cell Sci., (12) : 275-286.
135. RASMUSSEN L., ORIAS E. 1976.
Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena* - Importance of the oral uptake system for Fe and Cu uptake.
Carlsberg Res. Commun., 41(2) : 83-90.
136. RASMUSSEN L., DIVE D. 1980.
Tetrahymena : Doubling times and phospholipids.
Naturwissenschaften, 67 : 96.
137. RASMUSSEN L., ZDANOWSKI M.K. 1980.
Evidence for di-peptide uptake in *Tetrahymena*.
Experientia, 36(9) : 1044-5.
138. RASMUSSEN L., CHRISTENSEN ST, SCHOUSBOE P., WHEATLEY DN. 1996.
Cell survival and multiplication. The overriding need for signals : from unicellular to multicellular systems.
FEMS Microbiol. Lett., 137(2-3) : 123-8.
139. RENAUD F., LEBRON J., RODRIGUEZ F., CADILLA C. 1993.
An opioid signal transduction system may be present in *Tetrahymena*.
in 33rd Ann. Meet. of the Am. Soc. Cell Biol. . New Orleans, Louisiana, USA, Dec. 11-15, 1993 : Molecular Biology of the Cell.
140. RENAUD F.L., CASTRODAD F., JOGLAR J. 1987.
Cilia regeneration in *Tetrahymena* : a model system for the regulation of cell morphogenesis.
in European Developmental Biology Congress . Helsinki, Finland, June 14-18: Cell Differ. 20 (Suppl.), 1987.
141. RICKETTS T.R. 1971.
Periodicity of endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*.
Protoplasma, (73) : 387-396.
142. RIFKIN J.L. 1973.
The role of the contractile vacuoles in the osmoregulation of *Tetrahymena pyriformis*.
J. Protozool., 20(1) : 108-114.
143. ROBERT C.T., MORSE D.E. 1980.
Galactokinase-deficient mutants of *Tetrahymena thermophila* : selection and characterization.
Molec. Gen. Genet., (180) : 129-134.
144. ROTHSTEIN T.L., BLUM J.J. 1973.
Lysosomal physiology in *Tetrahymena*. I. Effect of glucose, acetate, pyruvate and carmine on intracellular content and extracellular release of three acid hydrolases.
J. Cell Biol., 57(3) : 630-41.

145. ROTHSTEIN T.L., BLUM J.J. 1974b.
Lysosomal physiology in *Tetrahymena*. II Effect of culture age and temperature on the extracellular release of three acid hydrolases.
J. Protozool., 21(1) : 163-168.
146. ROTHSTEIN T.L., BLUM J.J. 1974c.
Lysosomal physiology in *Tetrahymena*. III Pharmacological studies on acid hydrolase release and the ingestion and the egestion of dimethyl benzanthracene particles.
J. Cell Biol., (47) : 844-859.
147. SALAMAN A., ROMAN M., RENAUD F.L., SILVA W.J. 1990.
Effect of chronic opioid treatment on phagocytosis in *Tetrahymena*.
Neuropeptides, 16 : 115-120.
148. SALIBA R., DIVE D., DEVIS R. 1983.
An inexpensive and practical medium rearing mass cultures in *Tetrahymena*.
Protistologica, XIX(3) : 417-421.
149. SALIBA R. 1984.
Contribution à l'étude de la pathologie des prostaglandines - Production semi-industrielle des *Tetrahymena* et application à l'anti-aggrégation plaquettaire.
Thèse Sci. Agron., Thèse Université Catholique de Louvain.
150. SANTOS J.A.L., CABRAL J.M.S., COONEY C.L. 1992.
Recovery of alkaline proteases by membrane filtration. Effect of membrane type and addition of submicron sized charged particles.
Bioprocess. Eng., (7) : 205 - 211.
151. SCHLIMME W., MARCHIANI M., HANSELMANN K., JENNI B. 1999.
BACTOX, a rapid bioassay that uses protozoa to assess the toxicity of bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 65(6) : 2754-7.
152. SCHOUSBOE P., RASMUSSEN L. 1994.
Survival of *Tetrahymena* at low initial cell densities. Effects of lipids and long-chain alcohols.
J. Euk. Microbiol., 41 : 195-199.
153. SCHULTZ T.W., LIN D.T., WILKE T.S., ARNOLD L.M. 1990.
Quantitative structure activity relationships for the *Tetrahymena pyriformis* population growth endpoint : a mechanism of action approach.
in Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology. W.K.a.J. DEVILLERS, Editor., Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. 241-261.
154. SCHULTZ T.W. 1999.
Structure-toxicity relationships for benzènes evaluated with *Tetrahymena pyriformis*.
Chem. Res. Toxicol., 12(12) : 1262-67.

155. SHILOACH J., RUBINOVITZ C., LEROITH D. 1985.
Extraction of insulin-related material and other peptide hormones from *Tetrahymena pyriformis*.
in ACS (American Chemical Society) Symposium Series, 271. PURIFICATION OF FERMENTATION PRODUCTS : Application to large-scale processes. Washington D.C.: American Chemical Society, 271.
156. STEFANIDOU M., GEORGIU M., MARAVELIAS C., KOUTSELINIS A. 1990.
The effects of morphine, cocaine, amphetamine and hashish on the phagocytosis of the protozoon *Tetrahymena pyriformis* strain W.
Toxic. in Vitro, 4(6) : 779-781.
157. STRAUS J.W., MIGAKI G., FINCH M.T. 1992.
An assessment of proteolytic enzymes in *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., 39(6) : 655-662.
158. SUHR-JESSEN P.B., ORIAS E. 1979.
Mutants of *Tetrahymena thermophila* with temperature sensitive food vacuole formation. I. Isolation and genetic characterization.
Genetics, 92 : 1061-1077.
159. SUHR-JESSEN P.B., RASMUSSEN L. 1982.
Wild-type and food vacuole-less *Tetrahymena thermophila*. Model for iron uptake and utilization in animal cells.
Exp. Cell Res., 139(2) : 457-60.
160. SUHR-JESSEN P.B., ORIAS E. 1982.
Mutants of *Tetrahymena thermophila* with temperature sensitive food vacuoles formation. II. Physiological and morphological studies.
Exp. Cell Res., (124) : 317-27.
161. SUPRYNOWICZ F.A., ALLEWELL N.M. 1979.
Regulation of neutral protease activity through the life cycle of *Tetrahymena pyriformis*.
Biochem. Biophys. Acta, 585 : 488-498.
162. SUZUKI K., TAKAHASHI T., HOSOYA H. 1993.
Growth-inhibitory activity in *Tetrahymena* culture medium in the stationary phase of growth. in 64th Ann. Meet. of the Zoological Society of Japan. Okinawa, Japan, Nov. 20-23, 1993.: Biological Abstracts.
163. SUZUKI K., HAYASHI N., HOSAYA N., TAKAHASHI T., KOSAKA T., HOSOYA H. 1998.
Secretion of tetrain, a *Tetrahymena* cystein protease, as a mature enzyme and its identification as a member of the cathepsin L subfamily.
Eur. J. Biochem., (254) : 6 - 13.
164. SUZUKI K.M., HOSOYA N., TAKAHASHI T., KOSAKA T., HOSOYA H. 1997.
Release of a newly-identified cysteine protease, tetrain, from *Tetrahymena* into culture medium during the cell growth.
J. Biochem., (121) : 642 - 647.

165. SZABLEWSKI L., HOVE ANDREASEN P., TIEDTKE A., FLORIN-CHRISTENSEN J., RASMUSSEN L. 1991.
Tetrahymena thermophila : growth in synthetic nutrient medium in the presence and absence of glucose.
J. Protozool., 38(1) : 62-65.
166. SZABLEWSKI L. 1993.
Activity of prostaglandin synthetase in *Tetrahymena rostrata* and *Tetrahymena pyriformis* GL.
Acta Protozoologica, 32(1) : 33-36.
167. TANIGUCHI T., MIZUOCHI T., BANNO Y., NOZAWA Y., KOBATA A. 1985.
Carbohydrates of lysosomal enzymes secreted by *Tetrahymena pyriformis*.
J. Biol. Chem., 260 : 13941-13946.
168. TIEDTKE A. 1983.
Purification and properties of secreted N-acetyl- α -D-hexoaminidase of *Tetrahymena thermophila*.
Comp. Biochem. Physiol., 75B(2) : 239-243.
169. TIEDTKE A., FLORIN-CHRISTENSEN M., FLORIN-CHRISTENSEN J. 1984.
Release of lysosomal enzymes in *Tetrahymena* : A Ca²⁺ dependant secretory process.
J. Protozool., 31(41A) : 615-520.
170. TIEDTKE A., RASMUSSEN L., FLORIN-CHRISTENSEN J., FLORIN-CHRISTENSEN M. 1988.
Release of lysosomal enzymes in *Tetrahymena* : A Ca²⁺ dependant secretory process.
J. cell Sci., 89(167-171) :
171. TIEDTKE A., RASMUSSEN L. 1988.
Lysosomal enzymes in extracellular digestion in the unicellular eukaryote *Tetrahymena*.
J. Cell. Biol., 136 : 554-556.
172. TIEDTKE A., HUNSELER P., FLORIN-CHRISTENSEN J., FLORIN-CHRISTENSEN M. 1988.
Exocytosis, endocytosis and membrane recycling in *Tetrahymena thermophila*.
J. Cell Sci., (89) : 515-520.
173. TIEDTKE A., RASMUSSEN L. 1989.
Constitutive secretion of acid hydrolases in *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., 36(4) : 378-382.
174. TIEDTKE A., KIY T., VOSSKUEHLER C., RASMUSSEN L. 1993.
Pathways of lysosomal enzyme secretion in *Tetrahymena*.
in ADVANCES IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY OF MEMBRANES. P.H. (Ed.),
Editor., JAI Press Inc.: Greenwich, Connecticut, USA ; London, England, U.K. 99-122.
175. TONDRAVI M.M. , YAO M.C. 1986.
Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal DNA genes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83(12) : 4369-73.

176. TONON F. 1985.
La culture de *Tetrahymena* (protozoaires ciliés) : recherche de nouveaux milieux pour la recherche et la production industrielle,
D.E.A. Microbiologie, DEA E.N.S.I.A.A. Massy.
177. URIBELARREA J.L., WINTER J., GOMA G., PAREILLEUX A. 1990.
Determination of maintenance coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* cultures with cell recycle by cross-flow membrane filtration.
Biotechnol. Bioeng., 35(2) : 201-206.
178. VAN BELL C.T., WILLIAMS N.E. 1983.
Biochemical approaches to mating type expression in *Tetrahymena thermophila*.
J. Protozool., 30(3) : 588-591.
179. VERDIER-DENANTES I., BOUQUELET S., DUMORTIER V., DE CONINCK J. 1994.
Maîtrise de la croissance de *Tetrahymena thermophila* souche BIII et caractérisation d'enzymes d'intérêt industriel.
in XXXIII^e Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française - Nice, 12/15 Mai 1994.
180. VICK G.W., GALLIS H.A., WHEAT R., BLUM J.J. 1979.
Partial purification and characterization of a bacteriolytic enzyme secreted by *Tetrahymena*.
J. Protozool., 26(1) : 142-146.
181. VISWANATHA T., LIENER I.E. 1954.
Utilization of native and denatured proteins by *Tetrahymena pyriformis* W.
Arch. Biochem. Biophys., 56 : 222-229.
182. VISWANATHA T., LIENER I.E. 1956.
Isolation and properties of a proteinase from *Tetrahymena pyriformis* W.
Arch. Biochem. Biophys., 61 : 410-421.
183. VON FIGURA K., HASILIK A. 1986.
Lysosomal enzymes and their receptors.
Ann. Rev. Biochem., 55 : 167-193.
184. WANG T.C., HOOPER A.B. 1978.
Adaptation to cycloheximide of macromolecular synthesis in *Tetrahymena*.
J. Cell Physiol., 95(1) : 1-11.
185. WANG Y.Y., MILLER J., BEUCHAT L.R. 1980.
Tetrahymena thermophila as an organism for bioassay of protein quality.
Nutrition Reports Int., 21(5) : 645-651.
186. WHEATLEY D.N., CHRISTENSEN S.T., SCHOUSBOE P., RASMUSSEN L. 1993.
Signalling in cell growth and death : Adequate nutrition alone may not be sufficient for ciliates.
Cell Biol. Int., 17(9) : 817-823.



50376
2000
266

SHORT COMMUNICATIONS

Modeling *Tetrahymena thermophila* growth and protease production

J De Coninck¹, I Verdier-Denantes¹, F Duyme², S Bouquelet³ and V Dumortier¹

¹Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire de Microbiologie des Fermentations, 41 rue du Port, 59046 Lille Cedex, France;

²Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire d'Informatique et de Statistique, 41 rue du Port, 59046 Lille Cedex, France;

³Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Chimie Biologique, UMR CNRS 8576, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Oxygen concentrations stimulated growth (maximum number of cells) and protease secretion by *Tetrahymena thermophila*. Agitation and aeration conditions for growth and protease secretion were optimised by a central composite design. The best optimised combination was a stirrer speed of 338 rpm and an aeration of 1 vvm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2000) 25, 58–61.

Keywords: agitation aeration; *Tetrahymena thermophila*; optimisation; protease

Introduction

Protozoa have been little used as sources of commercially produced metabolites. *Tetrahymena*, which is fairly easy to mutagenize, is one of the protozoa presenting a high biotechnical potential for enzyme production [12]. It is also a model for growth, cell cycle and nutritional studies [16]. These protozoa can be cultivated on a large scale [9] on medium containing industrial by-products [6].

Tetrahymena secreted large amounts of lysosomal hydrolases into the growth medium, in particular proteases [1]. The secreted enzymes were glycosylated like those produced by mammalian cells, and unlike those produced by yeast and bacteria.

Optimisation of fermentation conditions are a prerequisite to improve process economics in metabolite production. This work reports the effects of dissolved oxygen concentration, agitation and aeration on the growth and on a model of secreted hydrolase production: protease, in batch fermentation.

To optimise and model *Tetrahymena* growth and protease production, full or fractional factorial designs can be used to measure the response to several parameters which vary simultaneously as well as to determine the interactions between them through a limited number of trials [5,7,8]. The central composite design method was chosen and a polynomial model is used to quantify the relationship between the values of three measurable response variables (generation time, maximal population and protease production) and a combination of experimental factors presumed to affect the response (agitation and aeration).

Materials and methods

Strain and cultivation

Investigations were carried out with *Tetrahymena thermophila* BIII, originally obtained from the Carlsberg Institute, Copenhagen,

Denmark. Batch fermentations were carried out in 2-l fermentors with turbine impellers (Biolafitte, Saint Germain en Laye, France) and equipped with digital control units. The temperature was kept constant at 28°C. Dissolved oxygen tension and pH were not regulated, except if mentioned. The chosen aeration and agitation are given in the results section. Mye medium [14] was composed of 1% (w/v) yeast extract and 1% (w/v) skimmed milk. Fermentors containing 1 l medium supplied with 0.001% (v/v) antifoam (Sigma, ref. A6426, Quentin Fallavie, France) were autoclaved for 25 min at 120°C. Inocula (10 vol.%) were exponentially growing cultures to obtain 10⁴ cells/ml in the fresh medium. Cells were counted electronically (Coulter counter Z1, Beckman Coulter France, Roissy COG, France).

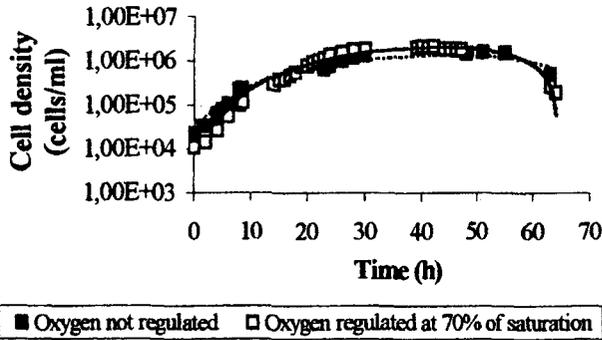
Enzyme assay

Cells were removed from the medium at the end of the exponential phase by centrifugation at 16°C for 30 min at 300×g (to avoid damaging cells). The proteolytic activity in the cell-free supernatant was measured spectrophotometrically using hemoglobin as substrate (19.8 g/l) with modifications of the procedure of Beynon and Bond [3]. The buffer of the reaction was 0.2 M acetic acid–sodium acetate, pH 4.5. Substrate (1 ml) was added to 0.2 ml cell-free supernatant. After incubation at 55°C for 20 min, the reaction was stopped by adding 2 ml trichloroacetic acid (5% v/v). After 30 min, precipitates were removed by centrifugation at 4500×g for 20 min and tyrosine was assayed as described previously [13]. One proteolytic unit corresponds to the amount of enzyme required for the release of 1 μmol of tyrosine per minute. Results were expressed as milliproteolytic unit per ml (mU/ml).

Statistical analysis

To optimise and model *Tetrahymena* growth and protease production, we chose the central composite design, a widely used method. This method was adopted to assess the combined effect of agitation and aeration on generation time, maximal population and production of proteases. Levels of the two

(a) Cell density



(b) Proteolytic activity

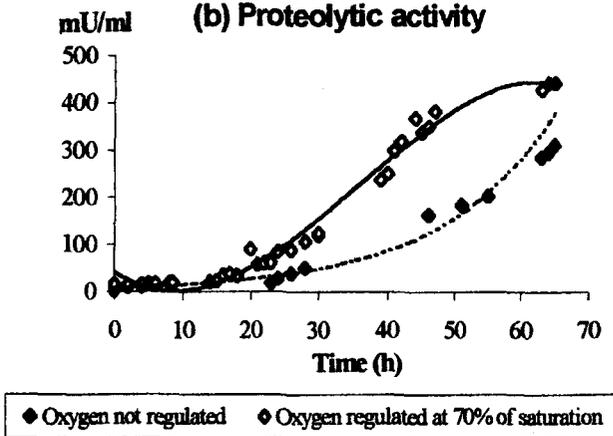


Figure 1 Influence of dissolved oxygen (regulated or not) on the growth (a) and protease production (b) of *T. thermophila*.

factors (agitation and aeration) were fixed into a region supposed to be optimal according to previous results. Levels of agitation varied from 200 to 400 rpm. Levels of aeration varied from 0.5 to 2.0 vvm. Other levels were deduced from both minimum and maximum. Other details concerning the method can be found in Box and Draper [4] and Box *et al.* [5].

Data obtained were analysed by multiple regression using Minitab [11] software and the following equation was established to fit the data and calculate the optimal combination of agitation and aeration.

$$y = b_0 + b_1(AE) + b_2(STI) + b_3(AE)^2 + b_4(STI)^2 + b_5(AE)(STI) + \varepsilon$$

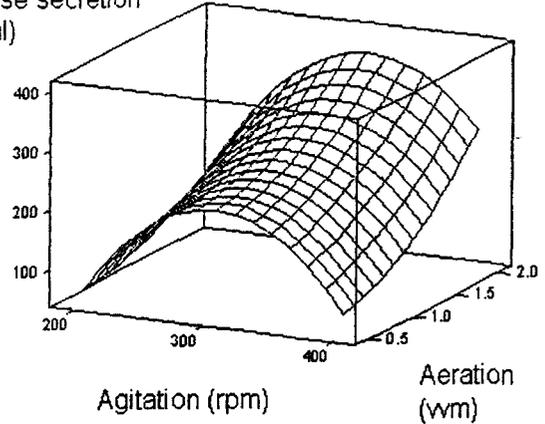
where y : generation time (min), maximal population (10^6 cells/ml) or proteolytic unit per cell; b_0 to b_5 : regression coefficients of the model; AE: aeration in vvm; STI: stirrer speed in rpm; (AE)(STI): interaction term; ε : error term (residual) supposed to be of null expected value and constant variance for hypothesis testing. First partial derivatives were calculated to obtain optimal values.

Results and discussion

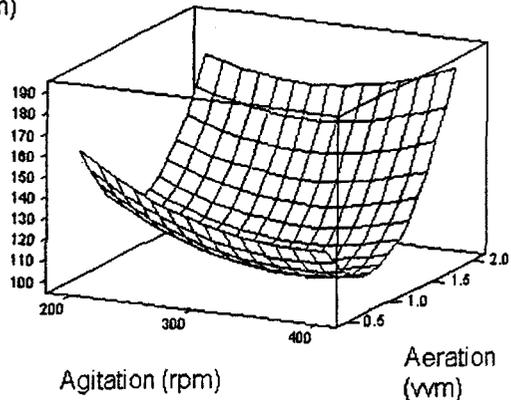
Effects of aeration and agitation on growth and protease secretion

Tetrahymena is an aerobic organism and its growth is influenced by oxygen concentration in the medium. Without aeration, growth

Protease secretion (mU/ml)



Generation time (min)



Maximum population ($\times 10^6$ cells/ml)

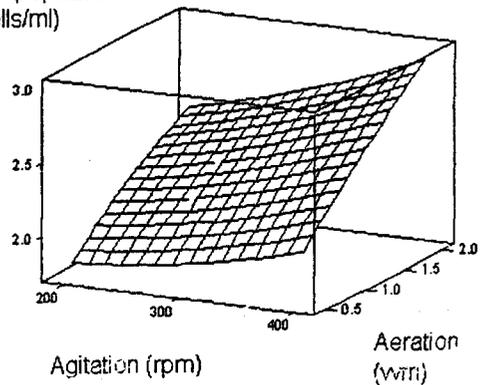


Figure 2 Response surfaces obtained for generation time, maximum population, and secretion of proteases by means of central composite design for each combination of agitation and aeration.

Table 1 Best combinations of agitation and aeration and corresponding optimal generation times and maximal populations

Optimal conditions	Generation time (min), 101	Maximal population (10 ⁶ cells/ml), 2.2
Agitation (rpm)	338	338
Aeration (vvm)	1	1

remained low (maximum cell concentration about 10-fold lower than that in aerated cultures) and little protease production was detected. Dissolved oxygen in the liquid phase was measured with an O₂-electrode. Conditions of agitation and aeration were chosen to avoid damaging cells and to test protease secretion in medium (not global protease production).

Figure 1a and b demonstrate the time course of dissolved oxygen (pO₂) for this experiment. When aeration and stirrer speed were not regulated, they were chosen at 90 litre gas per hour (1 vvm) and 300 rpm, respectively. Up to 10 h fermentation, pO₂ values were constant and then decreased from 10% of saturation. When dissolved oxygen was maintained at 70% of saturation by controlling the air flow and keeping agitation speed constant at 300 rpm, we did not notice a longer stationary phase (Figure 1a). The two types of culture (regulated or not) yielded similar numbers of cell but maximal cell production in regulated cultures (2.1 × 10⁶ cells/ml) was 20% higher than in unregulated cultures (1.7 × 10⁶ cells/ml).

Increased biomass was obtained when oxygen was regulated. In the same way, Berline and Antipa [2] demonstrated that batch cultures of *Tetrahymena* entered stationary phase when they became oxygen limited. This is not in agreement with the results obtained by Hoffman and Cleffman [10] who noticed that greater oxygen concentrations in the medium did not significantly improve cell yield.

Protease production was 66% higher in oxygen cultures which were regulated than in unregulated cultures, although cell numbers were similar. When pO₂ was not regulated high protease production occurred at the end of growth, because a lot of cells lysed (Figure 1b) in contrast to cultures where pO₂ was not regulated and protease was more constantly secreted. Tiedtke et al. [15] noticed that Ca²⁺ stimulated secretion of hydrolases (including protease). Our results show that when oxygen is maintained at a sufficient concentration protease secretion is stimulated.

Optimised conditions of aeration and agitation

We modeled only protease secretion in the medium without damaging cells. This could be important in view of possible further process developments such as continuous culture with recycle cells.

Models of response surfaces (Figure 2) obtained with the central composite design were determined using multiple regression analysis. Regression models could be used only between the levels of combined factors chosen for the central composite design. Following are significant regression equations linking generation time (min), maximal population (10⁶ cells/ml), secretion of proteases (mU/ml) and agitation (rpm), aeration (vvm).

$$GT = 374.99 - 0.929(STI) - 219.17(AE) + 0.001155(STI)^2 - 81.01(AE)^2 + 0.138(STI)(AE)$$

$$MP = 1.65 - 0.00157(STI) + 0.478(AE) + 0.00000419(STI)^2 - 0.0817(AE)^2 + 0.000798(AE)(STI)$$

$$PROT = -1101 + 8.92(STI) - 115(AE) - 0.0151(STI)^2 + 50.5(AE)^2 + 0.304(AE)(STI)$$

where GT: generation time; MP: maximum population, secretion of proteases in medium. With smaller values, the could not be applied as confirmed by preliminary tests. Significant interaction terms between agitation and aeration noticed, indicating that the effect of aeration was dependent on agitation value. Optimal values of aeration and agitation (dissolved oxygen = 20% of saturation) were determined as optimal values of generation time and maximal population calculated (Table 1).

For maximal population, different best combinations of aeration and agitation could be chosen but for technical reasons, the conditions as generation time were proposed: agitation 338 rpm and 1 vvm of aeration.

Optimal secretions of proteases were chosen in the confidence region after a simulation with different values of aeration and agitation, i.e. agitation 300–350 rpm and 1–1.5 vvm.

In conclusion, to produce optimal biomass and protease secretion with *Tetrahymena*, dissolved oxygen concentration must be sufficiently maintained in the medium and a stirrer speed of 338 min and aeration of 1 vvm were required. In a next optimisation, a process integrating continuous fermentation coupled with tangential microfiltration will be tested to improve growth and protease production by *T. thermophila*.

Acknowledgements

We thank Mrs. Ellis for helpful reading.

References

- Banno Y, Nozawa Y and Yano K. 1983. Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem* 132: 563–568.
- Berlin JW and GA Antipa. 1982. The effect of mass transfer on chemostat cultures of *Tetrahymena thermophila*. *J Prot.* 479.
- Beynon RJ and JS Bond. 1989. *Proteolytic Enzymes, A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England, 147–156.
- Box GEP and NR Draper. 1987. *Empirical Model Building and Response Surfaces*. Wiley, New York.
- Box GEP, WG Hunter and JS Hunter. 1978. *Statistics for Quality Control*. Wiley, New York.
- Caillieret-Ethuin P, F Duyme, F Tonon, J Jeanfils and J De Coninck. 1998. Optimisation of *Tetrahymena rostrata* growth using products as nitrogen source. *Biotechnol. Tech.* 12: 177–181.
- Delacroix A and C Porte. 1987. Méthode d'optimisation de la culture analytique. *Techn. Ing.* 4: 22513–22521.
- Fargin E, M Sergeant, D Mathieu and Phan-Tan-Luu. 1985. Méthodologie de la recherche expérimentale. *Bio-science*

- 9 Gosselin Y, G Lognay and P Thonart. 1989. Improvement of fed batch mass culture for gamma-linolenic biosynthesis by *Tetrahymena rostrata* (protozoa). *Biotechnol Lett* 11: 423-426.
- 10 Hoffman E and G Cleffmann. 1981. External factors limiting the multiplication potential of *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 50: 407-418.
- 11 Minitab. 1995. Minitab reference manual. PA State College, Minitab Inc., Paris, France.
- 12 Munro IG. 1985. Protozoa as sources of commercially produced enzymes: a review. *Proc Biochem*. 20: 139-144.
- 13 Rick W and WP Fritsch. 1974. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. vol. 2 Bergmeyer HU, editor, Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York, pp. 1046-1052.
- 14 Saliba R, D Dive and R Devis. 1983. An inexpensive and practical medium rearing mass cultures in *Tetrahymena*. *Protistologica* 19: 417-421.
- 15 Tiedtke A, L Rasmussen, J Florin-Christensen and M Florin-Christensen. 1988. Release of lysosomal enzymes in *Tetrahymena*: a Ca^{2+} dependant secretory process. *J Cell Sci* 89: 167-171.
- 16 Wheatley DN, L Rasmussen and A Tiedtke. 1994. *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *BioEssays* 16: 367-372.

187. WHEATLEY D.N., RASMUSSEN L., TIEDTKE A. 1994.
Tetrahymena : A model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential.
BioEssays, 16(5) : 367-372.
188. YU G.L., BLACKBURN E.H. 1989.
Transformation of *Tetrahymena thermophila* with a mutated circular ribosomal DNA plasmid vector.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(21) : 8487-8491.
189. ZDANOWSKI M.K., RASMUSSEN L. 1979.
Peptidase activity in *Tetrahymena*.
J. Cell. Biol., 100(3) : 407-411.
190. ZEUTHEN E. 1971.
Synchrony in *Tetrahymena* by heat shocks spaced a normal cell generation apart.
Exp. Cell Res., 68 : 49-60.

ANNEXES

ANNEXE A : ESTIMATION DU COÛT DES MILIEUX DE CULTURE

	PRIX HT/KG (F)	QUANTITE (g)	PRIX/LITRE (F)
MILIEU PPYS			
extrait de levure	350	7,5	2,63
protéose peptone	1624	7,5	12,18
solution saline A		10ml	0,02
MgSO ₄ , 7H ₂ O	87,3	10	0,87
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ,6H ₂ O	237	2,5	0,59
MnCl ₂	687	0,05	0,03
ZnCl ₂	320	0,005	0,00
solution saline B		10ml	0,01
CaCl ₂ , 2H ₂ O	256		0,26
CuCl ₂ , 2H ₂ O	728		0,73
FeCl ₃ , 6H ₂ O	199		0,20
			14,83
MILIEU YEG			
extrait de levure	350	10	3,50
glucose	151	5	0,76
			4,26
MILIEU MYE			
extrait de levure	350	10	3,50
lait écrémé en poudre	32	10	0,32
			3,82
MILIEU YEX			
extrait de levure	350	10	3,50
glucidex 12	6	45	0,27
			3,77
MILIEU YEM			
extrait de levure	350	10	3,50
solubles de maïs	2	3	0,01
			3,51
MILIEU YEP			
extrait de levure	350	10	3,50
solubles de pomme de terre	0,19	3	0,00
			3,50

ANNEXE B : TESTS STATISTIQUES UTILISÉS

Test du CHI2

Tester une hypothèse d'équirépartition.

Dans notre cas : rejeter cette hypothèse revient à montrer qu'un paramètre a une action sur les résultats

Test de BARLETT

Comparer des variances pour savoir si elles sont égales ou significativement différentes.

Test de NEWMAN-KEULS

Utilisé quand l'hypothèse H_0 de l'analyse de la variance est refusée (valeurs des différentes modalités significativement différentes).

MAIS

Possibilité de regrouper des modalités ayant des valeurs non significativement différentes.

But : obtenir différents groupes homogènes permettant de choisir les modalités les plus intéressantes pour une expérience donnée.

ANNEXE C :

**RÉSULTATS DÉTAILLÉS DES SUIVIS DE
FERMENTATIONS ET DES TESTS STATISTIQUES**

Tableau C1 : Temps de génération et populations maximales de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus dans six milieux complexes connus - Moyenne de trois expérimentations. Ecart-type entre parenthèses.

Conditions expérimentales : 300 tours.min.⁻¹; 1,0 vvm ; 28°C ; 1,5L de culture

Milieu de culture	MYE	PPYS	YEG	YEX	YEP	YEM
TG	105 (15,6)	106,2 (7,5)	149,9 (12,5)	134,2 (17,8)	128,6 (9,8)	118,3 (2,6)
PM	3,26 (0,47)	2,35 (0,34)	1,73 (0,22)	0,73 (0,61)	1,49 (0,52)	1,24 (0,35)

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10E6 cellules/ml.

En grisé, milieu permettant à la fois le meilleur TG et la meilleure PM.

**Tableaux C2 & C3 : Analyse statistique des temps de génération de
T. thermophila BIII obtenus sur différents milieux de culture complexes**

Tableau C2 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
[Milieu de culture]	5	4522,64	904,53	6,21 (TS)	0,0047
Var. Résiduelle	12	1746,67	145,56		
Var. Totale	17	6269,32	368,78		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

Tableau C3 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes	homogènes
Milieu de culture	YEG	149,9	12,5	A	
	YEX	134,2	17,8	A	B
	YEP	128,6	9,8	A	B
	YEM	118,3	2,6		B
	PPYS	106,2	7,5		B
	MYE	105	15,6		B

**Tableaux C4 & C5 : Analyse statistique des populations maximales
T. thermophila BIII obtenus sur différents milieux de culture complexes**

Tableau C4 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
[Milieu de culture]	5	11,99	2,4	12,54 (TS)	0,0002
Var. Résiduelle	12	2,29	0,19		
Var. Totale	17	14,28	0,84		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

Tableau C5 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes homogènes
Milieu de culture	MYE	3,26E+06	0,47	A
	PPYS	2,35E+06	0,34	B
	YEG	1,73E+06	0,22	B C
	YEP	1,49E+06	0,52	B C
	YEM	1,24E+06	0,35	C
	YEX	7,30E+05	0,61	C

Tableau C6 : Temps de génération et populations maximales de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différentes combinaisons de concentrations en extrait de levure et lait écrémé dans le milieu MYE.
Moyenne de trois expérimentations. Ecart-type entre parenthèses

[LAIT ÉCRÉMÉ] (%)	[YE] (%)	0, 2		0, 5		1, 0		1, 5	
		TG	PM	TG	PM	TG	PM	TG	PM
0						246,6 (19,5)	4,94 (0,47)		
0,5						154,0 (3,3)	5,16 (0,32)		
1,0		203,3 (5,5)	4,67 (0,49)	150,5 (20)	5,08 (0,36)	148,5 (4,7)	5,87 (0,03)	162,5 (5,2)	4,87 (0,19)
1,5		231,7 (6,3)	4,82 (0,16)	175,8 (5,2)	4,51 (0,25)	145,3 (4,2)	5,42 (0,21)	194,5 (7,6)	5,22 (0,13)
2,0		271,8 (18,4)	4,50 (0,16)	188,2 (7,3)	4,24 (0,17)	170,9 (17,4)	5,25 (0,14)	191,6 (8,3)	4,62 (0,18)
2,5		196,8 (7,7)	4,90 (0,31)	257,0 (10,8)	4,32 (0,23)	165,6 (7,0)	5,92 (0,12)	228,2 (3,9)	4,73 (0,52)
3,0						160,1 (7,8)	5,78 (0,42)		
3,5						171,1 (11,9)	5,91 (0,02)		
4,0						186,7 (8,2)	5,86 (0,36)		
4,5						206,4 (15,1)	5,92 (0,49)		
5,0						220,4 (12,1)	5,96 (0,29)		

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10E5 cellules/ml.

En grisé, conditions permettant à la fois le meilleur TG et la meilleure PM.

Tableaux C7 à C9 : Analyse statistique des temps de génération de *T. thermophila* BIII obtenus avec différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure

Tableaux C7 : Analyse de variance des temps de génération de *T. Thermophila* BIII obtenus sur le milieu MYE avec différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique (5%)
[extrait de levure]	3	28379,9	9460,0	18,54 (S)	2,8
[lait écrémé]	10	44901,1	4490,1	8,80 (S)	2,03
Interaction [extr.levure]/[lait écrémé]	2	117,8	58,9		
Var. Résiduelle	53	27042,2	510,2		
Var. Totale	68	100441,0	1477,1		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les temps de génération, cf Tab.Ann.I.12)

Tableau C8 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche du temps de génération le plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure du milieu MYE - Résultats intermédiaires

[lait écrémé](%) [extrait de levure](%)	0	0,5	1	1,5	2 à 4	4,5	5
0,2	214,8 33,6 <u>67</u>	214,8 33,6 <u>-25,7</u>	214,8 33,6 <u>-48,2</u>	214,8 33,6 <u>-27,9</u>	214,8 33,6	214,8 33,6 <u>26,8</u>	214,8 33,6 <u>40,8</u>
1	214,8 -35,1 <u>67</u>	214,8 -35,1 <u>-25,7</u>	214,8 -35,1 -48,2	214,8 -35,1 <u>-27,9</u>	214,8 -35,1	214,8 -35,1 <u>26,8</u>	214,8 -35,1 <u>40,8</u>
0,5 et 1,5	214,8 <u>67</u>	214,8 <u>-25,7</u>	214,8 <u>-48,2</u>	214,8 <u>-27,9</u>	214,8	214,8 <u>26,8</u>	214,8 <u>40,8</u>

Constante modalité 0

Coefficient dû au pourcentage de lait écrémé

Coefficient dû au pourcentage d'extrait de levure

Tableau C9 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche du temps de génération le plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure du milieu MYE - Résultats finaux

[lait écrémé](%) [extrait de levure](%)	0	0,5	1	1,5	2 à 4	4,5	5
0,2		222,7	200,2	220,5	248,4	275,2	289,2
1		154	131,5	151,8	179,7	206,5	220,5
0,5 et 1,5		189,1	166,6	186,9	214,8	241,6	255,6

En grisé le meilleur résultat

Tableaux C10 à C12 : Analyse statistique des populations maximales de *T. thermophila* BIII obtenus avec différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure

Tableau C10 : Analyse de variance des populations maximales de *T. thermophila* BIII obtenus sur le milieu MYE avec différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique (5%)
[extrait de levure]	3	8,03	2,68	24,56 (S)	
[lait écrémé]	10	4,55	0,46	4,17 (S)	
Interaction [extr.levure]/[lait écrémé]	2	0,07	0,04	0,32	
Var. Résiduelle	53	5,75	0,11		
Var. Totale	66	18,41	0,28		

DDL : degrés de liberté
SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif
S : significatif
TS : très significatif

(Pour les populations maximales, cf Tab. Ann.I.12)

Tableau C11 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche de la population maximale la plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure du milieu MYE - Résultats intermédiaires

[lait écrémé](%) [extrait de levure](%)	0	0,5	2	1-1,5-2,5-3 3,5-4,0-4,5
0,2	4,95	4,95	4,95	4,95
	-0,21	-0,61	-0,61	-0,21
	<u>-0,69</u>	<u>-0,48</u>	<u>-0,3</u>	
0,5	4,95	4,95	4,95	4,95
	-0,39	-0,39	-0,39	-0,39
	<u>-0,69</u>	<u>-0,48</u>	<u>-0,3</u>	
1	4,95	4,95	4,95	4,95
	0,68	0,68	0,68	0,68
	<u>-0,69</u>	<u>-0,48</u>	<u>-0,3</u>	
1,5	4,95	4,95	4,95	4,95
	<u>-0,69</u>	<u>-0,48</u>	<u>-0,3</u>	

Constante modalité 0

Coefficient dû au pourcentage de lait écrémé

Coefficient ,dû au pourcentage d'extrait de levure

Tableau C12 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche de la population maximale la plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différents pourcentages de lait écrémé et extrait de levure du milieu MYE - Résultats finaux

[lait écrémé](%) [extrait de levure](%)	0	0,5	2	1-1,5-2,5-3 3,5-4,0-4,5
0,2	4,05	3,86	4,04	4,74
0,5	3,87	4,08	4,26	4,56
1	4,94	5,15	5,33	5,63
1,5	4,26	4,47	4,65	4,95

En grisé le meilleur résultat

Tableau C13 : Temps de génération et populations maximales de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différents modes de culture sur milieu MYE
Moyenne de trois expérimentations. Ecart-type entre parenthèses

Mode de culture	TG	PM
10ml	148,4 (2,7)	0,653 (0,0284)
2l	105 (15,6)	3,26 (0,473)
*20l	158,6	1,99

* 1 seul essai effectué

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10E6 cellules/ml.

En grisé, mode permettant *a priori* à la fois le meilleur TG et la meilleure PM

Tableau C14 : Temps de génération et populations maximales de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différents pH de milieu de culture
Moyenne de trois expérimentations. Ecart-type entre parenthèses

Milieu de culture	Tampon	pH	TG	PM
YEG	MES	5,5	224,8 (11,7)	3,11 (0,208)
YEG	MES	6,0	215,5 (8,9)	3,29 (0,18)
YEG	MES	6,5	165,8 (6,5)	3,54 (0,125)
YEG	MOPS	6,5bis	162,2 (4,3)	3,48 (0,353)
MYE	MES	6,5ter	154,7 (3,4)	5,69 (0,07)
MYE	MOPS	6,5qua	164,7 (6,4)	5,99 (0,085)
MYE	MOPS	7,0	148,4 (2,7)	5,97 (0,0115)
MYE	TRIS	7,5	165,6 (2,0)	5,33 (0,335)
MYE	TRIS	8,0	193,3 (2,7)	4,77 (0,214)
MYE	TRIS	8,5	216,7 (9,6)	4,41 (0,372)

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10E5 cellules/ml.

En grisé, pH permettant à la fois le meilleur TG et la meilleure PM

**Tableaux C15 & C16 : Analyse statistique des temps de génération de
T. thermophila BIII obtenus avec différents pH de milieu de culture**

Tableau C15 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
pH	9	22129,77	2458,86	56,21 (TS)	2,4
Var. Résiduelle	20	874,82	43,74		
Var. Totale	29	23004,59	793,26		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les temps de génération, cf Tab.Ann.I.22)

Tableau C16 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Milieu	Tampon	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes homogènes
pH	YEG	MES	5,5	224,8	11,7	A
	MYE	TRIS	8,5	216,7	9,6	A
	YEG	MES	6	215,5	8,9	A
	MYE	TRIS	8	193,7	2,7	B
	YEG	MES	6,5	165,8	6,5	C
	MYE	TRIS	7,5	165,6	2,0	C
	MYE	MOPS	6,5qua	164,7	6,4	C
	YEG	MOPS	6,5bis	162,2	4,3	C
	MYE	MES	6,5ter	154,7	3,4	C
	MYE	MOPS	7	148,4	2,7	D

**Tableaux Annexe C17 & C18 : Analyse statistique des populations maximales
T. thermophila BIII obtenues avec différents pH de milieu de culture**

Tableau C17 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
pH	9	35,79	3,98	75,71 (TS)	2,4
Var. Résiduelle	20	1,05	0,05		
Var. Totale	29	36,84	1,27		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les populations maximales, cf Tab. Ann. I.22)

Tableau C18 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Milieu	Tampon	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes homogènes
pH	MYE	MOPS	6,5qua	5,99	0,085	A
	MYE	MOPS	7,0	5,97	0,012	A
	MYE	MES	6,5ter	5,69	0,070	A B
	MYE	TRIS	7,5	5,33	0,335	B
	MYE	TRIS	8,0	4,77	0,214	C
	MYE	TRIS	8,5	4,41	0,372	C
	YEG	MES	6,5	3,54	0,125	D
	YEG	MOPS	6,5bis	3,48	0,353	D
	YEG	MES	6	3,29	0,180	D
	YEG	MOPS	5,5	3,11	0,208	D

Tableau C19 : Temps de génération et populations maximales de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différentes températures d'incubation
Moyenne de trois expérimentations. Ecart-type entre parenthèses

Température (°C)	TG	PM
25	144 (1,2)	10,6 (0,55)
28	128,7 (1,6)	9,87 (0,12)
31	125,3 (4,6)	7,78 (0,28)
34	114,7 (2,6)	7,23 (0,32)
37	128,7 (0,8)	5,62 (0,33)

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10E5 cellules/ml.

En grisé, mode permettant *a priori* à la fois le meilleur TG et la meilleure PM

**Tableaux C20 & C21 : Analyse statistique des temps de génération de
T. thermophila BIII obtenus avec différentes températures d'incubation**

Tableau C20 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
Température	10	1321,80	330,45	51,36 (TS)	3,48
Var. Résiduelle	4	64,34	6,43		
Var. Totale	14	1386,14	99,01		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les temps de génération, cf Tab. Ann. I.23)

228

Tableau C21 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes homogènes
Température	25	144,0	1,2	A
	28	128,7	1,6	B
	37	128,7	0,8	B
	31	125,3	4,6	B
	34	114,7	2,6	C

**Tableaux C22 & C23 : Analyse statistique des populations maximales de
T. thermophila BIII obtenus avec différentes températures d'incubation**

Tableau C22 : Analyse de variance

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique 5%
Température	10	48,82	12,21	106,17 (TS)	3,48
Var. Résiduelle	4	1,15	0,11		
Var. Totale	14	49,97	3,57		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les populations maximales, cf Tab. Ann. I.23)

Tableau C23 : Test de Newman et Keuls (seuil : 5%)

Facteur	Libellé	Moyenne	Ecart-type	Groupes homogènes
Température	25	10,6	0,55	A
	28	9,87	0,12	B
	37	7,78	0,28	C
	31	7,23	0,32	C
	34	5,62	0,33	D

Tableau C24 : Cinétique de croissance et de production protéasique de *T. Thermophila BIII* en fermenteur de 2 litres sur milieu MYE

Moyenne de trois essais

Temps (h)	Act. protéasique (mU /mL)	Ecart-type	Densité cellulaire (Nombre de cell./ml)	Ecart-type	Activité spécifique (μU/cellule)
0,00	59,3	6,3	3,34E+04	3,52E+03	1,78
1,50	56,1	5,8	4,21E+04	1,41E+02	1,33
3,00	71,4	8,7	6,03E+04	4,78E+03	1,19
4,00	87,4	8,5	8,99E+04	1,79E+04	0,97
5,00	82,5	12,2	1,39E+05	4,73E+03	0,59
5,50	85,6	16,6	1,78E+05	2,04E+04	0,48
6,50	149,3	12,6	2,50E+05	5,22E+04	0,60
7,00	124,4	15,4	2,94E+05	3,46E+04	0,42
7,75	140,4	17,9	4,26E+05	1,27E+05	0,33
19,75	195,9	13,3	1,01E+06	2,47E+05	0,19
21,75	265,8	12,6	1,93E+06	3,04E+05	0,14
22,50	278,1	17,1	2,08E+06	6,65E+05	0,13
23,50	285,0	26,8	2,11E+06	5,70E+05	0,13
24,50	307,5	42,5	2,05E+06	2,23E+05	0,15
25,50	365,6	60,2	3,05E+06	9,90E+04	0,12
26,50	378,1	36,0	2,58E+06	1,07E+06	0,15
27,50	496,0	35,3	2,12E+06	4,74E+05	0,23

Tableau C25 : Cinétique de croissance et de production protéasique de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu PPYS

Moyenne de trois essais

Temps (h)	Act. protéasique (mU/ mL)	Ecart-type	Densité cellulaire (Nombre de cellules/ml)	Ecart-type	Activité spécifique (μU/cellule)
0,00	116,7	5,3	3,23E+04	1,25E+03	3,61
1,00	112,7	7,3	5,02E+04	1,41E+03	2,24
2,00	113,6	10,2	7,77E+04	1,45E+04	1,46
3,00	83,2	20,6	7,96E+04	1,17E+04	1,05
4,00	108,3	21,9	1,07E+05	1,86E+04	1,01
5,00	99,1	26,7	1,30E+05	1,63E+04	0,76
6,00	95,7	30,9	1,82E+05	2,12E+03	0,53
6,50	120,8	14,9	2,13E+05	2,12E+04	0,57
7,00	58,3	12,4	2,77E+05	5,60E+04	0,21
7,50	67,7	11,9	3,17E+05	7,74E+04	0,21
11,00	128,7	21,2	6,60E+05	1,17E+05	0,20
21,00	205,7	23,4	1,01E+06	1,68E+05	0,20
23,00	398,9	29,9	2,00E+06	1,55E+05	0,20
24,00	407,8	23,4	1,79E+06	1,34E+05	0,23
25,00	456,3	22,0	2,09E+06	1,70E+05	0,22
26,00	493,9	24,7	1,78E+06	5,16E+05	0,28
27,00	497,1	22,2	1,66E+06	4,84E+05	0,30
28,00	499,6	38,5	1,62E+06	1,34E+05	0,31

Tableau C26 : Cinétique de croissance et de production protéasique de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu YEG
Moyenne de trois essais

Temps (h)	Act. protéasique (mU mL)	Ecart-type	Densité cellulaire (Nombre de cell./ml)	Ecart-type	Activité spécifique (μU/cellule)
0,00	48,2	4,3	2,30E+03	3,85E+02	21,01
3,00	59,3	5,2	1,29E+04	2,48E+03	4,60
4,00	79,2	6,5	1,82E+04	2,01E+03	4,35
5,00	88,4	12,8	2,14E+04	5,94E+03	4,13
6,00	96,8	15,8	2,52E+04	4,51E+03	3,85
6,50	97,2	18,1	3,62E+04	2,56E+03	2,69
7,50	77,4	15,4	5,32E+04	4,35E+03	1,45
20,50	69,9	12,7	1,77E+05	2,55E+04	0,39
23,50	93,5	18,9	2,82E+05	1,00E+05	0,33
26,00	97,8	23,3	3,05E+05	3,74E+04	0,32
29,00	103,0	12,5	6,00E+05	4,12E+04	0,17
30,00	105,4	15,4	6,66E+05	2,12E+04	0,16
30,50	104,6	24,4	6,67E+05	2,07E+04	0,16
31,00	145,1	18,9	1,06E+06	2,30E+05	0,14
45,50	152,3	25,2	1,45E+06	5,30E+05	0,11
48,00	195,6	22,1	1,61E+06	1,77E+05	0,12
50,00	269,5	18,9	1,34E+06	2,12E+05	0,20

Tableau C27 : Cinétique de croissance et de production protéasique de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu YEM

Moyenne de trois essais

Temps (h)	Act. protéasique (mU /mL)	Ecart-type	Densité cellulaire (nombre de cellules/ml)	Ecart-type	Activité spécifique (μU/cellule)
0,00	6,3	2,2	1,97E+04	2,04E+03	0,32
1,42	9,6	3,2	6,09E+04	1,82E+04	0,16
4,17	13,2	2,7	1,04E+05	3,57E+04	0,13
4,58	16,8	5,3	1,28E+05	2,30E+04	0,13
5,08	15,5	6,8	1,31E+05	2,08E+03	0,12
5,33	13,9	4,7	1,45E+05	2,01E+04	0,10
5,92	17,4	8,2	1,59E+05	1,39E+04	0,11
6,67	19,1	9,7	1,89E+05	1,53E+04	0,10
8,00	27,9	8,9	3,49E+05	1,60E+04	0,08
9,00	52,5	13,6	4,45E+05	3,17E+04	0,12
15,00	83,6	16,6	7,77E+05	1,32E+05	0,11
23,42	80,9	23,2	6,89E+05	2,89E+04	0,12
24,42	126,6	25,8	8,05E+05	6,12E+04	0,16
26,00	158,8	29,6	9,54E+05	1,98E+05	0,17
28,50	138,3	22,1	9,59E+05	8,56E+04	0,14
31,00	152,9	31,6	1,07E+06	1,12E+05	0,14
31,75	176,2	38,6	1,35E+06	2,03E+05	0,13
32,50	193,7	32,5	1,77E+06	7,02E+05	0,11
33,50	242,5	37,3	1,38E+06	2,77E+05	0,18
35,00	273,6	38,2	1,22E+06	1,77E+05	0,22

Tableau C28 : Cinétique de croissance et de production protéasique de *T. thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu YEP
Moyenne de trois essais

Temps (h)	Act. protéasique (mU/ mL)	Ecart-type	Densité cellulaire (Nombre de cellules/mL)	Ecart-type	Activité spécifique (μU/cellule)
0,00	10,2	1,9	1,77E+04	2,03E+03	0,58
1,00	7,5	1,5	1,95E+04	4,76E+03	0,38
4,00	10,4	2,0	5,75E+04	3,75E+03	0,18
5,00	13,3	2,6	8,92E+04	8,91E+03	0,15
6,00	15,7	2,8	1,50E+05	4,95E+04	0,11
7,00	27,9	3,6	2,05E+05	2,13E+04	0,14
8,08	30,8	3,9	2,96E+05	2,23E+04	0,10
10,75	33,4	4,0	3,23E+05	2,49E+04	0,10
11,00	34,7	6,0	3,50E+05	2,33E+04	0,10
15,00	63,8	5,0	4,78E+05	3,65E+04	0,13
21,00	193,5	17,5	1,01E+06	9,89E+04	0,19
22,25	287,8	18,8	1,43E+06	1,03E+05	0,20
23,50	285,6	26,3	1,01E+06	9,65E+04	0,28
24,00	302,2	27,2	9,51E+05	1,11E+05	0,32

Tableau C29 : Cinétiques de croissance et de production glycosidasiques de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu YEG

Moyenne de deux (activité protéasique) ou trois (densité cellulaire) essais

Temps (h)	Act.sur amidon (mU/mL)	Act.sur pullulan (mU/mL)	Densité cellulaire (Nombre de cellules/mL)	Ecart-type	A.S.sur amidon (μU/cellule)	A.S. sur pullulan (μU/cellule)
0,00	28,95	35,88	1,21E+04	1,00E+03	2,39	2,97
2,50	19,36	18,23	1,47E+04	5,32E+03	1,32	1,24
3,33			2,07E+04	6,26E+03		
5,17			4,93E+04	6,03E+03		
5,58			5,06E+04	9,58E+03		
6,08	17,80	15,02	5,50E+04	5,06E+03	0,32	0,27
6,67	20,30	14,28	5,84E+04	6,14E+03	0,35	0,24
8,25	40,15	15,62	6,70E+04	6,35E+03	0,60	0,23
9,50	59,00	12,54	8,90E+04	9,85E+03	0,66	0,14
10,75	89,00	17,25	1,25E+05	3,98E+04	0,71	0,14
23,33	373,36	40,92	5,50E+05	8,33E+04	0,68	0,07
24,17	472,38	89,12	7,78E+05	1,65E+05	0,61	0,11
24,67	492,85	99,73	7,73E+05	2,34E+05	0,64	0,13
26,50	535,41	101,40	8,45E+05	4,22E+05	0,63	0,12
27,00	579,80	105,39	1,09E+06	3,98E+05	0,53	0,10
27,50	566,08	103,00	8,11E+05	7,67E+04	0,70	0,13
28,08	587,00	144,07	7,21E+05	2,40E+05	0,81	0,20
29,00	610,40	152,22	7,12E+05	3,48E+05	0,86	0,21

Tableau C30 : Cinétiques de croissance et de production glycosidasiques de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres sur milieu YEX

Moyenne de deux (activité protéasique) trois (densité cellulaire) essais

Temps (h)	Act.sur amidon (mU/mL)	Act.sur pullulan (mU/mL)	Densité cellulaire (Nombre de cellules/mL)	Ecart-type	A.S.sur amidon (μU/cellule)	A.S. sur pullulan (μU/cellule)
0,00	52,20	27,95	5,46E+03	3,09E+02	9,57	5,12
1,75	39,47	21,51	6,58E+03	2,15E+02	5,99	3,27
2,75	57,93	26,12	1,37E+04	1,94E+03	4,24	1,91
3,33	40,67	11,27	1,20E+04	3,01E+03	3,38	0,94
4,25			1,41E+04	2,27E+03		
5,25			1,82E+04	4,14E+03		
6,25			2,25E+04	5,31E+03		
7,25	85,38	21,98	2,40E+04	6,09E+03	3,56	0,92
10,00	89,60	27,70	4,40E+04	7,31E+03	2,04	0,63
11,50	45,80	23,80	6,00E+04	7,77E+03	0,76	0,40
19,75	35,71	19,46	2,28E+05	5,35E+04	0,16	0,09
20,75	32,50		2,49E+05	5,94E+04	0,13	
22,08	48,20		2,65E+05	6,38E+04	0,18	
22,92			2,49E+05	7,14E+04		
23,75			3,06E+05	8,31E+04		
25,33	105,23	99,36	2,96E+05	9,87E+04	0,36	0,34

Tableau C31 : Cinétiques de croissance et de lyse cellulaire (apparition d'activité hexokinase), de production d'activités glycosidasiques et d'activité protéasique en relation avec la consommation des protéines

Suivi réalisé sur une culture de *T. Thermophila* BIII en fermenteur de 2 litres - Moyenne de deux essais.

Temps (heures)	Densité cellulaire (cellules/ml)	Protéines (µg/ml)	Act. protéasique (mU/ml)	Act. glycosidasique (mU /ml)		Act. hexokinase (mU/ml)
				sur amidon	sur pullulan	
0,00	2,59E+04	98,2	4,9	0,0	7,6	44,5
1,75	2,42E+05	54,3	11,1	4,7	35,2	32,4
4,17	6,56E+04	33,2	15,9	9,1	52,1	110,3
6,17	2,57E+05	24,2	17,9	17,5	45,5	194,5
6,75	4,01E+05	20,4			21,1	191,7
7,33	5,57E+05	16,7	10,7	80,4	75,6	197,2
7,75	8,91E+05	14,6	16,6	92,5	59,2	132,4
9,75	9,98E+05	13,8	16,9			148,5
12,00	1,12E+06	10,9				150,0
22,83	1,88E+06	3,0	150,1	183,1	93,4	232,4
23,08	1,61E+06	3,1	159,2	207,0	109,9	259,3
23,92	1,99E+06	4,2		179,3	108,5	275,0
24,58	1,96E+06	4,5	189,5	203,2	94,4	333,7
25,75	1,63E+06	9,0	288,9	323,2	132,4	680,7
30,00	1,57E+06	6,3	343,7	397,7	205,8	1750,3

Tableau C32 : Comparaison des productions finales d'activité enzymatique par *T. Thermophila* BIII après concentration des milieux en fin de culture

Milieu de culture	Population maximale	Activité protéasique (mU/ml)	Activité glycosidasique (mU/ml)	
			sur amidon	sur pullulane
MYE	3,30E+06	986	1032	133
PPYS	2,35E+06	833	1198	62
YEG	1,73E+06	501	5268	926
YEP	1,00E+06	720	1070	290
YEX	1,42E+06	380	1850	1235
YEM	1,77E+06	678	1000	365

Tableau C33 : Influence de la régulation du pH sur la croissance et la production protéasique de *Tetrahymena thermophila* BIII

Culture en fermenteur de 2 litres sur milieu MYE - Moyenne de deux essais.

Temps (heures)	Densité cellulaire (cellule /ml)		p H		Activité protéasique (nU /ml)		Pression partielle d'oxygène (%)	
	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée
0	2,17E+04	1,87E+04	6,75	6,88	3,1	5,2	100	100
2	3,25E+04	3,06E+04	6,71	6,79	10,2	7,2	90,56	92,22
4	5,96E+04	5,51E+04	6,82	6,81	10,4	6,4	82,07	84,52
5	7,57E+04	8,37E+04	6,82	6,92	16,9	7,5	77,42	76,19
6	1,03E+05	1,18E+05	6,80	6,95	13,3	13,4	66,36	71,54
8	2,17E+05	1,96E+05	6,93	6,98		18,5	43,99	52,98
8,5	2,30E+05	2,30E+05		6,71	17,5	19,8	42,5	49,21
23	6,51E+05	2,07E+06	7,74	6,75	18,0	52,5	14,99	22,13
24	7,65E+05	1,78E+06	7,76	6,79	27,8	56,3	9,256	17,88
26	1,00E+06	1,69E+06	7,79	6,81	38,5	82,4	6,213	12,47
28	1,17E+06	2,00E+06	7,88	6,82	51,0	98,4	5,087	10,56
30	1,35E+06	1,96E+06	8,01	6,85	119,0	107,6	5,193	10,13
46	1,72E+06		8,27	6,92	184,0	142,1	8,23	9,36
48	1,48E+06	2,33E+06	8,32	6,74		146,4	9,022	11,23
51	1,57E+06	2,33E+06	8,41	6,74	208,9	140,3	15,22	12,25
55	1,49E+06	2,35E+06	8,43	6,69	223,2	128,9	17,11	12,38
76	6,80E+05	2,67E+06	8,71	6,73	298,2	118,3	25,36	12,02
100	1,33E+04	2,58E+06	8,97	6,84		146,6	53,25	11,14
118		2,46E+06	9,12	6,89		138,3	69,89	10,95
120	2,16E+03	2,40E+06	9,23	6,92	393,7	135,5	74,21	10,28
127	1,16E+03	2,24E+06	9,36	6,9	397,7	122,7	72,22	9,67
142		2,26E+06		6,9		139,3		9,88
151		2,32E+06		6,9		143,0		9,23
166		2,12E+06		6,8		149,0		9,56
168		1,91E+06		6,7		145,0		9,32

Tableau C34 : Influence de la régulation de l'apport en oxygène sur la croissance et la production protéasique de *Tetrahymena thermophila*
 Culture en fermenteur de 2 litres - Milieu MYE - Moyenne de deux essais

Temps (heures)	Densité cellulaire (cellules /ml)		p O ₂ (%)		p H		Activité protéasique (mU/ ml)	
	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée	Fermentation témoin	Fermentation régulée
0	2,17E+04	1,07E+04	100,00	100,00	6,75	6,83	3,1	15,3
2	3,25E+04	1,41E+04	90,56	99,98	6,71	6,88	10,2	14,9
4	5,96E+04	2,59E+04	82,07	99,93	6,82	6,96	10,4	15,7
5	7,57E+04		77,42		6,82		16,9	
6	1,03E+05	5,56E+04	66,36	91,52	6,8	7,02	13,3	17,2
8	2,17E+05	9,93E+04	43,99	84,45	6,93	7,11		18,6
9	2,30E+05	1,12E+05		83,56		7,16	17,5	19,3
14		2,89E+05		71,46		7,24		20,9
15		3,56E+05		69,46		7,31		21,5
16		3,74E+05		73,58		7,36		35,2
17		4,48E+05		72,53		7,40		38,1
18		5,42E+05		66,69		7,48		33,8
20		7,54E+05		44,81		7,56		89,4
21		8,96E+05		35,70		7,57		57,7
22		9,94E+05		29,43		7,63		59,2
23	6,51E+05	1,13E+06	14,99	27,76	7,74	7,67	18,0	61,0
24	7,65E+05	1,32E+06	9,26	26,23	7,76	7,71	27,8	84,2
26	1,00E+06	1,51E+06	6,21	24,11	7,79	7,75	38,5	88,6
28	1,17E+06	1,71E+06	5,09	22,12	7,88	7,84	51,0	105,9
30	1,35E+06	1,78E+06	5,19	20,86	8,01	7,96	119,0	124,8
39		1,98E+06		44,38		8,05		238,1
40		2,07E+06		47,39		8,14		250,8
41		2,02E+06		49,90		8,16		299,5
42		2,11E+06		50,39		8,19		319,3
44		1,87E+06		57,64		8,23		369,1
45		1,83E+06		61,56		8,20		339,0
46	1,72E+06	1,82E+06	8,23	58,62	8,27	8,21	184,0	350,4
47		1,78E+06	13,78	58,10	8,32	8,24		382,9
48	1,48E+06		9,02		8,39			
51	1,57E+06		15,22		8,41		208,9	
55	1,49E+06		17,11		8,43		223,2	
63	4,99E+05	2,65E+05	14,55	85,92	8,48	8,37	256,2	428,6
64		1,87E+05	16,33	85,86		8,37	265,3	441,8

Tableau C35 : Temps de génération, populations maximales, activités protéasiques et KL.a de *Tetrahymena thermophila* BIII obtenus avec différentes conditions d'aération et d'agitation

Moyennes de trois expérimentations - Ecart-types entre parenthèses

Aération (vvm) Agitation (tours.min.-1)	0, 5				1, 0				1, 5				2, 0			
	TG	PM	KLa	AP	TG	PM	KLa	AP	TG	PM	KLa	AP	TG	PM	KLa	AP
0	117,3	1,24		39,3	113,7	1,96		154,8	140,3	2,24	52,00	218,7	133,9	2,07		393,5
					(1,2)	(0,10)		(20,4)	(11,0)	(0,10)			(21,1)	(0,23)		
200	158,4	1,45		108,1	110,2	2,11	14,1	102,9	136,4	2,10	26,50	113,1	140,4	2,19	31,60	107,4
300	124,2	2,18	20,5	129,6	99,3	1,43	25,0	111,9	109,7	2,41	33,90	381,5	127,9	2,55		454,9
		(0,35)			(15,4)	(0,22)	(4,0)	(14,8)					(9,9)	(0,31)		
400	104,1	2,10	24,4	114,3	117,4	2,48	34,8	140,9	118,6	2,82		150,4	131,70	2,75	39,80	204,7
					(10,9)	(0,07)		(14,6)	(4,0)	(0,21)				(0,13)		
500	122,4	2,64		140,3	122,1	2,08		344,6	144,6	3,16		331,1	119,60	2,87		273,0
									(14,4)	(0,19)			(10,1)	(0,11)		(36,5)

AP : Activité protéasique à pH4,5 en mU/ml

TG : temps de génération exprimé en minute.

PM : population maximale exprimée en 10⁶ cellules/ml.

Tableaux C36-C37-C38 : Analyse statistique des temps de génération de *T. thermophila* BIII obtenus sur le milieu MYE avec différentes conditions d'aération et d'agitation

Tableau C36 : Analyse de variance des temps de génération de *T. thermophila* BIII obtenus sur le milieu MYE avec différentes conditions d'aération et d'agitation

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique (5%)
Agitation	4	1915,633	478,9	2,79 (S)	2,69
Aération	3	2764,182	921,4	5,30 (S)	2,92
Interaction agitation/aération	12	5614,816	467,9		
Var. Résiduelle	30	27042,2	901,4		
Var. Totale	49	37336,8	762,0		

DDL : degrés de liberté

SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif

S : significatif

TS : très significatif

(Pour les temps de génération, cf Tab. Ann. I.34)

Tableau C37 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche du temps de génération le plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différentes conditions d'aération et d'agitation en milieu MYE - Résultats intermédiaires

aération (vvm) agitation (RPM)	0,5	1	1,5	2
0	125,4	125,4 <u>-12,8</u>	125,4	125,4
200	125,4 10,9 19	125,4 10,9 <u>-12,8</u>	125,4 10,9	125,4 10,9
300	125,4 17,8	125,4 <u>-12,8</u>	125,4 -14	125,4
400	125,4 -16,9	125,4 <u>-12,8</u>	125,4	125,4
500	125,4 -7,8	125,4 <u>-12,8</u>	125,4	125,4

Constante 125,4

Coefficient dû à l'agitation

Coefficient dû à l'aération

Coefficient dû à l'interaction

Tableau C38 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche du temps de génération le plus faible pour *T. Thermophila* BIII pour différentes conditions d'aération et d'agitation sur milieu MYE - Résultats finaux

aération (vvm) agitation (RPM)	0,5	1	1,5	2
0	125,4	112,6	125,4	125,4
200	155,3	123,5	136,3	136,3
300	143,2	112,6	111,4	125,4
400	108,5	112,6	125,4	125,4
500	117,6	112,6	125,4	125,4

En gris le meilleur résultat

Tableaux C39-C40-C41 : Analyse statistique des temps de génération de *T. thermophila* BIII obtenus sur le milieu MYE avec différentes conditions d'aération et d'agitation

Tableau 39 : Analyse de variance des populations maximales de *T. thermophila* BIII obtenues sur le milieu MYE avec différentes conditions d'aération et d'agitation

Source de variation	DDL	SCE	Carrés moyens	Test F (signification)	F théorique (5%)
Agitation	4	4,868	1,217	25,44 (S)	2,69
Aération	3	3,652	1,217	25,45 (S)	2,92
Interaction agitation/aération	12	2,788	0,232		
Var. Résiduelle	30	1,435	0,048		
Var. Totale	49	12,7	0,26		

DDL : degrés de liberté
SCE : somme des carrés des écarts

NS : non significatif
S : significatif
TS : très significatif

(Pour les temps de génération, cf Tab. Ann. I.12)

Tableau C40 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche de la population maximale la plus élevée pour *T. Thermophila* BIII pour différentes conditions d'aération et d'agitation en milieu MYE - Résultats intermédiaires

aération (vvm) agitation (RPM)	0,5	1	1,5	2
0	2,24 -0,36 <u>-0,32</u> -0,32	2,24 -0,36 <u>-0,23</u> 0,31	2,24 -0,36 <u>0,3</u>	2,24 -0,36 <u>0,24</u>
200	2,24 -0,28 <u>-0,32</u>	2,24 -0,28 <u>-0,23</u> 0,37	2,24 -0,28 <u>0,3</u>	2,24 -0,28 <u>0,24</u>
300	2,24 -0,32 0,36	2,24 -0,23 -0,48	2,24 <u>0,3</u>	2,24 <u>0,24</u>
400	2,24 0,29 -0,32	2,24 0,29 -0,23	2,24 0,29 <u>0,3</u>	2,24 0,29 <u>0,24</u>
500	2,24 0,44 <u>-0,32</u> 0,27	2,24 0,44 <u>-0,23</u> -0,38	2,24 0,44 <u>0,3</u>	2,24 0,44 <u>0,24</u>

Constante modalité 0
Coefficient dû à l'agitation
Coefficient dû à l'aération
Coefficient dû à l'interaction

Tableau C41 : Application de la méthode d'ajustement des moindres carrés à la recherche de la population maximale la plus élevée pour *T. Thermophila* BIII pour différentes conditions d'aération et d'agitation sur milieu MYE - Résultats finaux

aération (vvm) agitation (RPM)	0,5	1	1,5	2
0	1,24	1,96	2,18	2,12
200	1,64	2,10	2,26	2,20
300	2,28	1,53	2,54	2,48
400	2,21	2,30	2,83	2,77
500	2,63	2,07	2,98	2,92

En grisé le meilleur résultat

Tableau C42 : Suivi de la croissance cellulaire et de paramètres biochimiques lors d'une culture en continu avec membrane de microfiltration de *T. Thermophila* .

Fermenteur de 2 litres - Milieu MYE - Débit : 1,6 lh-1

Temps (heures)	Densité cellulaire (cell./ml)	Activité		Activité hexokinase (mU/ml) surnageant	Protéines (µg/ml) surnageant
		(mU/ surnageant)	protéasique (ml) perméat		
0	3,22E+04	0,0	50,9	1546	386,92
2,5	8,52E+04	38,7	62,9	1304	358,9
4,5	9,60E+04	83,5	243,5	1209	117,76
6	3,67E+05	240,0	517,8	1066	130,84
22,5	4,88E+06	387,1	788,6	855	110,28
29,5	1,31E+07	338,1	828,8	854	125,23
52	1,24E+07	385,3	851,3	920	151,40
100,5	1,05E+07	358,2	892,9	1209	185,05
123,5	1,15E+07	506,2	914,2	1462	

ANNEXE D : PUBLICATION



Industrial media and fermentation processes for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophila* BIII

J de Coninck¹, S Bouquelet², V Dumortier¹, F Duyme³ and I Verdier-Denantes¹

¹Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire de Microbiologie des Fermentations, 41 rue du Port, 59046 Lille Cedex, France; ²Université des Sciences et Technologies de Lille, Laboratoire de Chimie Biologique, UMR CNRS 8576, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; ³Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire d'Informatique et de Statistique, 41 rue du Port, 59046 Lille Cedex, France

Tetrahymena thermophila was cultivated on industrial by-product media. The composition of the best medium (with milk proteins) was optimised by a central composite design for growth and protease secretion. The optimal combination [1.07% (w/v) of yeast extract and 0.99% (w/v) of skimmed milk] improved biomass production by 46%. In a fermentation strategy, the pH must be regulated to produce no cell damage, lengthening the stationary phase and resulting in a more abundant protease production. To increase cell concentration and protease secretion, a continuous culture with cell recycling by microfiltration was successfully tested on ciliated protozoa. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2000) 24, 285–290.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*; industrial media; fermentation process; protease secretion

Introduction

The potential of protozoa as sources of commercially produced enzymes is clearly established [20]. Among ciliated protozoa, *Tetrahymena* has a biotechnological potential, particularly in the secretion of digestive hydrolases [13]. North [15] reported that *Tetrahymena* produced specific proteases with high activity rates in eucaryotic organisms. To date, they have not been exploited as sources of enzymes for industrial production and use. An explanation for this under utilisation is that protozoa are more difficult to culture on a large scale than bacteria or fungi.

Studies have been conducted to obtain mass cultures of *Tetrahymena* and to develop industrial axenic media [2,8,18]. But only a few fermentation strategies yielding biomass comparable to bacteria and yeast cultures have been developed for this organism.

In this study, we were interested in optimising growth of *Tetrahymena thermophila* on industrial media, improving the secretion of enzymes, especially proteases, and developing a fermentation strategy for this production.

Materials and methods

Strain and cultivation

Tetrahymena thermophila BIII was obtained from the Carlsberg Institute, Copenhagen. Batch fermentations were carried out in 2, 20 or 100-L fermentors (Biolafitte, Saint Germain en Laye, France) with turbine impellers and equipped with digital control units. The stirrer speed was

limited to 300 rpm to avoid cell damage. The temperature was kept constant at 28°C. Aeration rate was maintained at 1 vvm. Working volumes were 1 L for 2-L fermentors, 12 L for 20-L fermentors and 60 L for 100-L fermentors. All experiments, except scaling-up, were carried out in 2-L fermentors. Before experimentation, cells were adapted to the different media by successive cultivations in 125-ml flasks with 10 ml medium over 1 week. For culture in 2-L fermentors, cells were cultivated in 1-L Erlenmeyer flasks with 100 ml medium before being inoculated into the 2-L fermentor. Inocula were always exponentially growing cultures to obtain 10 000 cells ml⁻¹ in the fresh medium.

Media

Mye medium [18] was composed of 1% w/v yeast extract and 1% w/v skimmed milk, Ppys medium contained 0.75% w/v yeast extract, 0.75% w/v proteose peptone and salts [16]. Yeg medium contained 1% w/v yeast extract and 0.5% glucose [5]. Yex medium contained 1% w/v yeast extract and 4.5% w/v maltodextrins (glucidex 12^R, Roquette Freres, Lestrem, France). Yep medium contained 1% w/v yeast extract and 0.3% w/v potatoe solubles (Roquette Freres). Yem medium contained 1% w/v yeast extract and 0.3% w/v corn soluble (Roquette Freres). Fermentors containing 1 L of medium with 0.001% v/v anti-foam (Sigma, St Quentin Fallavier, France, ref. A6426) were autoclaved for 25 min at 120°C.

Cell count and statistical analysis

Cell were counted electronically (Coulter counter Z1, Beckman Coulter France, Roissy CDG, France). Experiments were planned to use a variance analysis followed if necessary by the Newman–Keuls test [6,14]. When the variance analysis concluded that the results media were statistically different, the Newman–Keuls test enabled us to

Correspondence: J de Coninck, Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire de Microbiologie des Fermentations, 41 rue du Port, 59046 Lille Cedex, France. E-mail: j.deconinck@isa.fupl.asso.fr
Received 28 July 1999; accepted 20 January 2000

classify and to determine groups of averages. In each group, the averages are not considered different.

A central composite design was adopted to assess the combined effect of yeast extract and skimmed milk on generation time and maximal population (Table 1).

Data obtained were analysed by multiple regression using Minitab [11] software and the following equation—called a response model—was established to fit the data and calculate the optimal combination of yeast extract and skimmed milk:

$$y = b_0 + b_1(\text{YE}) + b_2(\text{MI}) + b_3(\text{YE})^2 + b_4(\text{MI})^2 + b_5(\text{YE})(\text{MI}) + \epsilon$$

y: generation time (min) or maximal population (10^6 cells ml^{-1}); b_0 to b_5 : regression coefficients of the model; (YE): yeast extract in % w/v; (MI): skimmed milk in % w/v; (YE)(MI): interaction term; ϵ : error term (residual) supposed to be of null expected value and constant variance for the requirement for hypothesis testing. First partial derivatives were calculated to obtain optimal values or confidence regions of optimal values when simulation was necessary.

Enzyme assay

Protease secretion: The cells were removed from the medium by centrifugation at 16°C for 30 min at $300 \times g$ (to avoid damaging cells). The proteolytic activity in the cell-free supernatant was measured spectrophotometrically using hemoglobin as the substrate with modifications to the procedure of Beynon and Bond [1]. The buffer was 0.2 M acetic acid–sodium acetate, pH 4.5. Substrate (1 ml) was added to 0.2 ml cell-free supernatant. After incubation at 55°C for 20 min, the reaction was stopped by adding 2 ml trichloroacetic acid (5% v/v). After 30 min, precipitates were removed by centrifugation at $4500 \times g$ for 20 min and tyrosine was assayed as described previously [17]. The proteolytic unit corresponds to the amount of enzyme required for the release of 1 μmole of tyrosine per minute. Results were expressed as milliproteolytic units per ml (mU ml^{-1}).

Hexokinase assay (HK): HK was selected as a marker enzyme for the estimation of cell damage due to its high activity in the cytosol and good stability. HK activity was measured spectrophotometrically using glucose as the substrate according to the method of Kunst *et al* [10] in the presence of ATP and NADP at pH 7.6. Global HK activity in cultures was measured after lysis of cells. HK activity in the cell-free supernatant was measured after

Table 1 Levels of combined factors chosen for the central composite design

	Yeast extract (% w/v)	Skimmed milk (% w/v)
Minimum	0.5	1.0
Maximum	1.5	2.0

removal of the cells from the medium by centrifugation at 16°C for 30 min at $300 \times g$ (to avoid damaging cells).

Substrate (0.5 ml) was added to 0.5 ml of cell-free supernatant. After incubation at 25°C for 20 min, the reaction was stopped by heating the mixture to 100°C for 2 min. Then the reaction product, glucose-6-phosphate, was oxidized by 1.0 ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. After a 20-min incubation at 25°C, NADPH was determined spectrophotometrically at 340 nm. One HK unit corresponds to the amount of enzyme required for the release of 1 mmole of NADPH or glucose per minute. Results were expressed as millihexokinase units per ml (mU ml^{-1}).

Results

Mass culture improvement

In the first stage, simplification of the media led to use of a medium containing only yeast extract as nitrogen and nucleotide source. In the second stage, to improve biomass production, addition of the following components was tested: glucose, skimmed milk, maltodextrins and potato or corn solubles.

Maximal populations in skimmed milk-based medium (Figure 1) were improved by 30% and generation times were shortened. The Newman–Keuls test indicated that Mye was the best medium for maximal cell production and in the same group of averages, generation times were shortened in Mye, Yem and Ppys.

Mye composition was optimised with a central composite design. Models of response surfaces (Figure 2) were determined using a multiple regression analysis (Table 2). Regression models could only be used between the levels

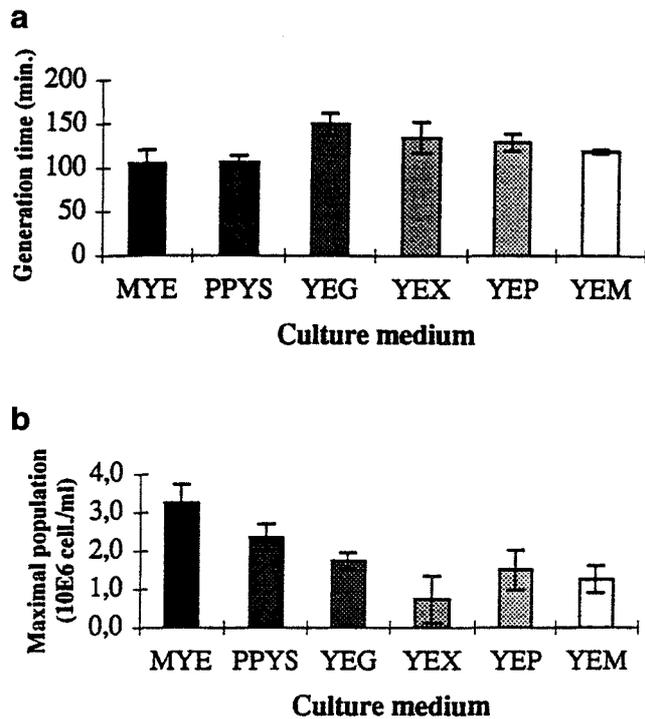


Figure 1 *Tetrahymena thermophila* growth: maximal populations (a) and generation times (b) on complex media.

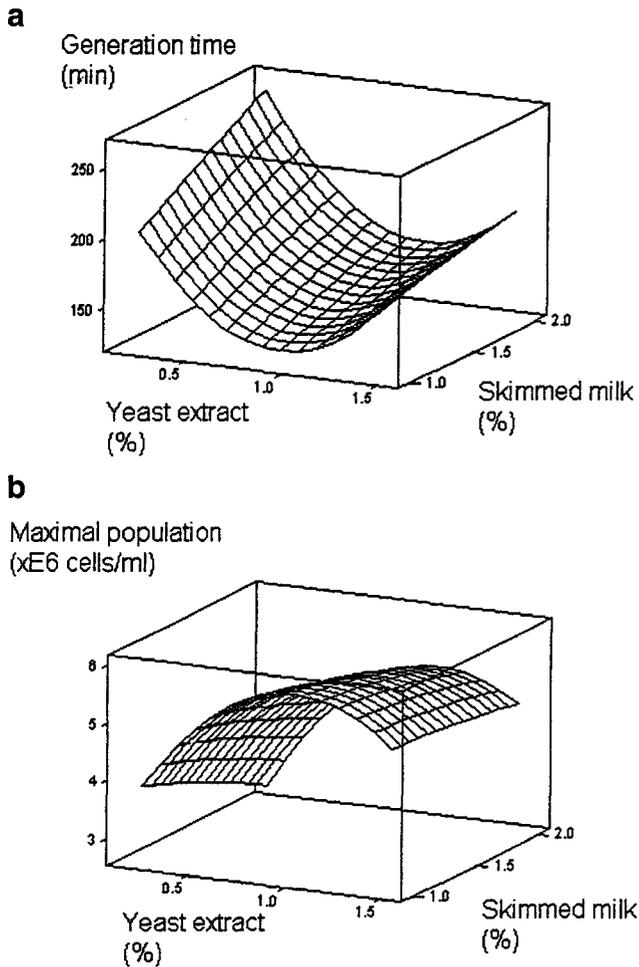


Figure 2 Response surfaces obtained for (a) generation time and (b) maximal population by means of central composite design for each combination of yeast extract and skimmed milk.

Table 2 Regression models linking generation time (min), maximal population (10^6 cells ml^{-1}) and skimmed milk and yeast extract (coefficient rounded)

Combined factors	Regression equation
Skimmed milk and yeast extract	$GT = 219.1 - 229.8 (YE) + 73.8 (MI) + 135.5 (YE)^2 - 4.1 (MI)^2 - 61.3 (MI)(YE)$
Skimmed milk and yeast extract	$MP = 3.1 + 5.5 (YE) - 0.4 (MI) - 2.9 (YE)^2 - 0.2 (MI)^2 + 0.76 (MI)(YE)$

GT (the response): generation time; MP (the response): maximal population.

of combined factors chosen for the central composite design (Table 1).

Optimal values of yeast extract and skimmed milk were determined and then optimal values of generation time and maximal population were calculated (Table 3). The optimal combination was 1.07% (w/v) of yeast extract and 0.99% (w/v) of skimmed milk and maximal cell production was improved.

Table 3 Best combinations of yeast extract and skimmed milk and corresponding optimal generation times and maximal populations

Optimal conditions	Generation time (min)	Maximal population (10^6 cells ml^{-1})
	132	5.88
Yeast extract (% w/v)	1.07	1.09
Skimmed milk (% w/v)	0.99	1.07

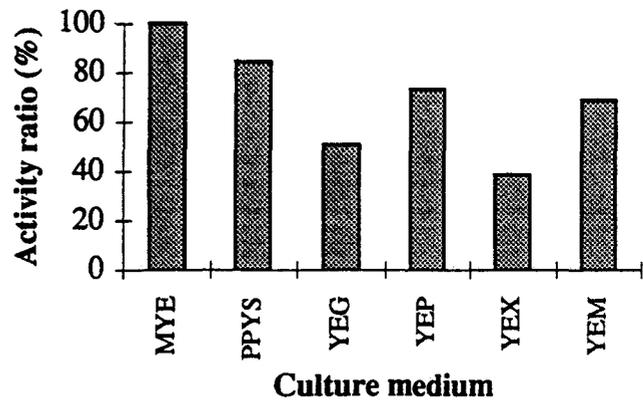


Figure 3 Protease secretion on different media.

Best medium for protease production

The different media were tested for their effect on protease secretion (Figure 3). The highest protease secretion was obtained on Mye (20% higher than on other media), indicating that milk proteins enhance protease secretion.

Improvements to culture techniques for growth and protease production

Scaling-up: We have compared *T. thermophila* BIII growth both in static cultures and in batch fermentors (Table 4). Cultivation in fermentors improved *Tetrahymena* culture: maximal populations were increased by 70% probably because aeration and agitation improved oxygen transfer in the medium.

Table 4 Influence of culture-type on *Tetrahymena* growth (Yeg medium, n = number of experiments)

Culture type	Generation time (min)	Maximal population (cells ml^{-1})
Flasks	188 ($n = 5$)	0.6×10^6 ($n = 5$)
Erlenmeyer flasks	172 ($n = 5$)	0.5×10^6 ($n = 5$)
Fermentors		
2 L	150 ($n = 5$)	1.7×10^6 ($n = 5$)
20 L	158 ($n = 3$)	1.9×10^6 ($n = 3$)
100 L	162 ($n = 2$)	1.7×10^6 ($n = 2$)

pH regulation: When pH was not regulated, the stationary phase was shortened, and the cells were lysed. Initially the Mye medium pH was 6.8 however, during fermentation, the pH reached 8.5 because ammonia was liberated. If the pH was regulated at 6.8, the stationary phase was lengthened about 100 h and maximal cells were improved by 55%. The generation time was not changed (Figure 4).

In pH-regulated cultures, protease secretion was more constant but lower than in unregulated cultures because in this culture, cells were damaged at the end of fermentation, and liberated intracellular enzymes and fermentation were stopped.

Continuous culture with cell recycle: Different processes were tested to produce high cell density as well as increased product yield. In a continuous culture system, high cell density was obtained by retaining or recycling the cells. We chose recycling technology where cells were separated from the liquid phase through microfiltration membranes and recycled back to the fermentor (Figure 5).

The fermentation system was a single continuous stirred

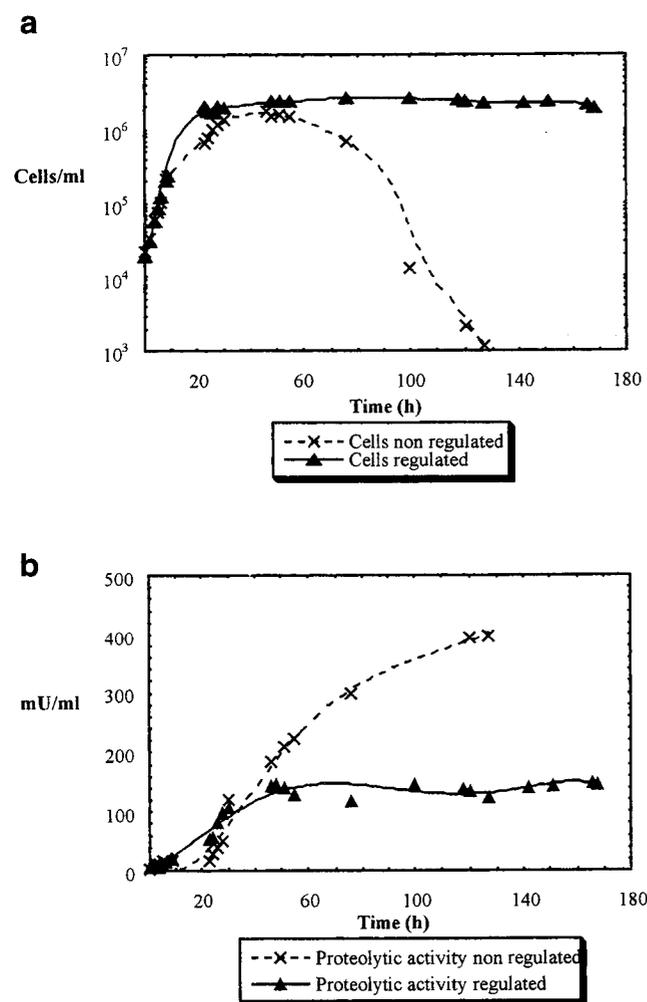


Figure 4 Influence of pH (regulated or not) on growth (a) and protease production (b) of *T. thermophila*.

tank reactor (pH regulated) employing polysulfone microfiltration membranes (SETRIC, Toulouse, France; average porosity: 0.55 μm ; filtration surface: 0.4 m²) for cell recycling. Pressure drop along the membranes varied from 0.5 to 1 bar. Cell density reached 1.24×10^7 cells per ml at stationary phase and was constant for 123 h (Figure 6). In addition, we measured the activity of the intracellular marker enzyme, HK, during fermentation. HK activity in the extracellular medium never exceeded 1% of the total activity indicating that cell lysis was very low. Protease secretion rates were lower than in batch fermentation but the enzyme was constantly secreted.

Discussion

Skimmed milk was the best component tested for growth of *T. thermophila*, in agreement with previous works. [8,18]

With yeast extract, Plesner *et al* [16] used proteose peptone and salt solutions (Ppys medium). Dive *et al* [3] obtained highly reproducible results with *T. pyriformis*, *T. rostrata* and *T. thermophila* in a medium based on a hemoglobin hydrolysate (hb) and recommended this nitrogen source because it was a stable and defined source of amino acids. Ethuin [5] demonstrated that *T. pyriformis* and *T. thermophila* grew in media simply composed of yeast extract. Saliba *et al* [18] proved that skimmed milk (Mye medium) was a suitable substrate for mass cultivation of *T. pyriformis* and *T. rostrata*. Kiy and Tiedtke [8] improved Mye medium by glucose addition. Caillieret-Ethuin *et al* [2] showed that in industrial by-product media, *T. rostrata* gave best growth in media with dairy products.

In addition, the price of this medium was 75% lower than that of Ppys. Mye medium has never been optimised. In the present work the optimal combination for *Tetrahymena* growth was 1.07% yeast extract, 0.99% skimmed milk which increased biomass production 46%.

Protease production was also enhanced by skimmed milk, in agreement with Kiy and Tiedtke [8]. We suggest that casein particles stimulated protease secretion and hydrolysed proteins improved biomass. Zdanowski and Rasmussen [21] obtained evidence for a cell surface-bound peptidase, which could be involved in protein hydrolysis of the Mye medium.

Culture in batch fermentors improved biomass yield and scale-up can be successfully applied to *T. thermophila* for industrial purposes. We also propose that pH regulation produced undamaged cells during an extended stationary phase and resulted in abundant protease production.

To increase the cell yield in fermentors, immobilised techniques have been used with bacteria [4,19] or with *Tetrahymena* [7], but they present some disadvantages. Kiy and Tiedtke [9] developed a perfused bioreactor, as already described for cultivation of animal cell lines. *Tetrahymena* cells were retained in a perfusion module inside a bioreactor but this process was limited due to a decreased perfusion rate caused by blocking of the membranes. Cell recycling by microfiltration was used in yeast alcoholic fermentation in continuous operation and productivity was considerably improved [12]. The present work was the first time that continuous culture with cell recycling was successfully

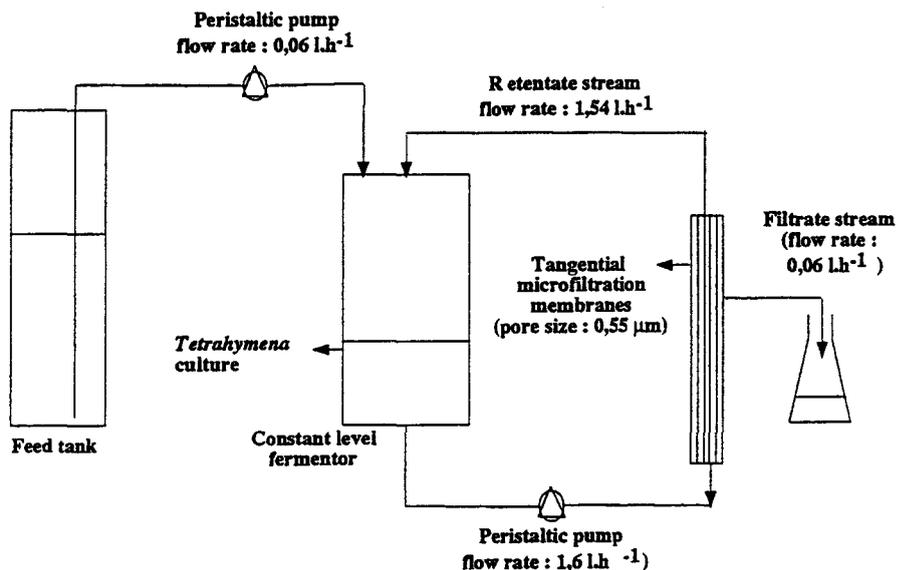


Figure 5 Schematic diagram of continuous fermentation coupled with tangential microfiltration.

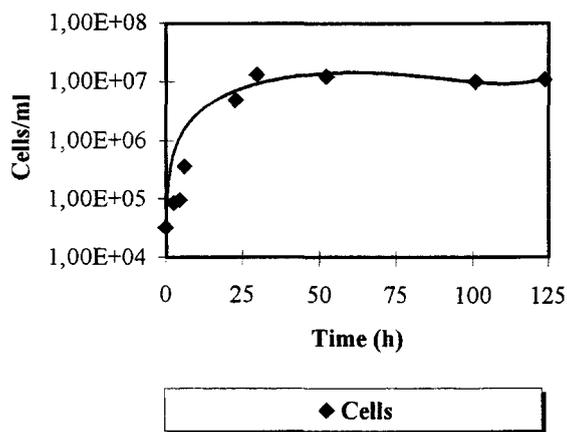
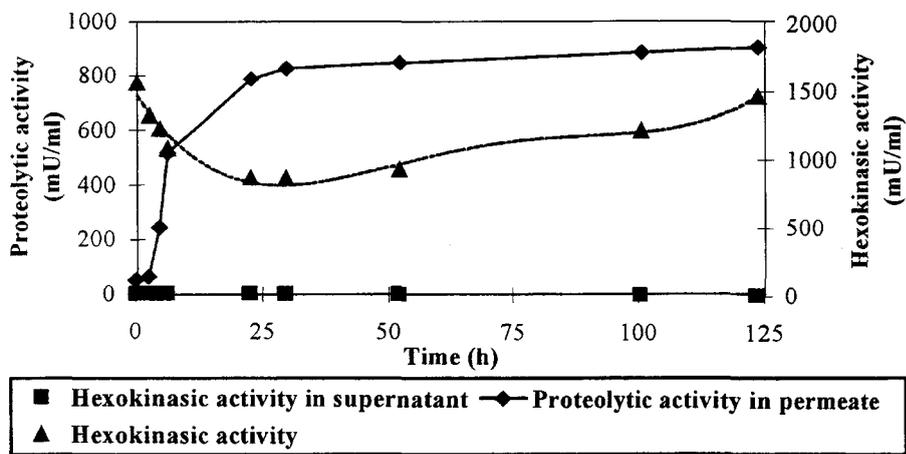


Figure 6 Growth kinetics of *T. thermophila* during continuous culture with cell recycle.

applied to protozoa. Additionally, our results indicate this process was an effective way to produce protease.

Acknowledgements

We gratefully thank Pr Thonart for use of the pilot-fermentors at the University of Gembloux (Belgium) and Mrs Ellis-Petit for helpful reading.

References

- 1 Beynon RJ and JS Bond. 1989. Proteolytic enzymes, a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK.
- 2 Caillieret-Ethuin P, F Duyme, F Tonon, J Jeanfils and J De Coninck. 1998. Optimisation of *Tetrahymena rostrata* growth using food by-products as nitrogen source. *Biotechnol Techniques* 12: 177-181.
- 3 Dive D, JM Piot, F Sannier, D Guillochon, P Charet and S Lutrat. 1989. Use of hemoglobin enzymic hydrolysates, prepared on a pilot-plant scale, as a nitrogen source for the cultivation of three species of *Tetrahymena*. *Enzyme Microb Technol* 11: 165-169.
- 4 Dhulster P, JN Barbotin and D Thomas. 1984. Culture and bioconversion use of plasmid-harboring strain of immobilised *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20: 87-93.
- 5 Ethuin P. 1993. Culture en masse de *Tetrahymena*: etude de milieux industriels et application à la culture en fermenteur du mutant thermo-dépendant *Tetrahymena thermophila* SJ180. Thesis, Université de Technologie de Compiègne, France.
- 6 Keuls M. 1952. The use of the studentized range in connection with an analysis of variance. *Euphytica* 1: 112-122.
- 7 Kiy T and A Tiedtke. 1991. Lysosomal enzymes produced by immobilized *Tetrahymena thermophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 14-18.
- 8 Kiy T and A Tiedtke. 1992. Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 576-579.
- 9 Kiy T and A Tiedtke. 1992. Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoan *Tetrahymena* in a perfused bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 141-146.
- 10 Kunst A, B Draeger and J Ziegenhorn. 1984. On hexokinase determination. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 6 (Bergmeyer HU, ed), pp 163-172, Verlag Chemie, Weinheim: Academic Press, New York.
- 11 Minitab. 1998. On line Help. PA State College, Minitab Inc.
- 12 Mota M, C Lafforgue, P Strehaino and G Goma. 1987. Fermentation coupled with microfiltration: kinetics of ethanol fermentation with cell recycle. *Bioproc Engin* 2: 65-68.
- 13 Munro IG. 1985. Protozoa as source of commercially produced enzymes. A review. *Process Biochem* 20: 139-144.
- 14 Newman D. 1939. The distribution of range in samples from a normal population expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika* 31: 20-30.
- 15 North MJ. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotik microorganisms. *Microbiol Rev* 46: 308-340.
- 16 Plesner P, L Rasmussen and E Zeuthen. 1964. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In: *Synchrony in Cell Division and Growth* (Zeuthen E, ed), pp 543-563, Intersci Publ, New York.
- 17 Rick W and WP Fritsch. 1974. On tyrosine determination in proteins. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 2 (Bergmeyer HU, ed), pp 1046-1052, Verlag Chemie, Weinheim: Academic Press, New York.
- 18 Saliba R, D Dive and R Devis. 1983. An inexpensive and practical medium rearing mass cultures in *Tetrahymena*. *Protistologica* 19: 417-421.
- 19 Santos JAL, JMS Cabral and CL Cooney. 1992. Recovery of alkaline protease by membrane filtration. Effect of membrane type and addition of submicron sized charged particles. *Bioproc Engin* 7: 205-211.
- 20 Wheatley DN, L Rasmussen and A Tiedtke. 1994. *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *BioEssays* 16: 367-372.
- 21 Zdanowski MK and L Rasmussen. 1979. Peptidase activity in *Tetrahymena*. *J Cell Physiol* 100: 407-412.

RÉSUMÉ

Tetrahymena thermophila BIII est un protozoaire cilié présentant de bonnes aptitudes à la culture en masse.

Dans un premier temps, l'utilisation du fermenteur s'avère être le mode de culture le plus intéressant pour la production en masse de *T. thermophila* : Le temps de génération (TG) est amélioré de 30% et la population maximale (PM) de 80%.

Après comparaison de six milieux complexes contenant tous de l'extrait de levure, le milieu MYE se révèle le plus performant en fermenteur. Le pH optimum de croissance est de 6,8. La régulation de la fermentation à ce pH ne permet pas d'améliorer le TG et la PM, mais favorise un allongement de la phase stationnaire. La régulation de l'oxygène dissous augmente la production d'activité.

Pour accroître la biomasse (jusqu'à 10^7 cellules/mL) et la sécrétion protéasique, un procédé de culture en continu, avec recyclage des cellules par microfiltration tangentielle a été testé avec succès.

Dans un deuxième temps, trois activités enzymatiques ont été sélectionnées (protéasique, α -amylasique, pullulanasiq), parmi les enzymes hydrolytiques testées. La production des activités α -glycosidasiques est favorisée par la présence de glucose dans le milieu de culture (milieu YEG) ; par contre, pour l'activité protéasique, il est plus intéressant de cultiver *T. thermophila* sur milieu MYE. C'est cette dernière activité que nous avons retenue pour la suite de notre étude.

Une hétérogénéité quant au pH optimum de l'activité protéasique a été observée, laissant sous-entendre l'existence de plusieurs systèmes enzymatiques différents.

Si les premiers résultats obtenus confirment cette hypothèse, d'autres résultats plaident pour une seule entité enzymatique avec deux optima d'activité : l'impossibilité de séparer les deux entités moléculaires, un comportement de cystéine-protéase pour les deux activités, des comportements similaires en électrophorèse. L'influence variable de l'urée sur la vitesse d'hydrolyse suggère que l'urée a une action bénéfique sur l'accessibilité du substrat, et non sur l'enzyme. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de l'étude de l'hémoglobine en fluorescence, en présence ou non d'urée et/ou de zinc. Le zinc, fortement inhibiteur à pH 9,0, semble contrebalancer l'effet de l'urée.

Mots-clés :

Tetrahymena thermophila ; milieux ; procédés ; fermentation ; protéase ; inhibiteur ; urée

