



HAL
open science

Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyses

Yves Bertheau, A Kotoujansky, Alain Coleno

► **To cite this version:**

Yves Bertheau, A Kotoujansky, Alain Coleno. Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyses. Hydrolases et dépolymérase: Enzymes d'intérêt industriel, Gauthier-Villars, 359 p., 1985, Biochimie Appliquée, 2-04-015674-7. hal-02857639

HAL Id: hal-02857639

<https://hal.inrae.fr/hal-02857639>

Submitted on 8 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

BIOCHIMIE APPLIQUEE

Collection dirigée
par Claude Costes

YB



Annette Mouranche et Claude Costes

A. Baron, Y. Bertheau, J.M. Brillouet, C. Cassagne,
A. Coleno, J.C. Gripon, C. Hoebler, A. Kotoujansky, C. Mercier,
E. Odier, X. Rouau, J.F. Thibault, C. Valin, R. Verger

HYDROLASES ET DÉPOLYMÉRASES

**Enzymes
d'intérêt industriel**

gauthier-villars

FROMAGERIE / AMIDONNERIE
BIOMASSE / GRAISSES
VIANDES / CUTINE
BRASSERIE
...IUS

Table des matières

C. COSTES. Présentation de la collection "Biochimie appliquée"	V
C. COSTES. Dépolymérisation et hydrolyse enzymatique : prospective	1
A. MOURANCHE. Mode d'action des hydrolases	13
Y. BERTHEAU, A. KOTOUJANSKY, A. COLENO. Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyse et de dépolymérisation	45
C. MERCIER. Les enzymes amylolytiques	109
A. BARON et J.F. THIBAUT. Les enzymes pectolytiques	143
J.M. BRILLOUET et C. HOEBLER. Les hémicellulases	165
E. ODIER et X. ROUAU. Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine	199
J.C. GRIPON. Les enzymes protéolytiques des industries laitières	239
C. VALIN. Les protéases des viandes	279
R. VERGER. Les enzymes lipolytiques	313
C. CASSAGNE. Les hydrolases de la cutine	331

Présentation des auteurs par ordre alphabétique

- A. BARON, Centre de recherche cidricole, INRA, Le Rheu, 35000 RENNES.
- Y. BERTHEAU, Laboratoire de Pathologie végétale, INRA, Institut national agronomique, Centre de Paris, 16 rue Claude Bernard, 75231 PARIS Cedex 05.
- J.M. BRILLOUET, Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides, INRA, Chemin de la Géraudière, 44072 NANTES.
- C. CASSAGNE, Institut de Biochimie cellulaire et de Neurochimie, CNRS, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077 BORDEAUX CEDEX.
- A. COLENO, Laboratoire de Pathologie végétale, INRA, Centre de Paris, 16 rue Claude Bernard, 75231 PARIS CEDEX 05.
- C. COSTES, Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysologie, INRA, Institut national agronomique, Centre de Grignon, 78850 THIVERVAL GRIGNON.
- J.C. GRIPON, Laboratoire de Biochimie et Technologie laitières, INRA, CNRS, Domaine de Vilvert, 78350 JOUY EN JOSAS.
- C. HOEBLER, Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides, INRA, Chemin de la Géraudière, 44072 NANTES.
- A. KOTOUJANSKY, Laboratoire de Pathologie végétale, INRA, Centre de Paris, 16 rue Claude Bernard, 75231 PARIS CEDEX 05.
- C. MERCIER, Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides, INRA, Chemin de la Géraudière, 44072 NANTES.
- A. MOURANCHE, Laboratoire de Biochimie, INAPG, Centre de Paris, 16 rue Claude Bernard, 75231 PARIS CEDEX 05.
- E. ODIER, Laboratoire de Microbiologie, Institut national agronomique, Centre de Paris, 16 rue Claude Bernard, 75231 PARIS CEDEX 05.
- X. ROUAU, Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides, INRA, Chemin de la Géraudière, 44072 NANTES.
- J.F. THIBAUT, Laboratoire de Biochimie et Technologie des glucides, INRA, Chemin de la Géraudière, 44072 NANTES.
- C. VALIN, Station de Recherches sur la viande, INRA, Theix, Saint-Génès, Champanelle, 63110 BEAUMONT.
- R. VERGER, Centre de Biochimie et de Biologie moléculaire, CNRS, 31 chemin Joseph-Aiguier, B.P. 71, 13042 MARSEILLE CEDEX 09.

Y. BERTHEAU, A. KOTOUJANSKY et A. COLENO

Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyse et de dépolymérisation

INTRODUCTION

L'utilisation industrielle d'enzymes n'est pas récente, c'est ainsi que dès 1894 un brevet fut déposé quant à l'emploi d'enzymes d'origine fongique. De nombreuses autres applications furent ensuite proposées : nettoyage et clarification de jus de fruits par exemple. Pourtant à l'heure actuelle, un peu moins de vingt enzymes présentent un développement commercial.

Cette situation devrait évoluer car une demande existe pour des activités spécifiques : diversification des sources alimentaires, catalyses diverses à stéréochimie spécifique, thérapeutique (lyse spécifique de cellules cancéreuses à l'aide d'enzymes fixées à des anticorps spécifiques par exemple).

Nous nous intéresserons, dans l'étude qui va suivre, aux sources d'enzymes lytiques : celles exploitées actuellement mais surtout celles qui peuvent être considérées comme des sources potentielles. Ce travail portera essentiellement sur les microorganismes. Il ne s'agit pas là d'un choix, mais des conséquences directes des propriétés attachées à leur étude : grande diversité biochimique facile à mettre en évidence, croissance des germes, extraction et préparation des enzymes maîtrisables au plan industriel, manipulations possibles du génome.

L. SOURCES ACTUELLES D'ENZYMES UTILISEES INDUSTRIELLEMENT

A. LES SOURCES

Les végétaux et les animaux fournissent quelques enzymes bien connues ; la plupart d'entre elles sont des protéases : papaïne (*Carica papaya*), broméline (*Ananas comosus*), ficine (*Ficus carica*), pepsine (muqueuse gastrique du porc), trypsine (pancréas de boeuf), présure (veau non sevré).

Quelques autres enzymes sont également utilisées comme les amylases (malt, boeuf), les lipases (soja, boeuf).

Les microorganismes fournissent également des enzymes du même type. Parmi les bactéries le genre *Bacillus* est le seul vraiment exploité avec en particulier deux espèces : *B. licheniformis* (amylase thermostable, protéase alcaline) et *B. subtilis* (et sa variété "*amylolyticofaciens*") (amylase, protéase, lipase, glucanase).

Parmi les champignons les sources utilisées s'avèrent plus variées : chez les Zygomycètes on notera *Rhizopus* sp. (amyloglucosidase, lipase, amylase, protéase, pectinase) et *Mucor* sp. (protéases acides à activité présure). Un seul Ascomycète, *Endothia parasitica*, est utilisé pour ses protéases (acides à activité présure). Quant aux Hyphomycètes *Aspergillus niger* et *A. oryzae*, ils sont à l'origine de nombreux types d'enzymes, en général en mélange : glucanases, cellulases, hémicellulases, amyloglucosidases, pectinases, lipases, protéases, pentosanase, naringinase, amylases.

Il faut bien évidemment ajouter à ces quelques genres les microorganismes comme les *Penicillium* et levures utilisés *in situ* pour leur pouvoir enzymatique.

B. MOTIVATION DES CHOIX

L'utilisation des sources est en général directement liée à l'histoire ; c'est ainsi que la mise au point d'une fermentation traditionnelle conduit souvent à la détection et à la détermination des agents responsables (cas de la takadiastase des *Aspergillus*). Une autre possibilité est l'utilisation d'organismes seuls connus pour la production de l'enzyme recherchée : papaïne, présure.

Le coût de l'enzyme produite dépend alors évidemment de la richesse en enzyme de la source, de son extraction et de la facilité avec laquelle cette source se renouvelle. Ces deux raisons, entre autres, expliquent l'essor des industries fondées sur le développement des microorganismes.

Le rapport surface/volume cellulaire élevé permet des transports rapides des nutriments d'où des activités métaboliques et une cinétique de production de protéines importantes. De plus ces organismes peuvent être

trouvés dans tous les milieux et s'avèrent jusqu'à présent aptes à dégrader pratiquement toutes les structures. Cependant, l'utilisation rationnelle et économique d'un microorganisme doit répondre à un certain nombre de critères, c'est ainsi que cet organisme doit :

- être cultivable sur un milieu simple (économique),
- excréter ou sécréter le moins possible de métabolites secondaires (antibiotiques par exemple),
- sécréter l'enzyme qui sera ainsi plus facilement purifiable,
- ne présenter aucun risque de pollution, de toxicité, ne pas être pathogène pour l'homme, les animaux et éventuellement les plantes (référence aux "Generally Recognised As Safe Organisms (GRAS)" ou Organismes Généralement Reconnus comme Inoffensifs).

Ces contraintes limitent naturellement l'emploi des microorganismes, cependant les progrès de l'analyse génétique de ces germes conduisent à prendre en compte toutes les sources possibles de gènes.

II. SOURCES POTENTIELLES D'ENZYMES OU DE GENES GOUVERNANT LA SYNTHÈSE D'ENZYMES

A. POSSIBILITES OFFERTES PAR LE GENIE GENETIQUE

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, les dépolymérase actuellement produites et utilisées industriellement sont peu nombreuses, alors que la nature en offre une grande variété. Ce paradoxe s'explique en grande partie par les difficultés liées à la mise en oeuvre de nouveaux systèmes de production utilisant d'autres organismes. Trois types d'obstacles peuvent être distingués :

- la mise au point de la culture de nouveaux microorganismes,
- la quantité, et donc le coût, d'enzyme produite,
- les propriétés de l'enzyme.

Si certaines productions ont pu être nettement améliorées par des cycles de mutagenèse traditionnelle, les progrès considérables réalisés ces dernières années en génies génétique et enzymatique devraient permettre de lever certains de ces obstacles. Il est ainsi devenu virtuellement possible de produire en quantité n'importe quel type de protéine existant dans la nature, voire même n'existant pas. Le but de ce paragraphe est de tracer les grandes lignes de la technologie actuellement disponible pour arriver à ce résultat en intervenant sur les gènes. Le point de départ est l'identification, chez un organisme quelconque, d'une dépolymérase présentant des propriétés intéressantes ; cette enzyme est, bien entendu, codée par un gène sur lequel il est possible d'intervenir.

1. CLONAGE DE GENES DANS DES ORGANISMES D'INTERET INDUSTRIEL


La source de l'enzyme peut être un procaryote (bactérie) ou un eucaryote (champignon, plante, animal). Or, la culture à l'échelle industrielle de la plupart de ces organismes s'avère en général difficile à mettre au point.

De plus si l'enzyme doit servir à la transformation de produits à destination alimentaire ou pharmaceutique, il conviendra de démontrer l'inocuité du nouvel organisme en vue de son homologation. L'instruction, longue et coûteuse, d'un dossier toxicologique incitera donc, dans l'état actuel des techniques et de la législation, à tenter d'isoler le gène codant pour l'enzyme désirée pour l'introduire dans un hôte homologué et facile à cultiver.

Cette opération, qui s'appelle le clonage du gène, est schématisée dans la figure 1. La première étape consiste à réaliser une banque (librairie) de gènes ; il s'agit de disposer d'une collection de séquences d'ADN clonées, représentant tout le génome de l'organisme possédant le gène recherché. Dans ce but l'ADN de l'organisme "donneur" est fragmenté par des enzymes de restriction (endonucléases reconnaissant des sites spécifiques) voire par des méthodes physiques. Les fragments obtenus sont alors insérés dans des vecteurs de clonage : bactériophages modifiés, plasmides ou hybrides plasmides - bactériophages. Le tableau I présente une liste d'exemples de vecteurs de clonage adaptés à l'étude et à l'introduction de gènes spécifiques dans des bactéries Gram-négatif, en particulier *Escherichia coli*, dans des bactéries Gram-positif (*Bacillus*), dans la levure, dans des cellules animales, ou dans des plantes.

Légende figure 1

Cette opération est composée de 5 étapes :

- (1) extraction de l'ADN du microorganisme "donneur" du gène intéressant (schématisé ) , et extraction du plasmide-vecteur à partir d'une souche d'*E. coli*.
- (2) coupure, par une enzyme de restriction, du plasmide et de l'ADN "donneur" pour créer des fragments ayant des extrémités cohésives compatibles avec celles du plasmide. Il est important que l'enzyme de restriction ne coupe le plasmide qu'en un seul site.
- (3) mélange des deux ADN et ligature (ou ligation) des extrémités cohésives par l'ADN-ligase du bactériophage T4. Cette étape engendre des plasmides circulaires hybrides.
- (4) réintroduction des plasmides hybrides dans une souche d'*E. coli* par transformation avec le mélange des ADN ligaturés (mélange de ligation). Ces cellules répliquent au maximum un plasmide.
- (5) étalement des cellules sur un milieu de culture gélosé, en boîte de Pétri. Les cellules se divisent pour donner des colonies : chaque colonie représente un clone. Le clone portant le gène intéressant est recherché à l'aide d'un crible.

La seconde étape consiste à passer par un crible (screening) la banque ainsi constituée afin de trouver le(s) clone(s) possédant le gène recherché. Ce gène peut être détecté, soit directement par hybridation avec une sonde d'ADN marquée par radioactivité, soit indirectement par son expression : activité enzymatique ou propriétés antigéniques de la protéine.

La troisième étape consiste généralement à sous-cloner le gène, c'est-à-dire à recouper le fragment d'ADN qui le porte en sous-fragments qui seront clonés séparément dans un plasmide, et introduits par transformation dans un hôte.

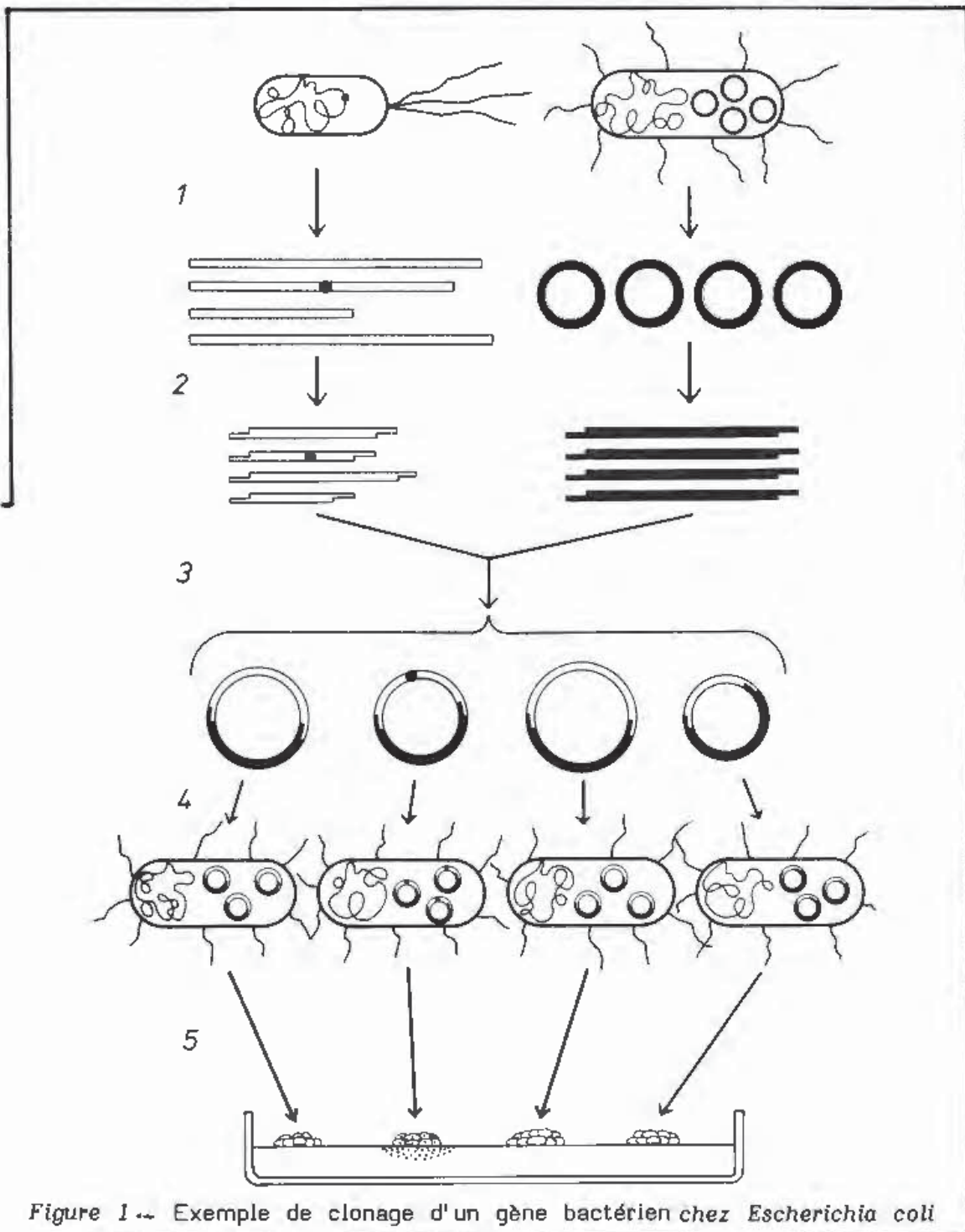


Figure 1 -- Exemple de clonage d'un gène bactérien chez *Escherichia coli*

Jusqu'à présent ces étapes ont lieu en utilisant la bactérie *Escherichia coli* comme hôte récepteur. Cette bactérie, certainement la mieux étudiée, est d'ailleurs déjà directement utilisée pour la production par fermentation de polypeptides "étrangers" à très forte valeur ajoutée tels que la somatostatine, l'insuline, et l'hormone de croissance humaine. Pourtant, *E. coli* présente des inconvénients majeurs quant à ses applications industrielles : en particulier son enveloppe cellulaire contient une endotoxine (le lipopolysaccharide) dont il convient de se débarrasser par une purification relativement poussée de la protéine utile, lors d'applications pharmaceutiques ou alimentaires.

Il apparaît alors nettement intéressant d'utiliser comme hôtes ultimes des "G.R.A.S. Organisms" produisant le moins possible de métabolites secondaires et dont la culture à grande échelle est bien maîtrisée : *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres levures.

Dans cette stratégie de clonage, *E. coli* est toujours utilisée mais comme hôte intermédiaire, facilitant la manipulation du gène qui sera finalement introduit dans un autre organisme.

Sont indiquées les positions des signaux de transcription (région promoteur-opérateur) et de traduction (séquence de Shine et Dalgarno de fixation de l'ARN messager sur le ribosome, signaux de départ et d'arrêt de traduction).

Dans ce but, la fusion de plasmides se répliquant chez *E. coli* avec des plasmides d'autres hôtes, a permis la construction de "vecteurs-navettes" capables de se répliquer chez deux hôtes appartenant à des genres très différents : *E. coli/B. subtilis*, *E. coli/Streptomyces* sp. ou *E. coli/S. cerevisiae* par exemple. Pour le clonage dans les bactéries Gram-négatif, plusieurs vecteurs ont été dérivés de plasmides à large spectre d'hôte appartenant aux groupes d'incompatibilité P1, Q et W. La classification des plasmides est fondée sur le test d'incompatibilité : deux plasmides incompatibles ne peuvent se répliquer ensemble dans la même cellule et sont donc considérés comme proches (Tableau I).

TABLEAU I

Marqueurs génétiques :	Tc ^R	: résistance à la tétracycline
	Ap ^R	: résistance à l'ampicilline
	Km ^R	: résistance à la kanamycine
	Cm ^R	: résistance au chloramphénicol
	Sm ^R	: résistance à la streptomycine
	Sp ^R	: résistance à la spectinomycine
	Nm ^R	: résistance à la neomycine
	Tp ^R	: résistance au trimetoprime
	Leu ⁺	: synthèse de la leucine
	Lac ⁺	: utilisation du lactose
	Trp ⁺	: synthèse du tryptophane
	Spi ⁺	: "sensitivity to phage P2 inhibition" : le phage lambda est inhibé par le phage P2

Sites de restriction : *HindIII* (Tc^R) signifie que l'insertion de séquences dans le site *HindIII* supprime la résistance à la tétracycline.

TABLEAU III - Exemples de vecteurs de clonage

Nom du vecteur	Plasmide (ou phage d'origine)	Groupe d'incompatibilité	Taille (en Kb)	Marqueurs génétiques	Sites de restriction utilisables pour le clonage	Hôtes	Caractéristiques
Plasmides pour le clonage chez <i>E. coli</i>							
pBR322	pMB1		4,4	Tc ^R , Ap ^R	EcoRI, HindIII (Tc ^R) BamHI (Tc ^R), Sall (Tc ^R), PstI (Ap ^R) PvuI (Ap ^R), AvalI, PvuII, ClaI (Tc ^R)	<i>E. coli</i> et d'autres entérobactéries	Multicopie, très utilisé
PACYC177	p15A		3,45	Ap ^R , Km ^R	PstI (Ap ^R), HincII (Ap ^R), BamHI, HindIII (Km ^R), SmaI (Km ^R), XhoI (Km ^R)	<i>E. coli</i>	Multicopie, compatible avec les réplicons ColEI
PSC101	SP219(?)		8,5	Tc ^R	EcoRI, HindIII (Tc ^R), BamHI (Tc ^R), Sall (Tc ^R)	<i>E. coli</i>	Faible nombre de copies
pDF41	F	Inc F1	12,8	TrpE ⁺	BamHI, EcoRI, HindIII, Sall	<i>E. coli</i> et d'autres entérobactéries	Faible nombre de copies
pRK646	R6K	Inc X	3,4	Ap ^R	PstI (Ap ^R), BamHI, BglII	<i>E. coli</i>	Vecteur de confinement pour le clonage de gènes potentiellement dangereux

Nom du vecteur	Plasmide (ou phage d'origine)	Groupe d'incompatibilité	Taille (en Kb)	Marqueurs génétiques	Sites de restriction utilisables pour le clonage	Hôtes	Caractéristiques
<u>Plasmides-vecteurs d'expression (pour produire en quantité la protéine codée par le gène cloné)</u>							
pMOB48	pKN402 (R1)	Inc FII	9,5	Cm ^R , Lac ⁺	BamHI (Lac ⁺)	<i>E. coli</i> et d'autres entérobactéries	Systèmes à deux plasmides, le vecteur est amplifiable par la température, et le gène, cloné sous le contrôle du promoteur lac, est inducible par le lactose
pCP3	pKN402 (R1)	Inc FII	7,05	Ap ^R	EcoRI, BamHI, Xba, Sall, PstI, HindIII	<i>E. coli</i> et d'autres entérobactéries	A 42°C, le vecteur est amplifié, et le gène cloné sous le contrôle du promoteur pL est déréprimé
pUC7	pBR322		2,7	LacZ ⁺	EcoRI (Lac ⁺) BamHI (Lac ⁺) Sall/ (Lac ⁺) AccI (Lac ⁺) HindIII (Lac ⁺) PstI (Lac ⁺) HaeIII (Lac ⁺)	<i>E. coli</i>	Vecteur d'expression pour le séquençage des gènes clonés

Plasmides pour le clonage dans d'autres organismes que *E. coli*

pKT231	RSF1010	Inc G	13,0	Sm ^R , Km ^R	PstI (Sm ^R), ClaI HindIII, BstEII, XmaI, XhoI	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻	Multicopie		
pRK290	RK2	Inc P1	20	Tc ^R	SmaI (Tc ^R), Sall (Tc ^R), BglII, EcoRI	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻	Multicopie, mobilisable par le plasmide pRK2013		
pGV1106	Sa	Inc W	8,8	Km ^R , Sm ^R /Sp ^R	EcoRI (Sm ^R), PstI, BglII BamHI, SacII	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻			
pNJ5070	RP4	Inc P1	58	Tp ^R , Sm ^R , Tc ^R	HindIII	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻	Système à deux plasmides permettant l'insertion de gènes étrangers dans le chromosome des bactéries Gram ⁻		
pUB110	pUB110	?	4,39	Km ^R /Nm ^R	EcoRI, BamHI, XbaI, BglII (Km ^R)	Bacillus subtilis	Plasmide pour le clonage chez <i>B. subtilis</i>		
pJ03	pUB110/ pBR322	?	8,8	Km ^R , Tc ^R , Ap ^R	HindIII (Tc ^R) Sall (Tc ^R)	<i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i>	Vecteur navette entre <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i>		

Nom du vecteur	Plasmide (ou phage d'origine)	Groupe d'incompatibilité	Taille (en Kb)	Marqueurs génétiques	Sites de restriction utilisables pour le clonage	Hôtes	Caractéristiques
pMP78-1	pBR325/ 2 μ m	?	8,7	Cm ^R , Ap ^R Leu2 ⁺	PstI (Ap ^R), BamHI, PvuI (Ap ^R), Sall AvaI	<i>E. coli</i> et <i>S. cerevisiae</i>	Vecteur navette entre <i>E. coli</i> et <i>S. cerevisiae</i>
pBR322/ his3	pBR322	?	5,0	Ap ^R	EcoRI, Sall, PstI (Ap ^R)	<i>E. coli</i> et <i>S. cerevisiae</i>	Vecteur pour obtenir l'intégration de gènes étrangers ds les chromosomes de <i>S. cerevisiae</i>
PLGV2381	pKC7/ pTIC58		?	Ap ^R	BamHI	<i>E. coli</i>	Vecteur pour le clonage de gènes dans les chromosomes des plantes dicotylédones
Cosmides (plasmides encapsidables dans des capsides de phage Lambda, pour constituer des banques de gènes)							
pHC79	pBR322		6,4	Ap ^R , Tc ^R	BamHI (Tc ^R), EcoRI, HindIII (Tc ^R), EcoI, ClaI (Tc ^R), Sall (Tc ^R), PstI (Ap ^R)	<i>E. coli</i>	Cosmide dérivé de pBR322, pour les banques de gènes dans <i>E. coli</i>
PLAFR1	RK2	Inc P1	21,6	Tc ^R	EcoRI	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻	Cosmide mobilisable par le plasmide pRK2013

pVK102	RK2	Inc P1	23	Tc ^R , Km ^R	SaII (Tc ^R), HindIII (Km ^R), XhoI (Km ^R)	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram ⁻	Cosmide mobilisable par le plasmide pRK2013
<u>Bactériophages et virus</u>							
L47-1			40	Spi ⁺	EcoRI, HindIII, BamHI, XhoI	<i>E. coli</i>	Phage-vecteur pour les banques de gènes
SV40	SV40		5,24		BamHI, KpnI, BglI, HbaI, HpaII/MspI, HaeIII, EcoRI, Taci, AccI, BclI	Cellules de mammifères	Vecteur de clonage dans les cellules de mammifères

2. INTRODUCTION DE GENES DANS DES CELLULES ANIMALES ET VEGETALES

Des méthodes sont, ou ont été, développées pour introduire des gènes étrangers dans des cellules animales, y compris de mammifères, et récemment dans des cellules végétales.

Dans les cellules animales ces introductions peuvent résulter :

- de *microinjection* dans le noyau de la cellule ; on obtient alors dans certains cas une intégration, dans le génome, de séquences d'ADN introduites ; c'est ainsi que le gène de l'hormone de croissance du rat a été incorporé au génome de souris (microinjection dans le pronucleus mâle d'un ovule fécondé) ; l'expression du gène a été obtenue dans quelques cas, donnant des souris deux fois plus grosses que la moyenne ;
- de *transfection* (transformation de cellules à l'aide d'un acide nucléique viral), chez des cellules de mammifère en culture, suite à l'utilisation, comme vecteurs, de dérivés du virus SV40 de singe ;
- de *fusion* entre des bactéries et des cellules de mammifères ; c'est ainsi qu'a été transféré un plasmide bactérien porteur de gènes du virus SV40.

Ce dernier type de modification du génome (fusion) est aussi possible entre cellules végétales (cas de la "pomate") mais deux vecteurs potentiels de gènes semblent plus particulièrement intéressants :

- les caulimovirus, avec en particulier le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) ;
- les dérivés des plasmides Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* et Ri d'*A. rhizogenes*.

Le plasmide Ti, auquel la majorité des dicotylédones semble sensible, est responsable de la formation de tumeurs chez la plante infectée. Lors du processus infectieux, une région (le T-ADN) du plasmide est transférée aux cellules de la plante et s'intègre dans leur génome. L'insertion d'un gène étranger, dans le T-ADN, rend donc possible son intégration et son expression dans les chromosomes d'une plante entière, régénérée à partir des cellules infectées. C'est cette possibilité de régénérer certaines plantes à partir de cals, de cultures de cellules ou de protoplastes, qui les rend si intéressantes. Signalons à ce propos que le plasmide Ri, moins bien étudié jusqu'à présent, présenterait l'avantage de régénérations plus faciles.

Très récemment, a été construit un vecteur permettant d'obtenir le transfert et l'expression de gènes étrangers dans les plantes, le gène inséré codant pour la chloramphenicol-acétyltransférase (*cat*) et résistant à la ségrégation méiotique. Des résultats récents semblent d'autre part montrer qu'une inhibition de la méthylation de l'ADN permettrait une expression de gènes rendus silencieux après la méiose.

Les plantes pourraient donc aussi servir comme hôtes de clonage dans la production de protéines à usages agroalimentaire ou médical. Un avantage certain des plantes serait leur inocuité, permettant ainsi d'éviter la

purification de la protéine intéressante. Pour certaines productions, le champ pourrait remplacer le fermenteur...

Mais l'utilisation de microorganismes portant des gènes étrangers clonés se heurte encore à quelques difficultés.

3. STABILITE DES SOUCHES RECOMBINEES, DES VECTEURS

L'utilisation en vraie grandeur des souches recombinées est généralement rendue délicate par leur faible stabilité. Cette instabilité génétique est souvent due à des défauts de réplication du plasmide vecteur, à une ségrégation incorrecte lors de la division cellulaire, ou à des réarrangements des séquences du plasmide.

Lors de la fermentation, le vecteur peut être maintenu en sélectionnant sa présence (par exemple en ajoutant un antibiotique correspondant à une résistance codée par le plasmide). Appliquée à des volumes importants cette technique s'avère généralement coûteuse.

Les "ingénieurs-généticiens" se sont donc efforcés de construire des vecteurs parfaitement stables, même en l'absence de pression de sélection, l'une des possibilités étant l'intégration des gènes introduits dans le chromosome. C'est ainsi que chez *B. subtilis*, les gènes sont intégrés dans le chromosome par recombinaison homologue entre le vecteur et le chromosome. Un autre système a été décrit qui permettrait l'insertion de gènes clonés, dans le chromosome de n'importe quelle bactérie Gram-négatif, grâce à un mécanisme de transposition (recombinaison non homologue).

Chez la levure *S. cerevisiae*, la stabilité est obtenue au moyen de trois types de vecteurs :

- les vecteurs du type I s'intégrant dans le chromosome,
- les vecteurs du type II portant des séquences du plasmide 2 μ m de levure,
- les vecteurs du type III portant des origines de réplication provenant du chromosome de la levure et se répliquant comme des plasmides.

Mais les plasmides les plus stables sont construits en y incluant l'ADN du centromère : ils se comportent alors comme des chromosomes lors des mitoses et des méïoses.

4. SECRETION DES PROTEINES PRODUITES

La purification des enzymes produites lors d'une fermentation (par des microorganismes recombinés) est plus aisée si ces enzymes sont secrétées à l'extérieur des cellules et peuvent donc être récupérées dans le milieu de culture.

De plus, dans le cas de *E. coli*, la production de petits polypeptides comme certaines hormones (insuline, somatostatine, thymosine α) s'est heurtée au problème de leur dégradation extrêmement rapide dans le cytoplasme de la bactérie. Ces molécules n'ont pu être stabilisées qu'en les fusionnant avec des enzymes d'*E. coli* comme la β -galactosidase ou la

β -lactamase (fusion des gènes correspondants).

Par ailleurs, des procédés faisant appel à des microorganismes entiers modifiés par génie génétique pour produire certaines enzymes (cellulases par exemple) ne sont intéressants que dans la mesure où ces enzymes sont secrétées. Or *E. coli* n'est pas connue pour sa capacité à sécréter des protéines dans le milieu de culture. Une hémolysine, dont la synthèse et le transport sont codés par un plasmide, semble constituer la seule exception à cette règle. De plus, les protéines étrangères produites par *E. coli* restant à l'intérieur des cellules, il est alors difficile d'éliminer les contaminants pyrogènes, en particulier l'endotoxine, provenant du lipopolysaccharide bactérien.

Pour être sécrétée dans le milieu de culture une protéine doit traverser une membrane chez les bactéries Gram-positif et deux (membranes cytoplasmique et externe) chez les bactéries Gram-négatif. Alors que les *Bacillus* sont connus depuis longtemps pour sécréter de nombreuses enzymes dépolymérisantes (amylases, protéases, lipases), ce n'est que tout récemment que quelques cas de protéines secrétées ont été décrits pour des bactéries Gram-négatif. En particulier, il a été démontré dans notre laboratoire, en collaboration avec le laboratoire de chimie bactérienne (L.C.B., CNRS, Marseille), qu'une entérobactérie phytopathogène, *Erwinia chrysanthemi*, émettait spécifiquement des pectinases et deux cellulases dans le milieu de culture.

En revanche, le passage de protéines à travers la membrane cytoplasmique (exportation) a été bien étudié, et s'effectue grâce à une séquence signal constituée par 10 à 30 résidus d'acides aminés, à l'extrémité NH_2 de la protéine. Cette séquence est excisée dans la membrane par une signal-peptidase libérant à l'extérieur une protéine mature. Cette séquence signal semble relativement universelle, ainsi que le montrent des expériences au cours desquelles des enzymes de *Bacillus*, de même que des protéines d'eucaryotes comme l'ovalbumine ou l'insuline, sont produites et exportées par *E. coli*, dans son périplasme (espace compris entre les membranes cytoplasmique et externe des bactéries Gram-négatif). De même *S. cerevisiae* s'avère capable de sécréter dans le milieu de culture de l'interféron humain actif, ce qui suggère que les cellules de levure puissent reconnaître et exciser correctement la séquence signal d'une protéine humaine.

Cependant, le greffage d'une séquence signal n'est pas suffisant à l'exportation d'une protéine cytoplasmique comme la β -galactosidase ; des séquences internes à la protéine contrôlèrent sa destination finale comme l'ont mis en évidence des expériences conduites sur la protéine *lamB* de *E. coli*.

Dans le cas de l'utilisation de *B. subtilis* pour la sécrétion de protéines étrangères subsiste un problème important : la bactérie émet également à l'extérieur des protéases dégradant les protéines étrangères. Des mutants à activités protéolytiques nulles, réduites ou retardées sont donc activement recherchés. Signalons, d'une part, que les enzymes extracellulaires des bactéries Gram-positif sont généralement résistantes à l'action de ces protéases, et d'autre part, qu'une production stable d'insuline a déjà été obtenue avec des cellules immobilisées de *B. subtilis*, en présence de novobiocine (un inhibiteur de la division cellulaire).

L'utilisation de *B. subtilis*, comme hôte de clonage semblerait donc possible.

5. PROBLEME DE LA MODIFICATION POST TRADUCTIONNELLE DES PROTEINES

Divers composés (acides gras, glucides, phosphates...) entrent souvent dans la composition des protéines. La connaissance de ces composés ainsi que de leurs effets pourrait constituer une approche intéressante quand on pense, par exemple, à l'utilisation de lipoprotéines dans des systèmes enzymatiques biphasiques.

Les enzymes extracellulaires d'eucaryotes et, semble-t-il, de certaines bactéries Gram-positif sont généralement glycosylées (résidus glycosyl attachés, par des liaisons covalentes, en un point défini de la chaîne polypeptidique), c'est le cas par exemple d'une enzyme de *Clostridium thermocellum*. S'il est possible de cloner le gène de structure de ces enzymes, nous ne maîtrisons pas, actuellement, les mécanismes de glycosylation, d'ailleurs plutôt rare chez les bactéries et inconnue chez *E. coli*.

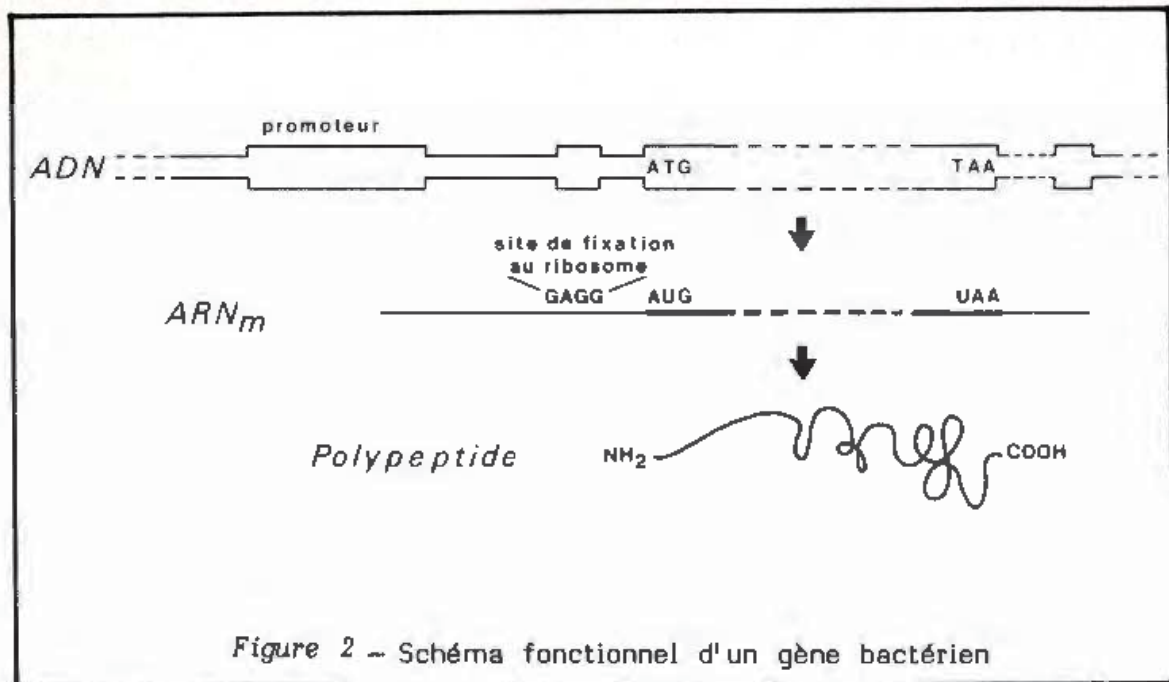
Si la glycosylation améliore généralement la thermostabilité d'une protéine, voire modifie la spécificité d'une enzyme, celle-ci ne semble pas indispensable à l'activité biologique. C'est ainsi que l'interféron humain produit par *E. coli*, bien que non glycosylé, semble présenter une activité biologique normale. Quoi qu'il en soit, des hôtes alternatifs de clonage, tels que les levures, capables de glycosylation, pourraient alors être utilisés pour effectuer cette modification post-traductionnelle sur des protéines étrangères.

B. AMELIORATION DE L'EXPRESSION D'UN GENE

Dans le cas d'une enzyme produite en trop faible quantité, par un organisme quelconque, le gène correspondant peut être cloné dans un microorganisme et son niveau d'expression considérablement augmenté en changeant sa régulation.

Deux types de modifications permettent actuellement, d'obtenir ce résultat :

- augmenter le nombre de copies du gène par cellule, ce qui accroît la synthèse protéique par un effet de "dosage de gène" (par exemple, avec 10 copies du gène dans la cellule, une production multipliée par 10 de la protéine est attendue). Ceci est généralement obtenu en clonant le gène dans un plasmide existant à un grand nombre de copies par cellule (plasmide multicopie comme pKN402, tableau I).
- altérer l'expression du gène en changeant sa régulation. La figure 2 présente les différents signaux de régulation intervenant dans l'expression d'un gène. Le niveau d'expression d'un gène est en effet principalement fonction de l'efficacité de son promoteur. A l'heure actuelle les promoteurs "forts" (placés en amont du gène intéressant) les plus couramment utilisés chez *E. coli* sont : *Plac* (lactose), *P_{trp}*, *P_{cat}* et *P_L* (promoteur du phage lambda).



La transcription d'un gène à partir des promoteurs *Plac* et *PL* présente de plus l'avantage de pouvoir être régulée ; un répresseur, se fixant au voisinage du promoteur, empêche la fixation de l'ARN polymérase. L'induction des gènes dépendra alors soit de l'adjonction de lactose (*Plac*) au milieu de culture, soit d'une élévation de température (*PL*) au-dessus de 37°C (42°C pour *E. coli*). La protéine codée par le gène ainsi régulé pourra alors représenter jusqu'à 20 % des protéines totales de la culture.

L'expression d'un gène peut également être améliorée, mais dans une moindre mesure, par mutagenèse dirigée de la séquence de fixation de l'ARN messager sur le ribosome (séquence de *Shine* et *Dalgarno* dans un sens favorisent cette fixation et augmentent donc l'efficacité de la traduction.

C. AMÉLIORATION DE LA PROTÉINE ENZYMATIQUE PAR INTERVENTION SUR LE GÈNE

Parmi les propriétés des enzymes qu'il serait souhaitable de pouvoir modifier dans un sens déterminé, figurent :

- les propriétés cinétiques (K_m , V_{max}) ;
- la thermostabilité et l'optimum de température ;
- la stabilité et l'activité dans des solvants non aqueux, ou biphasiques ;
- la spécificité ;
- les exigences en cofacteurs ;
- l'optimum de pH et la résistance à des pH extrêmes ;
- la résistance à des protéases, glycosyltransférases ;
- la régulation allostérique...

Plusieurs voies s'offrent alors pour rassembler le maximum de propriétés favorables dans une même enzyme :

- rechercher une enzyme "naturelle" la mieux adaptée, lors du criblage de collections d'organismes (voir paragraphe suivant) ;
- modifier la protéine par génie enzymatique (voir p. 105) ou par génie génétique.

En partant de la structure tridimensionnelle de la protéine, des programmes informatiques permettent de prévoir les changements conformationnels qui seraient induits lors du remplacement d'un acide aminé par un autre. La conformation souhaitée peut alors être obtenue par action au niveau du gène qui peut être modifié dans sa partie codante, comme dans ses séquences de régulation, par mutagenèse dirigée *in vitro*. Cette mutagenèse se différencie de celle "au hasard" en provoquant uniquement la mutation désirée (insertion, délétion, substitution). Un oligonucléotide de synthèse comportant la mutation désirée, est hybridé à une séquence du gène cloné, l'ADN polymérase répliquant le reste inchangé du gène.

Si de nombreux changements dans la séquence de la protéine sont désirés, une approche plus radicale peut être envisagée : la synthèse chimique du gène entier, comme cela a été réalisé pour les gènes de la somatostatine, de l'insuline et de l'interféron qui est beaucoup plus long. Le gène est alors obtenu par liaison des oligonucléotides synthétisés séparément.

Une autre possibilité consiste en la recombinaison de gènes codant pour des enzymes possédant la même fonction, mais des propriétés différentes, de façon à obtenir des chimères (enzymes hybrides) regroupant les propriétés intéressantes de chaque enzyme naturelle. Cette voie est actuellement explorée dans le but de créer des interférons aux propriétés nouvelles.

Il est bien évident qu'il serait très difficile, sinon impossible, d'obtenir une enzyme idéale rassemblant toutes les propriétés recherchées et qu'il conviendra en général de se contenter d'un compromis.

En conclusion, un corps de techniques existe, qui rend accessible n'importe quelle dépolymérase trouvée dans la nature, même si l'organisme qui la produit naturellement est dangereux ou difficile à cultiver. Mais dans ce domaine si les méthodes sont au point, beaucoup sinon presque tout, reste à faire pour les appliquer aux dépolymérases.

Des expériences au stade pilote sont actuellement conduites avec des souches de *B. subtilis* hébergeant les gènes d' α amylases thermostables de *B. licheniformis* et *B. coagulans*. Mais, à notre connaissance, aucune dépolymérase n'est encore produite industriellement à partir de souches résultant de recombinaison *in vitro* bien que les gènes d'un certain nombre aient déjà été clonés.

D. SOURCES POTENTIELLES

1. ANIMAUX OU VEGETAUX

La littérature permet d'identifier un très grand nombre d'enzymes mis en évidence dans ces organismes ; le problème majeur, non résolu la plupart du temps, réside dans l'approvisionnement (organismes difficiles à trouver, à cultiver ou élever) et le coût de l'extraction.

Ces sources ont été déterminées à partir de nombreux documents consultés ainsi que par l'interrogation des bases de données PASCAL et BIOSIS. Nous tenons à remercier Mademoiselle M. Koechlin (INA-PG) pour sa collaboration à cette occasion.

a) Animaux

De nombreux type d'enzymes sont produits par les animaux, les protéases semblent pourtant avoir été étudiées de manière prépondérante.

- Protozoaires :

. Pectinases : *Dasytrichum ruminantium*, *Isotricha intestinalis*, *I. prostoma*, *Ophryoscolex purkinei*.

. Protéases : *Trypanosoma brucei*, *T. brucei rhodesiense*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. mega*, *Leishmania donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana mexicana*, *L. tarentolae*, *Crithridia lucilae*, *C. fasciculata*, *Leptomonas ctenocephali*, *Herpetomonas muscarum*, *H. ingenoplastis*, *Ochromonas danica*, *O. malhamensis*, *Euglena gracilis*, *Entamoeba histolytica*, *Hartmannella culbertsoni*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. rhyodes*, *Plasmodium gallinaceum*, *P. berghei*, *P. knowlesi*, *P. falciparum*, *P. chabaudi*, *Babesia hylomysci*, *B. argentina*, *B. bigemina*, *Eimeria tenella*, *E. nieshulzi*, *Tetrahymena thermophila*, *Paramecium aurelia*, *P. primaurelia*, *Pseudomicrothorax dubius*, *Entodinium ecacidatum*.

. Cellulases : *Trichomitopsis thermopsisidis*.

- Mollusques :

. Laminarinases :

+ gastéropodes : *Telescopium telescopium*, *Eulota maak* ; les glucanases d'*Hélix pomatia* sont d'ailleurs déjà utilisées pour la préparation de protoplastes de champignons et levures.

+ lamellibranches : *Scrobicularia plana*, *Spisula sachalinensis*.

- Batraciens :

. Allantoïnase de *Xenopus laevis*.

- Arthropodes :

- . Chitinases de différents insectes.

- . Protéases :

- * activité trypsine : *Pieris brassica* (et chymotrypsine),
Apis mellifera (et chymotrypsine),
Vespa orientalis (et chymotrypsine),
Locusta migratoria (et cathepsine),
Manduca sexta, *Tineola bisselliella* (et
chymotrypsine, keratinase, metalloendopeptidase
différentes de celles des bactéries et venins de
serpents, amino et carboxypeptidases).
- * activité chymotrypsine : *Rhodnius prolixus*, *Calliphora*
erythrocephala, *Leucophaea maderae*.
- * Cooonases (séricinase, trypsine) : *Bombyx mori*, *Antherea*
polyphemus, *A. pernyi*, *A. mylitta*.
- * Cathepsine : *Musca domestica*.
- * Collagénase : Larves de *Lucia sericata*, *Hypoderma bovis*.

Des cellulases, pectinases, licheninases, alginase, chitinase, mannanase sont produites par de nombreux insectes, isopodes et surtout diplopodes (ex : *Glomeris* sp.) :

- Poissons :

- . Protéases : *Micropogon undulatus* (alcaline thermostable) ; de nombreux poissons présentent une activité présure.
- . Allantoïnase : foie de poissons.

- Ophidiens :

- . Lipases diverses de venins de serpents.

- Mammifères :

- . Protéases : *Pagophilus groenlandicus* (activité présure)
- . De nombreuses enzymes telles que lipases, lysozyme sont produites dans le pancréas.

Une enzyme mérite un intérêt particulier : la cyclodextrine-glucane glucanotransférase des muscles striés de lapin (voir enzymes artificielles p. 106).

b) Végétaux

Les dépolymérases de composés hydrocarbonés semblent les plus étudiées, ce qui est compréhensible eu égard à la physiologie des végétaux. Il est vraisemblable qu'une recherche systématique de ces enzymes agrandirait considérablement la liste présentée ci-dessous.

- Monocotylédones :

- . α amylases : *Stylosanthes humilis* (et β glucanases, galactomannase, invertase). *Triticum* sp.
- . β glucanases : *Zea mays*.
- . Protéase : *Zizania aquatica* (α amylases, cellulases, hémicellulases).
- . Dextranase : *Avena sativa*.

- Dicotylédones :

- . Pectinases : *Lycopersicum* sp., *Persea americana* (et cellulases).
- . α amylases : *Ipomea batatas*, *Gossypium hirsutum*, racines de papilionacées (*Eminia polyadenia*, *Robinia pseudoacacia* avec amylases, dextranases, laminarinases et glucanases).
- . Hémicellulases : *Medicago* sp.
- . Lipases : *Ricinus communis*, *Brassica oleracea* var. *bullata*.
- . Inulinases : *Cichorium* sp. (racines), *Taraxacum* sp. (racines), *Dahlia* sp. (Tubercules).
- . Allantoïnase : *Phaseolus hystericus*, *Glycine hispita*, *Vigna radiata*, *Sinapis alba*, *Dolichos biflorus*.
- . Cutinase : *Nasturtium* sp. (pollen).

Ce survol rapide des activités dépolymérisantes d'origine animale et végétale ne se veut pas exhaustif, d'autant plus que peu d'études de ce type ont été menées sur ces eucaryotes. Certains groupes de plantes pourraient plus systématiquement être examinés comme, par exemple, les plantes parasites (ex : *Lathraea clandestina*) pour leur protéases et cellulases ou les 450 espèces de plantes carnivores (ex : *Linguicula* sp., *Dionaea* sp., *Utricularia neglecta*) pour leurs protéases et chitinases.

Dans le cas où les problèmes de culture ou d'élevage classiques sont maîtrisés, l'utilisation de sources animale ou végétale est envisageable. De nouvelles techniques *in vivo* restent néanmoins à développer comme l'élevage d'insectes, la culture de protozoaires ou de racines sous brouillard hydroponique (certaines racines sont connues pour exsuder différentes enzymes : nucléases, lipase, amylases, cellulases et peut-être protéases et phytases).

En revanche certaines cultures ou élevages ne sont pas toujours possibles ou rentables et il convient alors de souligner les possibilités offertes par les cultures de cellules. En ce qui concerne les végétaux, cette technique a déjà permis, dans quelques cas, l'obtention d'enzymes :

- α amylases de *Saccharum officinarum*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum* dont une pullulanase ;
- cellulases de *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* ;
- protéases de cals de *Carica papaya*.

De même a-t-il été possible d'obtenir une urokinase à partir de cultures de cellules de rein embryonnaire.

Les cellules végétales ainsi mises en culture passent par une phase juvénile et peuvent s'exprimer différemment. Des cultures de cellules peuvent alors produire les mêmes enzymes que l'organisme d'origine ou au contraire en produire de nouvelles (cas des cals de papayer). Une autre possibilité intéressante serait l'utilisation de cellules transformées (par *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*) car elles nécessitent des milieux de culture moins complexes donc moins coûteux.

Les cellules animales n'ont pas, jusqu'à présent, été utilisées dans ce sens. La technique des hybridomes pourrait éventuellement permettre d'obtenir des clones à forte multiplication et sécrétant une enzyme particulièrement intéressante. Dans l'état actuel des travaux, et en particulier du coût des milieux, une telle technique, pour être rentable, ne pourrait s'appliquer qu'à des enzymes rares, chères et très difficiles à obtenir par d'autres voies, à moins qu'une technique particulière (multiplication de cellules de myélome, par exemple, dans la cavité péritonéale d'animaux) soit également disponible.

D'une manière générale un potentiel important existe au niveau des animaux et végétaux mais l'utilisation de nombre d'entres eux (insectes, protozoaires, racines sous brouillard) nécessiterait avant tout une adaptation de l'appareil de production industriel actuellement basé sur les fermentations de microorganismes. L'application dans ces cas du génie génétique est à nouveau à considérer.

2. MICROORGANISMES

Nous abordons avec les microorganismes la source la plus importante, car la mieux étudiée, d'enzymes de dépolymérisation. La quantité d'informations dans ce domaine est telle que dans quelques cas nous n'avons présenté que les familles (cas des pourritures blanches par exemple) et que cette présentation sera faite sous forme de tableaux. Ces tableaux présentent 7 colonnes regroupant des enzymes apparentées (amylases, pectinases par exemple), autant que possible des différenciations ont été introduites par l'utilisation de symboles, exemple : protéase de type élastase-e. Une colonne nommée "divers" regroupe différents types d'enzymes non classées dans les sept groupes.

La lecture des tableaux renseignera le lecteur sur l'extrême variété des activités enzymatiques décelées et nous nous limiterons dans le texte à quelques rares remarques particulières aux deux grands groupes de microorganismes. Un complément, très utile, à ces tableaux pourra être

trouvé, pour les Basidiomycètes en particulier, dans l'article de J.L. Lamaison [10] relatif aux activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et hemicellulolytiques de 334 espèces fongiques de France.

Pour présenter les microorganismes, nous avons adopté d'une part la classification des bactéries du manuel de Bergey [4], d'autre part, celle de Ainsworth Sparrow et Sussman [3] pour les champignons (les auteurs remercient vivement Madame Roquebert, du Laboratoire de cryptogamie du Muséum d'histoire naturelle, pour son aide quant à la taxonomie des champignons) ; en dernier ressort le nom d'une espèce fongique a été conservé si la souche était disponible à la collection de Baarn (catalogue 1978, Hollande).

a) Bactéries

Parmi les bactéries Gram-positif (Tableau II) le germe *Bacillus* est le plus connu bien que seules quelques espèces soient utilisées sur une large échelle. De nombreux développements sont à attendre de ce côté depuis que le gène d'une α amylase de *Bacillus licheniformis* a été cloné chez *E. coli* et introduit chez *Bacillus subtilis*. A côté des *Bacillus* les bactéries anaérobies s'avèrent riches en enzymes de dépolymérisation de composés glycosidiques. Ces genres, difficiles à étudier et cultiver, peuvent devenir des fournisseurs de gènes intéressants, comme dans le cas de l'endoglucanase de *Clostridium thermocellum* dont le gène a été cloné chez *E. coli*. De nombreux genres de bactéries Gram-positif semblent sous exploités, c'est le cas par exemple des *Corynebactéries* phytopathogènes, des *Arthrobacter* qui rassemblent des espèces très diverses aux propriétés très variées.

Parmi les bactéries Gram-négatif il convient d'insister particulièrement sur les entérobactéries (anaérobies facultatives), ainsi que sur les *Pseudomonas* genre très polyphage. Cet intérêt s'est déjà manifesté par le clonage d'un gène de pullulanase de *Klebsiella pneumoniae*. L'ensemble des bactéries phytopathogènes (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*) pourrait être une excellente source d'enzymes dépolymérisantes particulièrement adaptées à tel ou tel substrat végétal (existence de "pathotypes").

b) Champignons

Le tableau III présente la répartition des activités enzymatiques telle qu'elle ressort de l'étude bibliographique. Les activités enzymatiques sont répertoriées dans un grand nombre de genres et familles et intéressent la plupart des substrats.

Il est évident que ce panorama n'est pas exhaustif, aucune étude systématique d'ensemble n'ayant, à notre connaissance, été faite. La plupart du temps ces activités sont le fruit de la mise en évidence fortuite d'une enzyme ou de sa recherche sur des indices nets d'activité. Il paraît évident, à la lecture de ce tableau, que beaucoup d'autres genres sont en général capables de produire les mêmes activités que tel ou tel "champion" industriel. Si la commodité de culture ou/et le niveau des performances ont généralement présidé au choix d'une souche industrielle, il est probable que la méconnaissance des performances d'autres espèces ou genres aura également joué.

Il n'est pratiquement pas fait mention dans le tableau des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, car jusqu'à cette année (*E. Odier*

et X. Rouau, dans cet ouvrage) aucune enzyme n'avait été mise en évidence et les activités ligninolytiques ne peuvent être obtenues que dans des cultures de microorganismes ligninolytiques.

Des activités très intéressantes de dégradation de la lignine et/ou des composés hydrocarbonés peuvent être trouvées parmi :

- les champignons responsables de pourriture blanche : Hymenomycètes. (holobasidiomycètes : Agaricaceae, Corticiaceae, Hydaceae, Polyporeaceae et Telephoraceae) et quelques Sphaeriales (*Hypoxylon* sp., *Xylaria* sp.).
- les champignons responsables de pourriture brune : Hymenomycètes.
- les champignons agents de décomposition de la litière (*Clavaria* sp., *Collybia* sp., *Marasmius* sp., *Mycena* sp.).

Ces champignons présentent généralement des activités protéolytiques intéressantes.

L'impression qui se dégage de l'examen de ces tableaux est celui d'un vaste ensemble aux grandes possibilités, mais dont l'exploitation et même la définition n'ont jamais été systématiquement entrepris.

Un grand pas en avant serait effectué avec la mise en place de techniques normalisées de dosage afin de pouvoir comparer les niveaux d'activité, le principal problème à résoudre étant la commercialisation de substrats bien définis et de qualité homogène (celluloses cristallines, hémicelluloses en particulier).

Les symboles sont explicités p. 81

TABLEAU II - Activités enzymatiques dépolymérisantes de quelques bactéries										
GRAM +	Groupes du Manuel de Bergy	Amylases	Hémicellulases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases	Subérases
	2			+
	2	p +
	14	p
	14	lpx ^{gg} x	+
	15	p
		α	αp	β	+	+	+	+	+	+
		β	αp	β	+	+(p)	+	s		
		αp	αp	β		+(p)				
		gt ^{α t}	β							
			+(x)							
			β							

Groupe du manuel de Bergey	Number of strains	Morphology	Gram	Enzymatic activities									
				Amylases	Hem-cellu- lases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases	Suberases	
16	BATONNETS DROITS	(stercorarium (BW)	GRAM +	α	h
		(thermohydro-sulfuricum (welchii (thermocellum	
		LACTOBACILLUS	
		acidophilus	
		bulgaricus	
		casei	
14	COCCI	LEUCONOSTOC	GRAM +	P
		sp.		
		MICROCOCOCCUS		α
		halobius	
14		(caseolyticus	GRAM +	P	
		sp.		
14		STAPHYLOCOCCUS	GRAM +	
		sp.		
14		STREPTOCOCCUS	GRAM +	
		types		
		(A (B											

Groupe du manuel de Bergey	Bergey	ANEROBIES	BACTEROIDES amylophilus fragilis (subsp. thetaiotaomicron) ruminicola sp. succinogenes	AMYLOSES	HEMICELLULOSES	PECTINES	CELLULOSES	PROTEASES	LIPASES	DIVERS	CUTINASES	GRAM +
7	THERMUS aquaticus sp. (caldophilus)		
8	VIBRIO perahaemolyticus sp.			+	..	+
7	XANTHOMONAS campestris (var. mannihotis) (var. oryzae) sp.	BATONNETS		+	..	+
8	YERSINIA sp.		
8	ZYMOMONAS sp.			+
6				α	β	γ	δ	ε	ζ	η	θ	κ

9	ANAEPROBES	BUTYRIVIBRIO fibrisolvens	1xppg	+	+	i
		LACHNOSPIRA multiparus	+
		SUCCINOMONAS amylolytica	+
7	COCCI	ALCALIGENES (lyticus sp.)								
10		ACINETOBACTER sp.	+	+	c
GRAM NEGATIVE			α							dh

SYMBOLES

- Amylases : α amylases (α), β amylases (β), glucose-isomérase (*gi*), amyloglucosidase (a), cyclodextrine glucane-glucanotransferase (c), α 1-6 glucosidases (p).
- Hémicellulases : β glucanases (β), laminarinases (l), mannanase (m), galactanase (g), xylanase (x), arabinanase (a), glucomannase (*gm*), pentosanase (p).
- Cellulases : présentent apparemment une activité sur la lignine ou des modèles moléculaires (lignine).
- Protéases : élastase (e), kératinase (k), collagénase (c), activité présure (p), activité fibrinolytique (f).
- Divers : inulinase (i), levan-hydrolase (*lh*), dextranase (d), chitinase/lysozyme (c), allantainase (a), hyaluronidase (h), phytase (p), sphingomyelinase (s), lichininase (*li*), hydrolase des glucanes de levure (y), limonoate deshydrogénase (*ld*), desoxylimonine hydrolase (*dh*).
- t : indique une souche signalée comme thermophile ou thermotolérante ou une enzyme signalée comme thermostable.
- les noms entre parenthèses signalent les synonymies.
- les noms regroupés sous l'abréviation *sp.* signalent des noms actuellement non reconnus en taxonomie.

Les symboles sont explicités p. 81 et 103

TABLEAU III - Activités enzymatiques dépolymérisantes de quelques champignons		Amylases	Hémicellulases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases
MYXOMYCOTA	ACRASID-MYCETES	DYCTYOSTELIUM discoideum mucoroides purpureum				+	+		
	MYXO-MYCETES	PHYSARUM cupripes (flavicomum) polyccephalum			+	+	+		
EUMYCOTA	MASTIGOMYCOTINA	CHYTRIDIID-MYCETES				+			
			BLASTOCLADIELLA emersonii						
		CHYTRIOMYCETES hyalinus							
	OOMYCETES	PHYTOPHTORA cactorum cryptogea infestans palmivora parasitica							

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Outinases
EUMYCOTA

ASCOMYCOTINA

LABOUL-BENIOMY-CETES

PYRENOMYCETES

TALAROMYCES
sp. (byssochlamydoides)
(sp.)
THERMOASCUS
auriantiacus
APHANOMYCES
astaci
ANIXIELLA
sp.
CERATOCYSTIS
(Ophiostoma ulmi)
ulmi
CHAETOMIUM
brasiliense
cellulolyticum
globosum
gracile
sp.
(geniculata)
spirale
thermophilum
(var. dissitum)
CLAVICEPS
purpurea

		Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases
EUMYCOTA	ASCOMYCOTINA
	DISCOMYCETES
	MONILINIA fructigena PEZICULA malicorticis SCLEROTINIA fructigena minor sclerotiorum
BASIDIOMYCOTINA	AGARICACEAE (lignine)	..	ga	..	+
	AGARICUS bisporus
	ARMILLARIA mellea
	COLLYBIA velutipes
	COPRINUS lagopus
	macrorhizus
	radians sp. (microsporus)
GASTEROMYCETES	

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases	Cutinases
DAEDALEOPSIS nipponica sp. (styracus)	::	::	::	::	::	::	::	::	::
DICHOMITUS squalens (Polyporus anceps) (Trametes polyporus)	::	+	+	+	+	::	::	::	::
FOMES annosus (Ungulina annosa)	::	::	::	+	::	::	::	::	::
FOMITOPSIS pinicola sp. (castanea)	::	::	::	::	+(p) +	::	::	::	::
GLOEOPORUS sp. (adustus)	::	::	::	+	::	::	::	::	::
GYROPHANA lacrymans	::	::	::	+	::	::	::	::	::
HYDNACEAE (lignine)	::	::	::	+	::	::	::	::	::
IRPEX lacteus sp.	::	+	+	+	+(p) +(p)	::	::	::	::
EUMYCOTA									
BASIDIOMYCOTINA									
HYMNOMYCETES									

EUMYCOTA	BASIDIOMYCOTINA	HYMENOMYCETES	LENZITES		
			betulina
			sp.
			(trabea)
			MICROPORUS
			sanguineus
			(Trametes sanguinea)
			OXYPORUS
			populinus
			PHANEROCHAETE
chrysosporium			
(Sporotrichum pulverulentum?)			
PELLLINUS			
sp.			
(abietes)			
POLYPORACEAE			
(lignine)			
POLYPORUS			
adustus			
cytisina			
(Fomitopsis cytisina)			
PORIA			
mucida			
sp.			
(subacida)			
vaporaria			
(Trametes vaporaria ?)			

		Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases	suberases
EUMYCOTA	BASIDIOMYCOTINA									
	HYPHOMYCETES									
	PYCNOPORUS coccineus	::	::	::	::	+	::	::	::	::
	STEREUM sanguinolentum	::	::	::	+	::	::	::	::	::
	TANATEPHORUS filamentosus forme sasaki (Pellicularia sasaki)	::	::	::	::	::	::	γ	::	::
	THELEPHORACEAE (lignine)	::	::	::	::	::	::	::	::	::
	TRAMETES hirsuta quercina suaveolens	a	x	::	::	::	::	::	::	::
	TYROMYCES sp. (palustris)	::	x	::	+	::	::	::	::	::
	ALTERNARIA alternata (mali) macrospora sp. tenuis tenuissima		x + β	+	+					+

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases	Substrates
-Versicolor sydowi versicolor -Wentii terricola	α	β .. + + + +(p)
AUREOBASIDIUM pullulans (Pullularia pullulans) + +
BEAUVERIA bessiana + c
BOTRYOTRICHUM sp. +
BOTRYTIS allii cinerea + + +	.. + +
CERCOSPORA arachidicola + +
CERCOSPORELLA herpotrichoides sp. (beticola) x + +
CHRYSO sporium pruinorum +
EUMYCOTA									
DEUTEROMYCOTINA									
HYPHOMYCETES									

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases	Substrates
sp. tricinatum	+	+	+	+	+	+		+	+
GEOTRICHUM candidum	+	+	+	+	+	+		+	+
GILMANIELLA humicola	+	+	+	+	+	+		+	+
GLIOCLADIUM roseum	+	+	+	+	+	+		+	+
HELMINTHOSPORIUM sativum	+	+	+	+	+	+		+	+
sp.	+	+	+	+	+	+		+	+
HIRSUTELLA thompsonii	+	+	+	+	+	+		+	+
HUMICOLA insolens	+	+	+	+	+	+		+	+
grisea (var thermoidea)	+	+	+	+	+	+		+	+
lanuginosa	+	+	+	+	+	+		+	+
sp. (sp. lutea)	+	+	+	+	+	+		+	+
MALBRANCHEA pulchella	+	+	+	+	+	+		+	+
METARRHIZIUM anisopliae	+	+	+	+	+	+		+	+
EUMYCOTA									
DEUTEROMYCOTINA									
HYPHOMYCETES									

	EUMYCOTA										
	DEUTEROMYCOTINA										
	HYPHOMYCETES										
SPOROTRICHUM
dimorphosporum	+
pulverulentum
(Phanerochaete chrysosporium ?)
(apinis)
(asteroides)
thermophile
STACHYBOTRYS
atra
sp.
THERMOMYCES
stellatus
TRICHODERMA
hamatum
harzianum
koningii
longibrachiatum
pseudo koningii
(lignorum)
(sp.)
reesei
viride
TRICHOPHYTON
sp.
TRICHOOTHECIUM
roseum
TRICHURUS
spiralis

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Proteases	Lipases	Divers	Cutinases suberases
EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	TRITIRACHIUM album	::	::	::	::	::
			ULOCADIUM consortiale (Stemphylium consortiale)	::	::	::	::	::
			VERTICILLIUM alboatrum dehlieae	::	::	::	::	::
			ASCOCHYTA (vicia sp. (viceae	::	::	::	::	::
			BOTRYODIPLODIA theobromae	::	::	::	::	::
			CONIOTHYRIUM sp. (diplodiella)	::	::	::	::	::
			GLOEOSPORIUM sp.	::	::	::	::	::
			MACROPHOMINA phaseoli (Rhizoctonia lamellifera) phaseolina	::	::	::	::	::

	Amylases	Hemicellulases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases	Subérasases
EUMYCOTA	ENDOMYCOPSIS								
	capularis	a							
	fibuligera	α							
	(Endomyces hordei)								
	javanensis	α							
	sp.	pa							
	vini	α							
	(lindneri)								
	KLUYVEROMYCES								
	fragilis		x	+	+			- -	
lactis									
marxianus			+						
LYPOMYCES									
kononenkae	p						- -		
lipofer									
starkeyi									
PICHIA									
polymorpha									
sp.	α a		+				i		
RHODOTORULA									
glutinis									
sp.			+				p		
SACCHAROMYCES									
carlsbergensis									
									+
ASCOMYCOTINA									
HEMIASCOMYCETES									

	EUMYCOTA		ASCOMYCOTINA		HEMIASCOMYCETES									
cerevisiae														
chevalieri														
(diastaticus)														
sp.														
SCHIZOSACCHAROMYCES														
pombe														
SCHWANNIOMYCES														
alluvius														
castellii														
TRICHOSPORON														
penicillatum														
(heteromorphon)														
sp.														

SYMBOLES

- Amylases : α amylases (α), β amylases (β), glucose-isomérase (*gi*), amyloglucosidase (a), cyclodextrine glucane-glucanotransferase (c), α 1-6 glucosidases (p).
- Hémicellulases : β glucanases (β), laminarinases (l), mannanase (m), galactanase (g), xylanase (x), arabinanase (a), glucomannase (*gm*), pentosanase (p).
- Cellulases : présentant apparemment une activité sur la lignine ou des modèles moléculaires (lignine).
- Protéases : élastase (e), kératinase (k), collagénase (c), activité présure (p), activité fibrinolytique (f).
- Divers : inuline (i), levan-hydrolase (*lh*), dextranase (d), chitinase/lysozyme (c), ailantoinase (a), hyaluronidase (h), phytase (p), sphingomyélinase (s), lichininase (*li*), hydrolase des glucanes de levure (y), limonoate deshydrogénase (*ld*), desoxylimonine hydrolase (*dh*).
- t : indique une souche signalée comme thermophile ou thermotolérante ou une enzyme signalée comme thermostable.
- les noms entre parenthèses signalent les synonymies.
- les noms regroupés sous l'abréviation *sp.* signalent des noms actuellement non reconnus en taxonomie.

Les criblages étant en général fastidieux, en particulier lors de la recherche d'activités particulières, la disponibilité en anticorps spécifiques des sites actifs, ou des sites de reconnaissance des substrats, et donc des types d'activité s'avèrerait extrêmement utile. Les développements en immunologie, permettant en particulier d'obtenir des anticorps contre de petites séquences polypeptidiques (de sites actifs en particulier) et en grande quantité (anticorps monoclonaux), devraient permettre une résolution rapide du problème du criblage.

La recherche parmi les microorganismes adaptés à des biotopes particuliers (pH et température extrêmes, composés habituellement inhibiteurs), d'enzymes extracellulaires est une voie prometteuse pour la découverte d'enzymes à activités nouvelles.

III. POSSIBILITES D'AMELIORATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Différentes méthodes intervenant à divers niveaux sont utilisables pour l'amélioration des activités enzymatiques.

A. AMELIORATION DE LA PRODUCTION

Celle-ci a déjà fait l'objet de nombreux articles classiques auxquels nous renvoyons les lecteurs (voir par exemple le numéro spécial de *Pour la Science* cité dans la bibliographie).

Pour mémoire signalons que les interventions peuvent porter sur les conditions de croissance (cultures submergées, à deux étapes, teneurs en CO₂), l'utilisation d'inducteurs "gratuits" (en général des dérivées d'inducteurs métabolisables), l'emploi de surfactants (Tween 80, monopalmitate de l'oléate de sodium) non ionisés par opposition aux antimousses qui diminuent souvent la production, ou la fixation de cellules (entraînant en général une augmentation du taux de croissance).

B. AMELIORATION DES SOUCHES PRODUCTRICES

De nombreux exemples sont disponibles dans la littérature, en particulier pour la production d'antibiotiques (exemple de *Penicillium chrysogenum*). Ces techniques font en général intervenir des cycles de mutagénèse, enrichissement (enzymes constitutives, souches hyperproductrices, résistance à la répression catabolique, modification des membranes) et plus récemment le génie génétique (clonage, amplification de gènes, fusion de gènes). Ces nombreuses techniques sont rapportées dans la partie II.

C. AMELIORATION DES ENZYMES OU DE LEUR ACTIVITE

Diverses possibilités existent quant à une intervention directe sur les enzymes.

1. IMMOBILISATION

Les principaux efforts actuels portent sur l'immobilisation par liaisons covalentes sur un support insoluble, par microencapsulation ou par utilisation d'un système à 2 phases. Non seulement ces techniques permettent de conserver les enzymes mais de plus modifient souvent les caractéristiques de ces activités : augmentation de la durée de vie, de la thermostabilité, modification du pH d'action (création d'un microenvironnement) et quelquefois des constantes (K_m , V_{max}). C'est ainsi que l'activité fibrinolytique de l'enzyme d'*Aspergillus terricola* est augmentée après couplage à du dextrane et s'avère moins sensible aux inhibiteurs sériques. Une difficulté non résolue réside encore dans le cas des enzymes à cofacteurs, produits généralement coûteux et généralement non régénérés ; une solution envisageable serait peut-être l'intégration de ces derniers à la molécule enzymatique, pour constituer des enzymes à groupement prosthétique comme dans le cas de la flavopapaïne.

En outre, dans quelques cas la réticulation des protéines (au glutaraldehyde en particulier) a été signalée comme modifiant les propriétés des enzymes (apparemment augmentation de la durée de vie, de la thermostabilité).

De nouveaux développements sont donc à attendre de la recherche, fondamentale et appliquée, dans ce domaine ; un progrès devrait, de même, être recherché en cinétique enzymatique de surface hétérogène (modélisation).

2. MODIFICATION DES FONCTIONS DES PROTEINES

Des améliorations importantes sont à rechercher quant à la solubilité des protéines, leur capacité émulsifiante, leur élasticité.

La thermostabilité des protéines a souvent été corrélée avec la présence de métaux, d'une partie glucidique, et/ou de séquences d'acides aminés (avec en particulier des ponts disulfures). Il a été rapporté, dans quelques cas, que la modification de la glycosylation d'une protéine modifiait les caractéristiques cinétiques et l'affinité d'enzymes.

Des études importantes devraient donc être entreprises quant aux effets de la glycosylation, des thiolation, phosphorylation ou hydroxylation des protéines. Ces modifications généralement menées par voie chimique pourraient être améliorées par l'emploi d'enzymes spécifiques comme, dans le cas des thiolations, la thioldisulfure isomerase du foie de boeuf, ou la disulfure réductase de *Saprolegnia monoica*.

Un grand avenir est donc ouvert à l'étude des enzymes "post-ribosomales" (modifications post-traductionnelles). Les réticulations et

glycosylations devraient permettre la synthèse de systèmes multienzymatiques comme il en existe naturellement. C'est ainsi qu'un article récent met en évidence chez *Trichoderma reesei* l'existence d'un complexe multienzymatique lié par une partie glycosidique et exprimant à la fois des activités glucosidase, xylanase et endocellulase.

3. REACTION PLASTEINE

Cette technique fait appel à l'hydrolyse partielle des protéines puis, après élimination d'éléments indésirables et l'apport d'éléments intéressants, à la renaturation des protéines. Cette technique est actuellement utilisée pour la fortification par de la méthionine des protéines de soja (le rapport d'efficacité protéique devient alors supérieur à celui de la caséine), pour l'augmentation (ou la diminution) de la solubilité des protéines dénaturées de soja (par exemple par incorporation d'acide glutamique), pour l'extraction de composés toxiques ou indésirables, et enfin pour la modification des propriétés fonctionnelles ou physiques de protéines.

Le coût de cette hydrolyse est directement fonction de celui des protéases utilisées. De nouvelles sources de protéases sont donc à rechercher tant chez les microorganismes que dans les cellules d'eucaryotes (protéases lysosomales).

Cette technique jointe aux études fondamentales (séquençage de protéines, cristallographie, rayons X, permet d'espérer obtenir des enzymes, dans un laps de temps inconnu, "conçues sur mesure", en particulier par application du génie génétique.

D. ENZYMES ARTIFICIELLES

Ces molécules dérivées de la chimie (cas des cryptates) ou de l'enzymologie (cas des cyclodextrines) présentent une activité catalytique ; deux types sont, à notre connaissance, actuellement étudiés :

- les cryptates synthétiques, actuellement principalement utilisés pour des chélation très spécifiques ;
- les cyclodextrines de *Schardinger*, principalement utilisées pour la microencapsulation de pesticides ou parfums et résultant de la dégradation de l'amidon par la cyclodextrine glucane-glucanotransférase de *Bacillus macerans*.

Ces molécules sont capables de reconnaître et fixer un substrat parmi un ensemble de molécules et de catalyser une réaction, la spécificité de cette catalyse peuvent être modifiée dans le cas des cyclodextrines par variation de leur architecture interne.

Si les cryptates sont relativement bien connus en raison de leur nature synthétique, il n'en est pas de même pour les cyclodextrines résultant d'une activité enzymatique, dont les sources actuelles sont rares.

Un certain nombre de réactions catalytiques sont déjà connues et il a ainsi été possible d'obtenir, dans le cas des cyclodextrines, des vitesses de réaction (activité protéolytique sur des substrats de type ester) supérieures à celles d'enzymes naturelles (chymotrypsine de R. Breslow [6]).

Les progrès de la chimie dans ce domaine sont donc à suivre avec beaucoup d'attention.

CONCLUSION

Comme nous venons de le voir au cours de ce chapitre de multiples possibilités existent quant au développement de nouvelles sources d'enzymes ou à l'amélioration des sources actuelles.

En ce qui concerne le criblage des nouvelles sources, une demande importante existe quant à une meilleure connaissance des substrats, de leur structure et pour des produits commerciaux standardisés. Quant aux techniques de génies génétique et enzymatique, elles sont dans l'ensemble connues et accessibles à la majorité des laboratoires industriels.

Les contraintes toxicologiques ne devraient pas constituer un obstacle au développement de ces techniques. Il est possible en effet de cloner dans des "GRAS organisms" tel ou tel gène provenant de microorganismes pathogènes ou d'eucaryotes. Il est possible également de modifier par voies enzymatique et génétique des enzymes d'organismes déjà homologués. C'est en fait la volonté d'investir dans ce type de recherches qui permettra un essor véritable.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Advances in Applied Microbiology* (collection 1959-1983), TERLMAN T.D. ed., Academic Press New York and London.
- [2] *Advances in Biochemical Engineering* (collection 1971-1982), GHOSE T.K., FIECHTER A. eds., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [3] AINSWORTH G.C., SPARROW F.K., SUSSMAN A.S., 1973, *The Fungi, an advanced treatise*. Academic Press, New York and London.
- [4] BERGER Y., 1975, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8e ed., BUCHANAN R.C., GIBBONS N.E. eds., The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

- [5] *Biotechnology and Bioengineering Symposium* (collection 1959-1982), GADEN E.L. Jr. ed., John Wiley and Sons, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, Chichester.
- [6] BRESLOW R., 1982, *Science, USA*, 218, 532-537.
- [7] COLLET G.F., 1975, *Exsudations racinaires d'enzymes*. *Soc. bot. Fr. Colloq. Rhizosphère*, 61-75.
- [8] *Developments in Industrial Microbiology* (collection 1960-1982), Arlington, Virginia, Society for Industrial Microbiology.
- [9] *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, 1981, Vol. 19, Alexander Hollaender, USA, Basic Life Science, Plenum, New York.
- [10] LAMAISON J.L., *Intérêt chimiotaxonomique de l'équipement enzymatique des macromycètes*, 1976, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 123, 119-136.
- [11] *La Révolution Biologique*, 1981, *Pour la science*, 149 (numéro spécial).
- [12] LEHN J.M., 1981, *La Chimie supramoléculaire. La Recherche*, 127, 1213-1223.
- [13] *Recombinant DNA*, 1979, *Methods in Enzymology*, WU R. ed., 68, Academic Press, New York and London.
- [14] *Structural and functional aspects of enzyme catalysis*, 1981, EGGERER H., HUBERT R. eds., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [15] TRIGIANO R.N., FERGUS C.L., 1979, *Extracellular enzymes of some Fungi associated with Mushroom Culture. Mycologia*, LXXI, 908-917.