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 dépolymérases : 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-02857639v1

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

YB

Collection dirigée
par Claude Costes

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
JUS

Version preprint

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. THIBAULT. 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

Version preprint

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 Photophysiologie, 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. THIBAULT, 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.

Version preprint

Version preprint

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 maitrisables au plan industriel, manipulations possibles du génome.

I. SOURCES ACTUELLES D'ENZYMES UTILISEES INDUSTRIELLEMENT

A. LES SOURCES

Les végétaux et les animaux fournissent quelques enzymes bien connues ; la plupart d'entres elles sont des protéases : papaïne (*Carica papaya*), bromeline (*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 perticulier deux espèces : *B. licheniformis* (amylase thermostable, protéase alcaline) et *B. subtilis* (et sa variété "*amyloliquefaciens*") (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

Version preprint

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 secréter le moins possible de métabolites secondaires (antibiotiques par exemple),
- secréter 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 SYNTHESE D'ENZYMES

A. POSSIBILITES OFFERTES PAR LE GENIE GENETIQUE

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, les dépolymérases 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 mutagénèse 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.

Version preprint

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 plesmide. 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 bactériophase 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.

Version preprint

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.

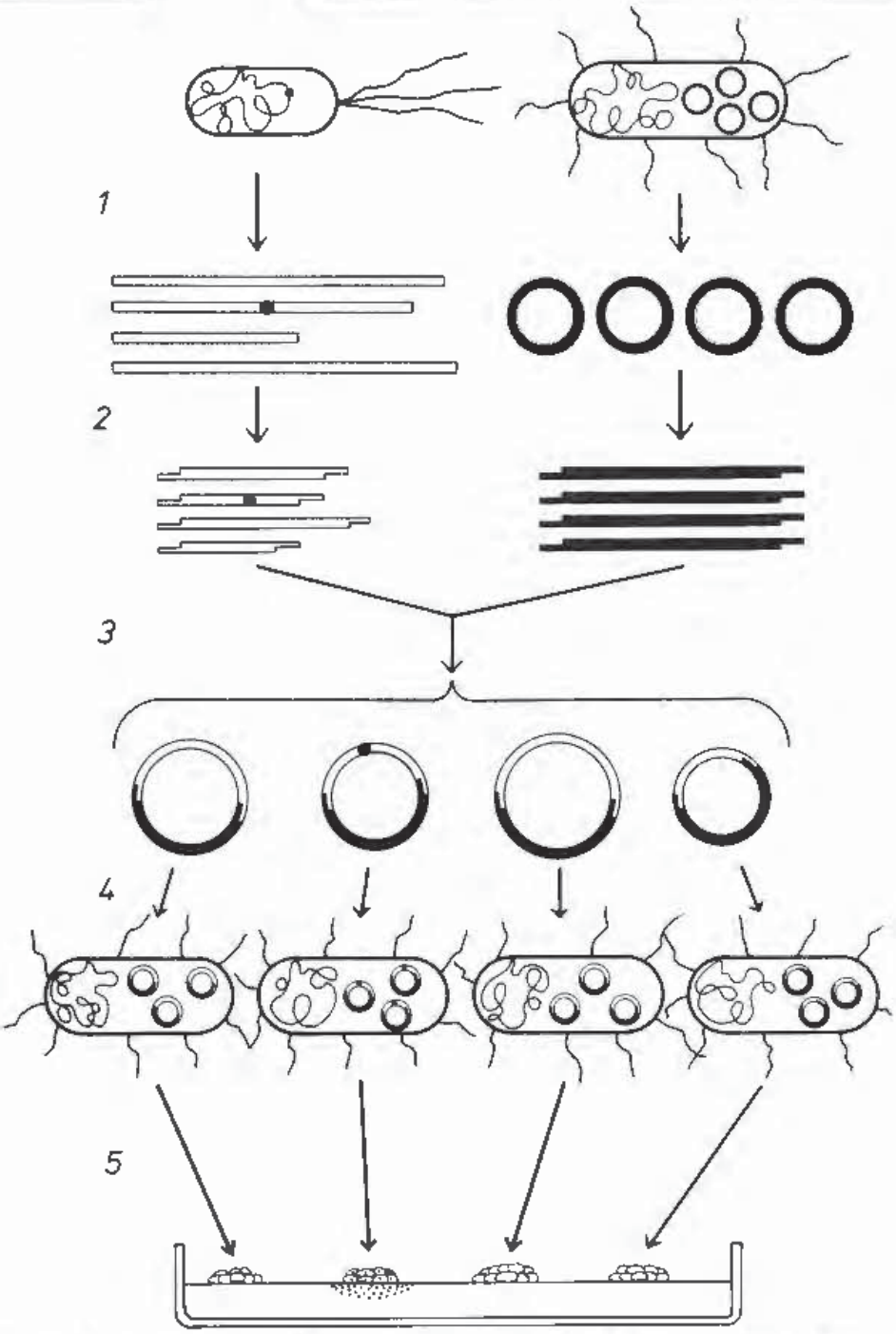

Figure 1 — Exemple de clonage d'un gène bactérien *chez Escherichia coli*

Version preprint

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 débarasser 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.*

Version preprint

Version preprint

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 *E. coli*							
pBR322	pMB1		4,4	Tc^R, Ap^R	EcoRI, HindIII (Tc^R) BamHI (Tc^R), SalI (Tc^R), PstI (Ap^R) PvuI (Ap^R), AvaI, PvuII, ClaI (Tc^R)	*E. coli* 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)	*E. coli*	Multicopie, compatible avec les réplicons ColEI
PSC101	SP219(?)		8,5	Tc^R	EcoRI, HindIII (Tc^R), BamHI (Tc^R), SalI (Tc^R)	*E. coli*	Faible nombre de copies
pDF41	F	Inc F1	12,8	$TrpE^+$	BamHI, EcoRI, HindIII, SalI	*E. coli* et d'autres entérobactéries	Faible nombre de copies
pRK646	R6K	Inc X	3,4	Ap^R	PstI (Ap^R), BamHI, BglII	*E. coli*	Vecteur de confinement pour le clonage de gènes potentiellement dangereux

Version preprint

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-vecteurs d'expression (pour produire en quantité la protéine codée par le gène cloné)							
pM0B48	pKN402 (R1)	Inc FII	9,5	Cm^R, Lac^+	BamHI (Lac^+)	*E. coli* et d'autres entérobactéries	Systèmes à deux plasmides, le vecteur est amplifiable par la température, et le gène, cloné sous le contrôle du promoteur plac, est inductible par le lactose
pCP3	pKN402 (R1)	Inc FII	7,05	Ap^R	EcoR1, BamHI, Xba, SalI, PstI, HindIII	*E. coli* 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	$LacZ^+$	EcoR1 (Lac^+) BamHI (Lac^+) SalI/ (Lac^+) Acc1 (Lac^+) HindII (Lac^+) PstI (Lac^+) HaeIII (Lac^+)	*E. coli*	Vecteur d'expression pour le séquençage des gènes clonés

Version preprint

Plasmides pour le clonage dans d'autres organismes que *E. coli*							
pKT231	RSF1010	Inc Q	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), SalI (Tc^R), BglII, EcoR1	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	EcoR1 (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	Ecor1, BamHI, XbaI, BglII (Km^R)	Bacillus subtilis	Plasmide pour le clonage chez *B. subtilis*
pJ03	pUB110/ pBR322	?	8,8	Km^R, Tc^R, Ap^R	HindIII (Tc^R) SalI (Tc^R)	B. subtilis et *E. coli*	Vecteur navette entre *B. subtilis* et *E. coli*

Version preprint

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/ 2µm	?	8,7	Cm^R, Ap^R $Leu2^+$	PstI (Ap^R), BamHI, PvuI (Ap^R), SalI AvaI	*E. coli* et *S. cerevisiae*	Vecteur navette entre *E. coli* et *S. cerevisiae*
pBR322/ his3	pBR322	?	5,0	Ap^R	EcoR1, SalI, PstI (Ap^R)	*E. coli* et *S. cerevisiae*	Vecteur pour obtenir l'intégration de gènes étrangers ds les chromosomes de *S. cerevisiae*
pLGV2381	pKC7/ pTiC58		?	Ap^R	BamHI	*E. coli*	Vecteur pour le clonage de gènes dans les chromozomes 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), EcoR1, HindIII (Tc^R), EcaI, ClaI (Tc^R), SalI (Tc^R), PstI (Ap^R)	*E. coli*	Cosmide dérivé de pBR322, pour les banques de gènes dans *E. coli*
pLAFR1	RK2	Inc P1	21,6	Tc^R	EcoR1	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram⁻	Cosmide mobilisable par le plasmide pRK2013

Version preprint

pVK102	RK2	Inc P1	23	Tc^R, Km^R	SalI (Tc^R), HindIII (Km^R), XhoI (Km^R)	Large spectre d'hôte parmi les bactéries Gram⁻	Cosmide mobilisable par le plasmide pRK2013
Bactériophages et virus							
L47-1			40	Spi⁺	EcoR1, HindIII, BamHI, XhoI	*E. coli*	Phage-vecteur pour les banques de gènes
SV40	SV40		5,24		BamHI, KpnI, BglI HbaI, HpaII/MspI HaeII, EcoR1, 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 choux-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 cartaines 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 vacteur permettant d'obtenir la transfert et l'expression de gènes étrangers dans les plantes, le gène inséré codant pour la chloramphenicol-acetyltransférase (*cat*) et résistant à la ségrégation méïotique. 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 méïose.

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

Version preprint

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 défeuts 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 vacteurs 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 bectérie 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 2μm de levure,
- les vecteurs du type III portant des origines de replication 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 elors 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*, le 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

Version preprint

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 Grem-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 sécrétées ont été décrits pour des bactéries Gram-négatif. En particulier, il a été démontré dans notre laboratoire, en collaboration ava 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 cytnplasmique (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'ovelbumine 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 contrôleraient 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 le division cellulaire).

Version preprint

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, cella-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), *Ptrp*, *Pcat* et *PL* (promoteur du phage lambda).

Version preprint

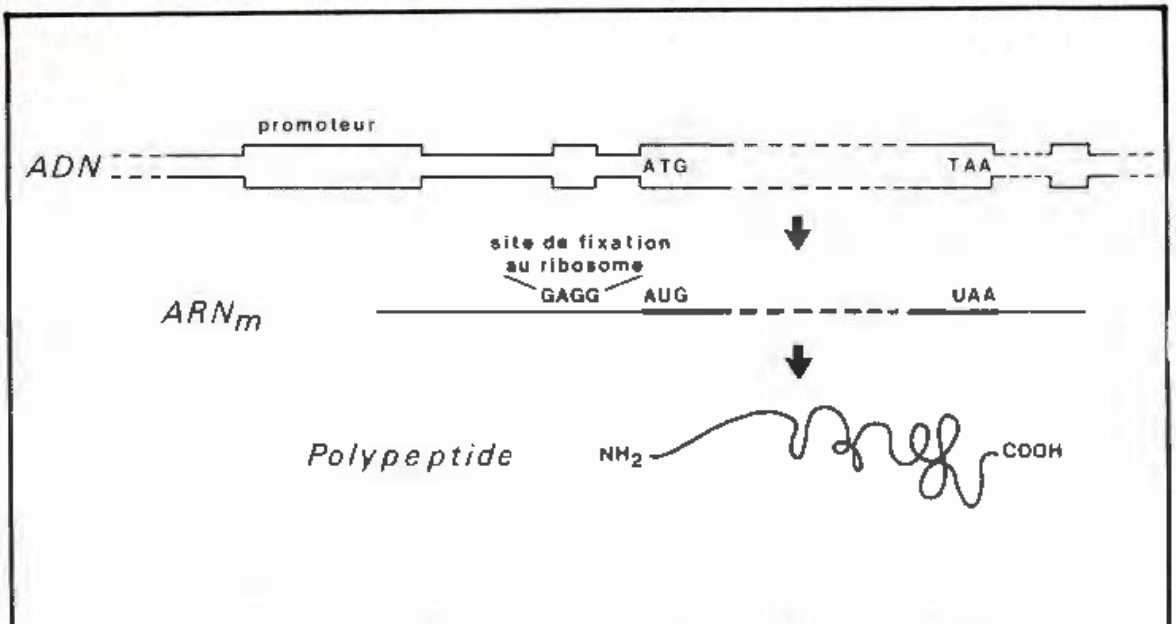

Figure 2 – Schéma fonctionnel d'un gène bactérien

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 pourre 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 favorisant cette fixation et augmentant donc l'efficacité de la traduction.

C. AMELIORATION DE LA PROTEINE ENZYMATIQUE PAR INTERVENTION SUR LE GENE

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 equeux, ou biphasiques ;
- la spécificité ;
- les exigences en cofacteurs ;
- l'optimum de pH et la résistance à des pH extrêmes ;
- la résistance à des protéeses, glycosyltransférases ;
- la réguletion allostérique...

Version preprint

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 celà 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 dépolyméreses.

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.

Version preprint

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 evoir 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, Ochramonas danica, O. malhamensis, Euglena gracilis, Entamoeba histolytica, Hartonanella culbertsoni, Acanthamoeba culbertsoni, A. rhysodes, 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 thermopsidis.*

- Mollusques :

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

  + lamellibranches : *Scrobicularia plana, Spisula sachalinensis.*

- Batraciens :

  . Allantoïnase de *Xenopus laevis.*

Version preprint

- 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 bisselliela* (et chymotrypsine, keratinase, metalloendopeptidase différentes de celles des bactéries et venins de serpents, amino et carboxypeptidases).

* activité chymotrypsine : *Rhodnius prolixus*, *Calliphora erythrocephala*, *Leucophaea maderae*.

* Cocoonases (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 egard* à la physiologie des végétaux. Il est vraisemblable qu'une recherche systématique de ces enzymes agrandirait considérablement la liste présentée ci-dessous.

Version preprint

- 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.*

- Dycotylédones :

  . Pectinases : *Lycopersicum sp.*, *Persea americana* (et cellulases).

  . α amylases : *Ipomea batatas*, *Gossypium hirsutum*, racines de papillionacées *(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), *Dalhia sp.* (Tubercules).

  . Allantoïnase : *Phaseolus hysterinus*, *Glycine hispita*, *Vigna radiata*, *Sinapis alba*, *Dolichas 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 :

Version preprint

- 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 peritonéale 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 sapt 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

Version preprint

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 Laboretoire 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 bectéries 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 anaerobies 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 veriées.

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 réperties 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 dégration de la lignine, car jusqu'à cette année *(E. Odier*

Version preprint

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, Hydnaceae, Polyporeceae 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 commercialisetion de substrats bien définis et de qualité homogène (celluloses cristallines, hémicelluloses en particulier).

Version preprint

Version preprint

TABLEAU II - *Activités enzymatiques dépolymérisantes de quelques bactéries*

	Groupes du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
	2		CYTOPHAGA								
			johnsonae			+					
			sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	2		SPOROCYTOPHAGA								
			myxococcoides				+				
GRAM +			PEDIOCOCCUS								
			sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	14	COCCI anaerobies	RUMINOCOCCUS								
			albus				+				
			flavefaciens		lxpβg	+	+			li	
			sp.		x		+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	14		SARCINA								
			sp.	p							
	15	BATONNETS	BACILLUS								
			acidocaldarius	α							
			alcalophilus					+			
			brevis					+(p)			
			cereus	β			+	+(p)	+	s	
			(var. mycoides)	αp							
			circulans	αp	+(x)						
			coagulans	gi α t							
			laterosporus		β					li	

Les symboles sont explicités p. 81

Version preprint

				lentus			+					
				licheniformis	α_t				+			
				macerans	p c	β						
				megaterium	β				+	+	c	
				polymyxa	pβ		+		+(p)			
				pumilus		β					*li*	
				(acidopullulyticus	p							
				(caldolyticus	α							
				(caldophilus					$+_t$			
				sp. (chitinovorus							c	
				(firms					+(p)			
				(thermophile			+					
				(thermoproteolyticus					$+_t$(p)			
				sphaericus					+(p)			
				stearothermophilus	α							
				subtilis	$\alpha\beta$a	gβam	+		+(p)	+	p *li*	
				(natto, mesentericus)								
				var. amyloliquefaciens	αp	β		+				
GRAM +				thuringiensis	α				+		c	
					.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	15	BATONNETS	CLOSTRIDIUM									
				acetobutylicum							i	
				brevifaciens							c	
				butyricum			+					
				felsineum			+					
				histolyticum					+(c)			
				malacosomae							c	
				perfringens					+(c)	+	c	
				(capitovale					+			
				(guerfelii			+					
				(lockheadii		xpβg	+				*li*	
				sp. (pectinofermentans		x	+					
				(puniceum			+					

Version preprint

	Groupe du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
GRAM +			(stercorarium				+t				
			(BW)								
			(thermohydrosulfuricum				+				
			(welchii						+	h	
			(thermocellum	α			+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	16	BATONNETS DROITS	LACTOBACILLUS								
			acidophilus	+				+(p)			
			bulgaricus					+			
			casei					+(p)			
			helveticus					+			
			jensenii	+				+(p)			
			lactis					+(p)			
			plantarum					+(p)			
			sp.	p							
	14	COCCI	LEUCONOSTOC								
			sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MICROCOCCUS								
			halobius	α							
			(caseolyticus					+(p)			
			sp. (sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	14		STAPHYLOCOCCUS								
			sp.					+	+	h	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	14		STREPTOCOCCUS								
			types (A							h	
			(B							h	

Version preprint

GRAM +		COCCI	anguinosus							i	
			equisimilis					+(f)			
			faecalis							c	
			(subsp. liquefaciens)					+(p)			
			mitis	p							
			pneumoniae							i	
			pyogenes					+(f)		h	
			(haemolyticus)								
			salivarius							d	
			(mutans)								
			sanguis							i	
			(allantoicus							a	
			(aureus						+	h	
			sp. (parvus						+		
			(sp.	p			+				
	17	ACTYNOMYCETES et organismes reliés	ACTINOMYCES								
			bovis	+							
			sp.		β					y	
			(cinerosus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		ACTINOPLANES								
			sp.	gi		+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		ARTHROBACTER								
			globiformis							ld	
			(ureafaciens)					+(e)		i	
			luteus		β						
			(allantoicus							a	
			sp. (iophagus					+			
			(sp.	gi		+				l	
			tumescens							l	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		BREVIBACTERIUM								
			fuscum							d	
			(var. dextranlyticum)								

Version preprint

	Groupe du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
			lipopyticum						+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		CELLULOMONAS								
			sp.		x		+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		CORYNEBACTERIUM								
			sepedonicum			+					
			sp.			+			+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		MICROBACTERIUM								
			sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		MICROBISPORA								
			sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
GRAM +	17	ACTYNOMYCETES ET ORGANISMES RELIES	MICROELLOBOSPORIA								
			cinerea	+							
			flavea	+							
			grisea	+						i	
			violacea	+							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		MICROMONOSPORA								
			chalcea		l					c	
			sp.			+				y	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		MICROPOLYSPORA								
			faeni					+t			
			(Thermopolyspora polyspora)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

GRAM +	17	ACTYNOMYCETES ET ORGANISMES RELIES	MYCOBACTERIUM (et autres mycobactéries)									
			fortuitum							+		
			phlei							+		
			sp.								a	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		NOCARDIA									
			corellina							+		
			restricta							+		
			(cholesterolicum							+		
			sp. (sp.				+(lig nine					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			OERSKOVIA									
			sp.		ml						*di* y	
			(xanthineolytica)									
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			OOSPORA									
			(Nocardia ?)									
			sp.									
			(lactis)							+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PROPIONIBACTERIUM									
			acnes								h	
			avidum					+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			STREPTOMYCES									
			achromogenus	*gi*								
			albogriseolus				+					
			albus	*gi*				+(p)				
			antibioticus								c	
			aureofaciens	*α*								
			aureus							+		
			badius				+					
			cellulosae		*β*							
			chibaensis								i	

Version preprint

	Groupe du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
GRAM +		ACTYNOMYCETES ET ORGANISMES RELIES	echinatus	gi							
			exfoliatus		x	+	+			i	
			flavogriseus				+				
			fradiae			+		+(ek)			
			griseochromogenes					+(p)			
			griseus					+t(p)		c	
			kurssanovii (Actinomyces kurssanovii)							c	
			lavendulae						+		
			olivaceus	gi							
			parvus						+		
			rimosus					+(p)			
			rubescens					+(p)			
			rubiginosus	gi							
			scabies								+
			(chimensis					+(p)			
			(faecalis					+(p)			
			(flacovirens	gi			+				
			sp. (hemolyticum					+			
			(hyalurolyticus							h	
			(moderatus					+t			
			(oryzae sativa					+(p)			
			(rectus (var. proteolyticus)					+t			
			(sp.	pβ	+						
			(wedmorensis	gi							
			violaceus niger	gi							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

GRAM +	17	ACTYNOMYCETES ET ORGANISMES RELIES	STREPTOSPORANGIUM sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		STREPTOVERTICILLIUM hachijoensis (Streptomyces hachijoensis)					+(p)			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		THERMOACTINOMYCES cellulosae				+				
			sp.				+				
			vulgaris	α							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	17		THERMONOSPORA curvata	α			+				
			(sp.				+				
			sp. (vulgaris	α							
			viridis	α							
GRAM +	8	BATONNETS	AEROMONAS hydrophila		m				+		
			(subsp. proteolytica)					+			
			sp.		m	+				c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7		AZOTOBACTER chroococcum							l	
			sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		BENECKEA neptuna							c	
			sp.							c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7		CELLVIBRIO fulvus				+				
			sp.				+				
			(gilvus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		CITROBACTER intermedius	p							
			(Escherichia intermedia)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

	Groupe du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
GRAM +	8	BATONNETS	ENTEROBACTER								
			aerogenes	p							
			cloacae			+					
			sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		ERWINIA								
			carotovora (aroideae)			+	+				
			chrysanthemi			+	+				
			rubrifaciens			+					
			salicis			+	+				
			herbicola (var. ananas)			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		ESCHERICHIA								
			coli							a	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		FLAVOBACTERIUM								
			dormitator (var. glucanolyticae)		+(β)						
			sp.	αp		+	+	+		c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		HAFNIA								
			alvei				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7		HALOBACTERIUM								
			halobium	α							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		KLEBSIELLA								
			pneumoniae (aerogenes)	pc*							

Version preprint

			ozaenae	p							
			sp.	α							
			* proche de celle de Bacillus macerans								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		PASTEURELLA								
			multocida							h	
			sp.	+							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		PROTEUS								
			mirabilis					+	+	c	
			rettgeri							c	
			vulgaris					+	+	c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7		PSEUDOMONAS								
			acidovorans						+	a	
			aeruginosa					+(e,p)	+	a	
			cepacia			+			+		
			chlororaphis						+		
		BATONNETS	fluo-(schuylkilliensis					+(p)	+		
GRAM +			rescens(sp.			+	+	+	+	a	
			maltophila				+				
			myxogenes					+(p)			
			pseudomallei	+				+			
			saccharophila	αp					+		
			(amyloderamosa	p							
			sp. (sp.	β						l lh	
			stutzeri	p							
				.. ..							
	7		RHIZOBIUM								
			sp.		+	+					
			trifolii			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ...
	8		SERRATIA								
			marcescens					+t(p)	+	c	
			sp.	p							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

	Groupe du manuel de Bergey			Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
GRAM +	7	BATONNETS	THERMUS								
			aquaticus					+t			
			sp.					+t			
			(caldophilus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ...	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		VIBRIO								
			parahaemolyticus					+			
			sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7		XANTHOMONAS								
			campestris		m	+					
			(var. mannihotis)			+					
			(var. oryzae)			+					
			sp.				+(li nine)				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		YERSINIA								
			sp.			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	8		ZYMOMONAS								
			sp.							c	
	9	ANAEROBIES	BACTEROIDES								
			amylophilus	α							
			fragilis								
			(subsp. thetaiotaomicron)		a						
			ruminicola		lxpgg	+				li	
			sp.				+				
			succinogenes		lxpgg	+				li	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

GRAM NEGATIVE	9	ANAEROBIES	BUTYRIVIBRIO fibrisolvens		lxpβg	+	+			i	
	9		LACHNOSPIRA multiparus	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	9		SUCCINOMONAS amylolytica	.. .. +	.. ..	+	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
	7	COCCI	ALCALIGENES (lyticus sp. (sp.					+			
	10		ACINETOBACTER sp.	.. .. α	.. ..	+ .. .. +	.. ..	.. ..	.. ..	c .. .. 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 : 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 : inulinase (i), levan-hydrolase *(lh)*, dextranase (d), chitinase/lysozyme (c), allantoinase (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.

Version preprint

Les symboles sont explicités p. 81 et 103

TABLEAU III - *Activités enzymatiques dépolymérisantes de quelques champignons*

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
MYXOMYCOTA	ACRASID-MYCETES		DYCTYOSTELIUM								
			discoideum					+			
			mucoroides					+			
			purpureum					+			
	MYXO-MYCETES		PHYSARUM								
			cupripes					+			
			(flavicomum)								
			polycephalum				+	+(P)			
EUMYCOTA	MASTIGOMYCOTINA	CHYTRIDID-MYCETES	BLASTOCLADIELLA								
			emersonii					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CHYTRIOMYCES								
			hyalinus							c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
		OOMYCETES	PHYTOPHTORA								
			cactorum	+					+		
			cryptogea				+				
			infestans					+			
			palmivora			+	+				
			parasitica			+	+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA			PYTHIUM								
			sp.				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SAPROLEGNIA								
			monoica		β						
			sp.		+						
	ZYGOMYCOTINA	ZYGOMYCETES	BASIDIOBOLUS								
			ranarum					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			BLAKESLEA								
			(Choanephora) trispora					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CONIDIOBOLUS								
			brefeldianus					+		c	
			lamprauges							c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			ENTOMOPHTHORA								
			sp.					+		c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MUCOR								
			- Flavus								
			flavus						+		
			- Genevensis								
			miehei	α				+(p)	+		
			- Hiemalis								
			hiemalis					+(p)	+		
			- Mucedo								
			mucedo					+(p)			
			sp.			+t					
			spurecenes					+(p)			
			- Racemosus								
			circinelloides						+		
			indicus								

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	ZYGOMICOTINA	ZYGOMYCETES	(rouxianus, rouxii)	a				+(p)			
			javanicus						+		
			praini					+(p)	+		
			(mandshuricus)								
			racemosus				+				
			(christianensis)								
			- Sphaerosporus								
			pusillus	α			+	+(p)	+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			NEOZITES								
			floridanum							c	
			(Triplosporium floridanum)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PHYCOMYCES								
			blakesleeanus					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			RHIZOPUS								
			arrhizus	a	l	+		+(p)			
			(nodosus, achlamydosporus, salebrosus, pseudokiniensis, chinensis)								
			delemar	αa				+(p)	+		
			(chungkuonensis, chiunang)								
			javanicus	αa							
			microsporus						+		
			nigricans			+		+(p)			
			(stolonifer)								
			niveus	a				+(p)			
			oligosporus					+(p)	+	i	
			(pseudochinensis, peka I, peka II)								

Version preprint

EUMYCOTA	ZYGOMYCOTINA	ZYGOMYCETES	oryzae (formosaensis, usamii, batatas, japonicus)	αa				+(p)			
			sp.			+t					
			thermosus					+(p)			
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			THAMNIDIUM sp. (elegans)					+			
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			ZYGORHYNCHUS moelleri				+				
		LOCULOAS-COMYCETES	DOTHIDEA ribesia			+					
	ASCOMYCOTINA	PLECTOMYCETES	ANIXIOPSIS fulvescens (reticulispora)					+(k)			
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			ACREMONIUM (Cephalosporium) charticola	a							
			sp.			+					
			strictum (acremonium)					+(k)		lc	
			zonatum (eichorniae)	a							
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MONASCUS anka					+			
			NANNIZIA fulvia					+(e,p)			
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	ASCOMYCOTINA	PLECTOMYCETES	TALAROMYCES								
			sp. (byssochlamydoides		$+_t$						
			(sp.				$+_t$				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			THERMOASCUS								
			auriantiacus				+				
		LABOUL-BENIOMY-CETES	APHANOMYCES								
			astaci					+		c	
		PYRENOMYCETES	ANIXIELLA								
			sp.							d	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CERATOCYSTIS								
			(Ophiostoma ulmi)								
			ulmi			+	+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CHAETOMIUM								
			brasilliense					+(p)			
			cellutolyticum$_t$				+				
			globosum				+				
			gracile							d	
			sp.		+						
			sp. (geniculata)				+				
			spirale							d	
			thermophilum				+				
			(var. dissitum)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CLAVICEPS								
			purpurea		+						
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA	ASCOMYCOTINA	PYRENOMYCETES	CLETHRIDIUM corticola			+	+				
			ENDOTHIA parasitica	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GIBERELLA fujikuroi	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	+(p)	.. ..	.. ..	.. ..
			sp. (persicana)			+				d	
			GLOMERELLA cingulata	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			sp.			+				d	
			HYPOMYCES solani	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			HYPOXYLON sp.	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			NECTRIA galligena	.. ..	.. ..	.. ..	+	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			NEUROSPORA crassa	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	+	.. ..	.. ..	.. ..
			sitophila	α a a				+			
			PODOSPORA anserina	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			THEILAVIA thermophila$_t$	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	+	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

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

Version preprint

EUMYCOTA	BASIDIOMYCOTINA	GASTEROMYCETES	LENTINUS							
			edodes				+			
			squamosus		β					
			(lepideus)	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PAXILLUS							
			sp.				+			
			(lamellirugus)	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PLEUROTUS							
			ostreatus				+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SCHIZOPHYLLUM							
			commune				+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TERMITOMYCES							
			clypeatus		x					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRICHOLOMA							
			columbetta					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			VOLVARIELLA							
			volvacea				+			
		HYMENOMYCETES	CONIOPHORA							
			cerebella	α a			+			
			puteana				+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CORIOLUS							
			versicolor				+(lig nine)			
			(Polyporus versicolor)							
			sp.					+(p)		
			(consors)							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CORTICIACEAE				+			
			(lignine)							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	BASIDIOMYCOTINA	HYMENOMYCETES	DAEDALEOPSIS								
			nipponica					+			
			sp.					+			
			(styracus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			DICHOMITUS								
			squalens		+	+	+	+			
			(Polyporus anceps)								
			(Trametes polyporus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			FOMES								
			annosus				+				
			(Ungulina annosa)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			FOMITOPSIS								
			pinicola					+(p)			
			sp.					+			
			(castanea)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GLOEOPORUS								
			sp.				+				
			(adustus)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GYROPHANA								
			lacrymans				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			HYDNACEAE				+				
			(lignine)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			IRPEX								
			lacteus		+	+	+	+(p)			
			sp.					+(p)			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

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

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	BASIDIOMYCOTINA	HYMENOMYCETES	PYCNOPORUS								
			coccineus					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			STEREUM								
			sanguinolentum				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TANATEPHORUS								
			filamentosus							y	
			forme sasaki (Pellicularia sasaki)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			THELEPHORACEAE (lignine)				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRAMETES								
			hirsuta	a	x						
			quercina				+				
			suaveolens				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TYROMYCES								
			sp. (palustris)		x		+				
	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	ALTERNARIA								
			alternata (mali)			+					
			macrospora			+	+				
			sp.		x						
			tenuis		+	+					
			tenuissima		β			+			

Version preprint

EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	ASPERGILLUS							
			- Candidus							
			candidus					+(p)		
			- Clavatus							
			clavatus				+			
			- Flavus							
			flavus		1			+(k,f)		
			macrosporus					+ (p)	+	
			microsporus					+ (p)	+	
			oryzae	α pa						
			parasiticus			+		+ (p)		
			(sojae)							
			- Fumigatus							
			fumigatus				+			
			- Nidulans							
			nidulans					+		
			- Niger							
			aculeatus				+			
			awamori	α a		+	+	+		
			carbonarius			+				
			(fonsacaeus)							
			ficuum	α				+(f)		ip
			(batatae)							
			foetidus	α a				+		i
			(aureus)							
			japonicus			+				
			niger	α pa	β x	+	+		+	ci
			phoenicis	a						
			saitoi	α	m			+		
			usamii	a				+		
			(diastaticus	a				+		
			- sp.(lichtheimi					+(p)		
			(makazawai					+		
			(ochraceus					+(p)		
			- Terreus							
			terreus		+(ar)		+			

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	-Versicolor								
			sydowi				+				
			versicolor		β						
			-Wentii								
			terricola	α				+(p)			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			AUREOBASIDIUM								
			pullulans		+	+					
			(Pullularia pullulans)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			BEAUVERIA								
			bassiana					+		c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			BOTRYOTRICHUM								
			sp.				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			BOTRYTIS								
			allii			+	+				
			cinerea		+	+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CERCOSPORA								
			arachidicola			+	+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CERCOSPORELLA								
			herpotrichoides		x						
			sp.			+	+				
			(beticola)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CHRYSOSPORIUM								
			pruinosum$_t$				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	CLADOSPORIUM							
			cladiosporioides		+		+			
			herbarum			+				
			sp.			+		+	+	c
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			COLLETOTRICHUM							
			atramentarium				+(p)			
			capsici				+			
			dematium			+	+			
			gloeosporoides			+				+
			lagenarium			+	+	+		
			lindemuthianum					+(p)		
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CORYNESPORA							
			casiicola			+				
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CURVULARIA							
			geniculata				+			
			lunata				+			
			sp.		+					
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			EPICOCCUM							
			nigrum		+					
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			EPIDERMOPHYTON							
			sp.					+(k)		
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			FUSARIUM							
			avenaceum		x		+			
			culmorum				+			+
			moniliforme				+		a	
			oxysporum		+	+	+	+		
			roseum			+	+		i	+
			sacchari		+					
			(Cephalosporium sacchari)							
			solani				+(lig nine)			+

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	sp.	α				+			
			tricinctum			+	+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GEOTRICHUM candidum			+	+		+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GILMANIELLA humicola				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GLIOCLADIUM roseum				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			HELMINTHOSPORIUM sativum								+
			sp.	+		+		+	+		
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			HIRSUTELLA thompsonii							c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			HUMICOLA insolens				+				
			grisea (var thermoidea)				+				
			lanuginosa	a							
			sp. (sp. (lutea					+		d	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MALBRANCHEA pulchella$_t$				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			METARRHIZIUM anisopliae					+		c	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	MICROSPORUM								
			sp.				+(k)				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MONILIA								
			fructigena			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MYROTHECIUM								
			verrucaria		xgm l		+			li	
			sp.		+						
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			OIDIODENDRON								
			kalrai					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PAECILOMYCES								
			farinosus					+		c	
			lilacinum							d	
			(Penicillium lilacinum)								
			sp.							c	
			(eriophytis)								
			varioti					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PAPULASPORA								
			thermophila$_t$	+			+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PENICILLIUM								
			camembertii					+(p)			
			candidum						+		
			caseicolum					+			
			chrysogenum						+		
			corylophilium				+				
			digitatum			+					
			expansum	α		+					
			funiculosum						+	d	
			italicum		β	+					

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	jenthinellum				+	+			
			notatum		+		+				
			oxalicum	a							
			purpurogenum							y	
			pusillum				+				
			sp.							i	
			roquefortii					+	+		
			verruculosum							d	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PHYMATROTRICHUM								
			omnivorum				+				
			sp. (fumicola				+				
			(fungicola				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PYRICULARIA								
			oryzae	a			+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			RHIZOCTONIA								
			fragariae			+					
			sp.							y	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SCYTALIDIUM								
			lignicola					+			
			thermophilum	a							
			(Torula thermophila)								
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SCLEROTIUM								
			oryzae					+(p)			
			rolfsii			+					
			sativa					+(p)			
			sp.				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	SPOROTRICHUM								
			dimorphosporum		+			+			
			pulverulentum				+				
			(Phanerochaete chrysosporium ?)				+				
			(apinis				+				
			sp. (asteroides							d	
			thermophile				+t				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			STACHYBOTRYS								
			atra		'		+				
			sp.		+						
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			THERMOMYCES								
			stellatus				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRICHODERMA								
			hamatum				+				
			harzianum					+	+	cy	
			koningii			+	+				
			longibrachiatum		x	+	+				
			pseudo koningii		x						
			(lignorum			+					
			sp. (sp.							d*	
			reesei		+	+	+	+			
			viride	a	+	+	+				
			TRICHOPHYTON								
			sp.					+(ekc)			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRICHOTHECIUM								
			roseum				+	+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRICHURUS								
			spiralis				+(lig nine)				
				.. ..	.. ..	.. ..		.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

				Amylases	Hemicellu-lases	Pectinases	Cellulases	Protéases	Lipases	Divers	Cutinases subérases
EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	TRITIRACHIUM album					+			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			ULOCLADIUM consortiale (Stemphylium consortiale)		+		+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			VERTICILLIUM alboatrum			+					
			dahliae			+					
		COELOMYCETES	ASCOCHYTA sp. (visa (vicae					+ +(p)			
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			BOTRYODIPLODIA theobromae				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CONIOTHYRIUM sp. (diplodiella)			+					
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			GLOEOSPORIUM sp.							d	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			MACROPHOMINA phaseoli (Rhizoctonia lamellifera)				+				
			phaseolina				+				
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

EUMYCOTA	DEUTEROMYCOTINA	COELOMYCETES	PESTALOTIA							
			westerdijkiae			+				
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			PHOMA							
			herbarum		+	+	+			
			(hibernica)							
			medicaginis		g	+	+		+	
			(f.sp. pinodella)							
			sp.				+			
	ASCOMYCOTINA	HEMIASCOMYCETES (Levures et champignons reliés)	BRETTANOMYCES							
			lambicus						+	
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CANDIDA							
			albicans		+			+		
			kefyr							i
			lipolytica					+	+	p
			rugosa						+	
			salmanticensis							i
			(candidum						+	
			sp. (cylindracea						+	
			tropicalis							p
			utilis		β					a
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			CRYPTOCOCCUS							
			albidus					+(p)		
			(var. aerius)							
			sp.			+				
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			DEBARYOMYCES							
			cantarellii							i
			phaffii							i
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			ENDOMYCES							
			sp.	a						
			.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..

Version preprint

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

Version preprint

EUMYCOTA	ASCOMYCOTINA	HEMIASCOMYCETES	cerevisiae		β			+		ac	
			chevalieri							i	
			(diastaticus	g				+			
			sp. (sp.	pa							
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SCHIZZOSACCHAROMYCES								
			pombe		β						
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			SCHWANNIOMYCES								
			alluvius	pa						i	
			castellii	pa						i	
				.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..	.. ..
			TRICHOSPORON								
			penicillatum			+					
			(heteromorphon						+		
			sp. (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 : inulinase (i), levan-hydrolase *(lh)*, dextranase (d), chitinase/lysozyme (c), allantoinase (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 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 CO_2), 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.

Version preprint

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 (*Km*, *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-ribosomaux" (modifications post-traductionnelles). Les réticulations et

Version preprint

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 mutienzymatique lié par une partie glysosidique 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'efficience protéique devient alors supérieur à celui de la caséine), pour l'augmentation (ou la diminution) de la solubilité des protéines dénaturées de soje (per 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 cryptetes) ou de l'enzymologie (cas des cyclodextrines) présentent une ectivité catalytique ; deux types sont, à notre connaissance, actuellement étudiés :

- les cryptates synthétiques, actuellement principalement utilisés pour des chélations très spécifiques ;

- les cyclodextrines de *Schardinger*, principalement utilisées pour la microencapsulation de pesticides ou perfums 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 pouvent 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.

Version preprint

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 traitrise.* 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.

Version prenrint

[5] *Biotechnology and Bioengineering Symposium* (collection 1959-1982), GADEN E.L. Jr. ed., John Wiley and Sons, New York, Brisban, Toronto, Singapor, 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.

Version preprint