



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Clonage d'un gène d'-amylase chez *Streptococcus faecalis* au moyen de vecteurs autoreplicatifs

HOLS, Pascal

*Award date:*  
1987

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

CLONAGE D' UN GENE D'  $\alpha$ -AMYLASE

CHEZ STREPTOCOCCUS FAECALIS AU MOYEN

DE VECTEURS AUTOREPLICATIFS

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par

Pascal HOLS

1987 ?



Au professeur J. Delcour et au docteur J. Vandenhautte  
qui ont assuré la direction de ce mémoire, et ont su par leur  
patience et leurs conseils judicieux m'aider à mener à bien ce  
travail,

à mesdames M. Dewez, R.M. Wilmet, C. Dernoncourt,  
J. Libion et mademoiselle G. Renauld pour l'aide qu'elles  
m'ont apporté,

ainsi qu'à mes parents et Catherine pour leur compré-  
hension dans les moments difficiles,

je tiens à exprimer toute ma reconnaissance.

## ABREVIATIONS

- ATP : adénosine triphosphate
- Amp<sup>r</sup> : gène de résistance à l'ampicilline (  $\beta$ -lactamase )
- AMY : gène d'  $\alpha$ -amylase ( 2.5 Kb ) de B. licheniformis
- CM : chloramphénicol
- Cml, CM<sup>r</sup> : gène de résistance au chloramphénicol ( chloramphé-  
nicol acétyl transférase )
- ?  $\Delta$  : délétion
- DO : densité optique
- DNA : acide désoxyribonucléique
- DNase : désoxyribonucléase
- EDTA : éthylène diamine tétra acétate
- EM : érythromycine
- EM<sup>r</sup> : gène de résistance à l'érythromycine
- EM<sup>s</sup> : sensibilité à l'érythromycine
- g : accélération gravitationnelle ( 9.81 m/s<sup>2</sup> )
- Kan<sup>r</sup> : gène de résistance à la kanamycine
- mRNA : RNA messenger
- PEG 1000 , PEG 20000 : polyéthylène glycol de poids moléculaire  
1000 , 20000
- po : promoteur, opérateur
- po : promoteur du gène d'  $\alpha$ -amylase
- ppm : parts par million
- REP : séquence du DNA possédant l'origine de répliation du  
plasmide pW01
- RNA : acide ribonucléique
- RNase : ribonucléase
- Rpm : rotations par minute
- rRNA : RNA ribosomique
- S : Svedberg
- SAB : serum d'albumine bovin
- SDS : sodium dodécyl sulfate
- UFC : unité formant une colonie
- UV : ultra-violet

Les autres abréviations sont définies dans le texte.



## Plan

fermentation!

### CHAP. I INTRODUCTION

#### I. L'ensilage

I. 1. Introduction

I. 2. Les principes de l'ensilage

I. 3. Les principaux groupes de microorganismes impliqués dans l'ensilage

I. 3. 1. Les bactéries lactiques

I. 3. 1. 1. Lactobacilli

I. 3. 1. 2. Streptococci

I. 3. 1. 3. Pediococci

I. 3. 1. 4. Leuconostocs

I. 3. 1. 5. La biochimie des bactéries lactiques

I. 3. 1. 5. 1. La fermentation des hydrates de carbone

a) La fermentation homolactique des hexoses

b) La fermentation hétérolactique des hexoses

c) la fermentation des pentoses

I. 3. 1. 5. 2. La fermentation des acides organiques

I. 3. 1. 5. 3. La fermentation des composés azotés

I. 3. 2. Clostridia

I. 3. 2. 1. Les causes du développement des Clostridia dans l'ensilage

I. 3. 2. 2. La biochimie des clostridies

I. 3. 2. 2. 1. La fermentation des sucres et de l'acide lactique

I. 3. 2. 2. 2. La fermentation des composés azotés

I. 3. 3. Bacilli

I. 3. 4. Les bactéries coliformes

I. 3. 5. Les levures

- I. 4. L'évolution de la biocénose bactérienne
  - I. 4. 1. La microflore épiphytique des fourrages
  - I. 4. 2. L'influence des traitements précédant la récolte
  - I. 4. 3. Les différentes phases du processus d'ensilage
    - I. 4. 3. 1. La première phase : la respiration
    - I. 4. 3. 2. La seconde phase : la phase d'acidification
    - I. 4. 3. 3. La phase de fermentation des nuisibles
- I. 5. Les additifs d'ensilage et le contrôle de la fermentation
  - I. 5. 1. Considérations générales
  - I. 5. 2. Les conservateurs chimiques
    - I. 5. 2. 1. Les acides
      - a) Les acides inorganiques
      - b) Les acides organiques
    - I. 5. 2. 2. Les produits bactériostatiques
  - I. 5. 3. Les conservateurs biologiques
    - I. 5. 3. 1. Les bactéries lactiques
    - I. 5. 3. 2. Le support énergétique et les enzymes
  - I. 5. 4. Organisation de la recherche

## II. Les amylases

- II. 1. Le substrat
- II. 2. Les différents types d'amylases
  - II. 2. 1. Les exoamylases
    - II. 2. 1. 1. Les  $\alpha$ -amylases
    - II. 2. 1. 2. L'amyloglucosidase ou glucoamidase
  - II. 2. 2. Les endoamylases
  - II. 2. 3. Les enzymes débranchants
    - II. 2. 3. 1. La pullulanase
    - II. 2. 3. 2. L'isoamylase
- II. 3. L'  $\alpha$ -amylase de Bacillus licheniformis
  - II. 3. 1. Ses propriétés
  - II. 3. 2. Aspects génétiques
    - II. 3. 2. 1. Carte de restriction et séquence génique
    - II. 3. 2. 2. Clonage du gène chez B. subtilis
    - II. 3. 2. 3. Clonage du gène chez E. coli
    - II. 3. 2. 4. Conclusion



### III. Streptococcus faecalis

- III. 1. Classification
- III. 2. Caractéristiques morphologiques et structurales
- III. 3. Caractéristiques biochimiques
- III. 4. Considérations pratiques

### IV. But du travail

## CHAP. II MATERIELS ET METHODES

### I. Souches

### II. Milieux

#### II. 1. Milieux de culture pour E. coli et B. subtilis

- II. 1. 1. Milieu LB
- II. 1. 2. Milieu 2xTY
- II. 1. 3. Milieu minimum M9/glucose

#### II. 2. Milieux de culture pour Streptococcus faecalis

- II. 2. 1. Milieu THB ( Todd Hewitt Broth )
- II. 2. 2. Milieu THB/succinate de sodium

### III. Plasmides

- III. 1. pVA838
- III. 2. pGKV2
- III. 3. pGK13
- III. 4. pSA33
- III. 5. p $\alpha$ 21

### IV. Les méthodes génétiques

- IV.1. La transformation chez E. coli
  - préparation des cellules compétentes
  - transformation

#### IV.2. La transformation chez S. faecalis

### V. Les méthodes biochimiques

- V. 1. Préparation de DNA plasmidique chez E. coli
- V. 2. Préparation de DNA plasmidique chez S. faecalis et B. subtilis
- V. 3. Extraction au phénol/chloroforme

- V. 4. Réaction de restriction
- V. 5. Réaction de ligation
- V. 6. Electrophorèse sur gel d'agarose
  - détection des bandes de DNA sur gel
  - estimation de la taille des fragments de restriction en fonction de leur mobilité sur gel d'agarose
- V. 7. Détection de l'activité amylase
  - V. 7. 1. Détection par coloration aux vapeurs d'iode
  - V. 7. 2. Dosage de l'activité amylase par le test DNS

### CHAPITRE III RESULTATS

#### I. Transformation chez S. faecalis

- I. 1. Préparation des protoplastes OG1X
  - I. 1. 1. Etablissement de la courbe de croissance en milieu complet THB
  - I. 1. 2. Préparation de cellules glycinées
  - I. 1. 3. Préparation et régénération des protoplastes
    - Résultats
      - Différences entre colonies issues de cellules non protoplastées et de protoplastes
      - Détermination du temps d'action du lysozyme
- I. 2. La transformation de protoplastes avec les plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13
  - I. 2. 1. Mode opératoire
  - I. 2. 2. Résultats obtenus avec les plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13
    - I. 2. 2. 1. Préparation des plasmides
    - I. 2. 2. 2. Transformation chez S. faecalis

#### II. Clonage du gène de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis chez E. coli dans les trois plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13

- II. 1. Stratégie générale de clonage
- II. 2. Application de la stratégie au pVA838, pGKV2 et au pGK13
  - II. 2. 1. Restriction des plasmides
  - II. 2. 2. Ligation
  - II. 2. 3. Transformation et sélection



II. 2. 3. 1. Les plasmides p  $\alpha$ 21 et pVA838

II. 2. 3. 2. Les plasmides p  $\alpha$ 21 et pGKV2

II. 2. 3. 3. Les plasmides p  $\alpha$ 21 et pGK13

III. Transformation chez S. faecalis OG1X avec les plasmides  
pVA $\alpha$  , pGKV2 $\alpha$  , pGK13 $\alpha$  , pSA33

III. 1. pVA $\alpha$  , pGKV2 $\alpha$  , pGK13 $\alpha$

III. 2. pSA33

IV Tests préliminaires de comparaison entre les trois souches  
non recombinantes de S. faecalis OG1X

IV. 1. Comparaison de stabilité plasmidique

IV. 1. 1. Protocole utilisé

IV. 1. 2. Résultats

IV. 2. Tests préliminaires de dosage de l'  $\alpha$ -amylase produite  
par les souches OG1X amylolytiques

Conclusion et perspectives

Bibliographie

C H A P I T R E    I

I N T R O D U C T I O N



## I. L'ensilage

### I. 1. Introduction

L'ensilage et le fanage sont deux techniques traditionnelles de conservation des fourrages, où l'objectif principal est leur préservation au moment optimal de croissance afin de les utiliser pendant les saisons où elles sont inaccessibles. L'ensilage, à l'opposé du fanage, est un processus de fermentation qui permet la conservation des récoltes à l'état frais. Le processus prend place dans une structure appelée silo. Ceux-ci sont de deux types principaux : le silo-couloir ( couloir en béton en forme de U ) et le silo-tour.

La pratique de l'ensilage, déjà nécessaire pour les récoltes ne pouvant subir le fanage ( par exemple le maïs, les feuilles de betteraves ), s'est considérablement développé pendant les vingt dernières années. Les raisons de cet accroissement sont nombreuses. L'ensilage permet une indépendance envers les conditions climatiques. Celles-ci étant souvent défavorables, elles sont la cause de lourdes pertes pendant le processus de séchage . Cette indépendance permet une exploitation fourragère intensive, avec plusieurs récoltes par an. La conservation du fourrage à l'état frais minimise les pertes en valeur nutritive. Enfin, l'ensilage permet un ensemble de facilités techniques pour l'utilisateur. ( Vanbelle et Bertin (1985), pg 1-2 )

La gamme des récoltes pouvant être ensilées est très vaste. Parmi celles-ci, on peut citer : Les graminées, les céréales ( maïs, orge, blé...), les légumineuses ( trèfle, luzerne...), les betteraves, les pommes de terre, les sous-produits industriels ( pulpes de betteraves sucrières, fanes

de pois...), etc... Bien que pour toutes ces récoltes on puisse envisager l'ensilage directement ou après traitement, leur aptitude à l'ensilage est fonction de plusieurs facteurs : la teneur en sucres directement fermentescibles par les microorganismes, le pouvoir tampon et la teneur en matière sèche des végétaux, la répartition de la microflore bactérienne de départ, la structure physique de la matière végétale...

### I. 2. Les principes de l'ensilage

La conservation de la matière végétale dans l'ensilage est réalisée par une fermentation acidifiante qui est à domination lactique où l'acétogenèse doit être limitée, la butyrogenèse et l'amoniogenèse inhibés. La vitesse de l'acidification lactique est déterminante. ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 15 )

Les récoltes à l'état frais ( contenu hydrique important ) s'avarièrent dans des conditions aérobies. La colonisation par une microflore hétérogène aérobie est responsable d'une dégradation approfondie des différents composants de la matière végétale. Donc, une des premières priorités dans la réalisation de l'ensilage est le stockage anaérobique des produits de récolte, soit dans un conteneur hermétique ( silo tour ), soit par recouvrement d'une bâche de plastique ( silo couloir ). Les conditions anaérobies doivent être maintenues pendant toute la durée du processus, aucune circulation d'air n'est permise, au risque de voir se développer une activité microbiologique aérobie. Normalement, si les conditions anaérobies sont respectées, une fermentation acide se développe dans laquelle les bactéries produisent un mélange d'acides organiques à partir des sucres présents.

A ce stade, une dualité primordiale s'installe dans la dominance de la microflore bactérienne. Deux catégories



d'organismes, les clostridies et les bactéries lactiques, toutes deux susceptibles de coloniser la matière végétale, vont déterminer la qualité du produit fermenté et donc la réussite ou l'échec du processus.

Si la biocénose microbienne est dominée par les bactéries lactiques, les sucres fermentescibles sont transformés en acide lactique de manière prépondérante, en acide acétique et butyrique dans des proportions faibles. Le pH final sera très bas ( environ 4 ). Dans ces conditions, on parle d'un ensilage de bonne qualité.

Dans le cas contraire, si la biocénose est dominée par les clostridies, les sucres fermentés et l'acide lactique sont transformés principalement en acide butyrique. De plus, ces microorganismes sont dotés d'une activité protéolytique intense et dégradent les acides aminés en un ensemble de produits secondaires à faible valeur nutritive. La proportion importante d'acide butyrique est responsable d'un pH supérieur à celui obtenu dans les conditions précédentes. La perte de valeur nutritive est importante. Ces facteurs caractérisent un ensilage de mauvaise qualité.

Il apparaît clairement qu'un ensilage de bonne qualité sera caractérisé par le développement prépondérant des bactéries lactiques. Depuis de nombreuses années, différents moyens sont utilisés afin de promouvoir le développement des bactéries lactiques ou d'empêcher la prolifération des clostridies au sein du silo. Mais une action efficace ne peut se faire que par une compréhension de la biocénose microbienne et des principales réactions biochimiques de ces microorganismes impliqués dans l'ensilage.

---

A. Homofermentative

Rod

*Lactobacillus casei*  
*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*  
*Lactobacillus curvatus*  
*Lactobacillus plantarum*

Coccus

*Pediococcus acidilactici*  
*Pediococcus cerevisiae*  
*Pediococcus pentosaceus*  
*Streptococcus faecalis*  
*Streptococcus faecium*

B. Heterofermentative

Rod

*Lactobacillus brevis*  
*Lactobacillus buchneri*  
*Lactobacillus fermentum*  
*Lactobacillus viridescens*

Coccus

*Leuconostoc cremoris*  
*Leuconostoc dextranicum*  
*Leuconostoc mesenteroides*

---

Tableau I Classification des bactéries lactiques  
importantes dans l'ensilage  
( d'après Mc Donald (1981) pg 62 )



### I. 3. Les principaux groupes de microorganismes impliqués dans l'ensilage

#### I. 3. 1. Les bactéries lactiques

Celles-ci constituent le groupe le plus important dans l'ensilage. Elles sont anaérobies micro-aérophiles, gram + , non sporulantes et fermentent les sucres en acide lactique. Elles sont divisées en deux groupes. Les bactéries lactiques homofermentatives qui fermentent les hexoses essentiellement en acide lactique et les bactéries lactiques hétérofermentatives qui fermentent les hexoses en acide lactique et en d'autres composés tels l'éthanol et l'acide acétique. Une subdivision ultérieure est basée sur la forme ( coque ou bâtonnet ), le mode de division cellulaire.

Quatre genres sont associés avec l'ensilage : Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc et Pediococcus. Les principales espèces de chaque genre qui sont impliquées dans l'ensilage sont rassemblées dans le tableau I. ( Mc Donald (1981) pg 62 ).

##### 1. 3. 1.1. Lactobacilli

Ce genre est constitué d'homofermentatives et d'hétérofermentatives avec une forme cellulaire de type bâtonnet. Ils fermentent de nombreux hydrates de carbone. Les types d'hydrates de carbone et la facilité avec laquelle ils sont métabolisés sont utilisés dans leur classification. L'acide lactique produit peut se présenter sous différentes formes isomériques. La principale forme produite est la forme DL (-) (L. curvatus, L. plantarum, L. brevis, L. buchneri, L. fermentum, et L. viridescens ), bien que certaines espèces ne produisent qu'un seul des deux isomères, soit D (-) ( L. casei ), soit L (+) ( L. coryniformis subsp coryniformis ). Les lactobacilles ont des exigences nutritives très importantes, variables en

fonction des espèces. Les composés essentiels incluent les acides aminés, les dérivés d'acides nucléiques, certains peptides, des vitamines, des sels, des acides gras,...

Il est important de constater que les lactobacilles ne possèdent pas d'activité protéolytique, et si elle a lieu, elle est généralement très faible. La température optimale de croissance se situe aux environs de 30° C et en ce qui concerne leur acidotolérance, elle s'étend de pH 4.0 à 6.8 avec un optimum à pH 6.0. Certaines souches sont capables de croissance à des pH atteignant 3.5. ( Mc Donald (1981) pg 63-64 )

#### I. 3. 1. 2. Streptococci

On trouve essentiellement deux espèces appartenant à ce genre dans l'ensilage, S. faecalis, l'espèce la plus fréquente dans les fèces humains et S. faecium dans les fèces des animaux. Le métabolisme des sucres se fait suivant la voie homofermentative avec production de l'isomère L (+) ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 48 ). Ces deux espèces sont auxotrophes pour de nombreux acides aminés ( 7 à 14 ) et des vitamines du groupe B ( 5 à 6 ). Elles sont responsables d'une faible amoniogénèse au sein de l'ensilage. Ces deux espèces croissent à des températures allant de 10° C à 45° C ( Mc Donald (1981) pg 64 ). ( Plus de détails seront donnés dans le paragraphe III.3.)

#### I.3.1.3. Pediococci

Ils sont très proches des streptocoques dans beaucoup de domaines et ne peuvent être complètement différenciés de ceux-ci que par leur mode de division. Les pédiocoques forment des paires et des tétrades alors que les streptocoques forment des chaînes. Ils nécessitent des apports externes en presque tous les acides aminés et pour de nombreuses vitamines du groupe B. Les trois espèces couramment rencontrées dans l'



ensilage sont homofermentatives, l'acide lactique produit est soit D (-), soit sous la forme L (+).

Les optima de température pour P. acidilactici, P. cerevisiae et P. pentosaceus sont respectivement de 40° C, 25° C et 30° C. Les pédiocoques sont connus pour croître à des pH très bas ; ainsi, P. cerevisiae croît à des pH aussi bas que 3.5 avec un optimum supposé vers 5.5. ( Mc Donald (1981) pg 64 )

#### I. 3. 1. 4. Leuconostocs

Les trois espèces couramment impliquées dans l'ensilage sont hétérofermentatives et produisent l'isomère D (-).

L. cremoris fermente très peu de sucres différents, le glucose est sa principale source d'énergie. Les demandes en acides aminés pour cette espèce sont complexes. Sa croissance est permise entre 10° C et 30° C avec un optimum compris entre 10 et 25° C.

L. dextranicum est nutritionnellement moins exigeant que L. cremoris et ne requiert que quelques acides aminés pour sa croissance. Celle-ci est permise entre 10 et 37° C avec un optimum compris entre 20 et 30° C.

L. mesenteroïdes fermente un plus grand nombre d'hydrates de carbone que les deux précédentes espèces et n'a des exigences que pour deux acides aminés ( la valine et le glutamate ). L'optimum de température se situe entre 20 et 30° C. Certaines souches montrent parfois une préférence marquée pour des conditions aérobies ( Mc Donald (1981) pg 64-65 )

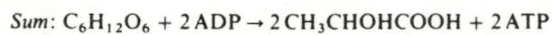
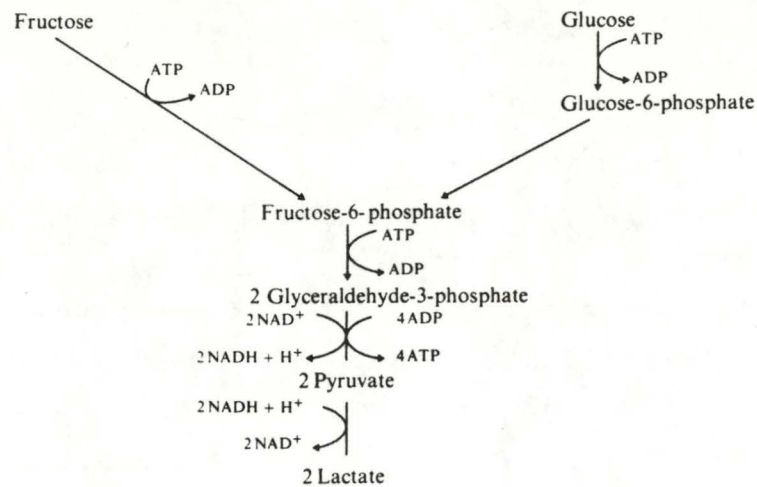


Fig 1 fermentation du glucose et du fructose par les bactéries lactiques homofermentatives ( d'après Mc Donald (1981) pg 68 )

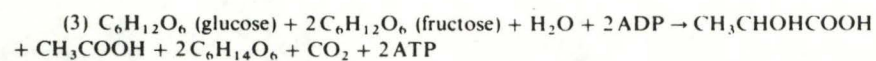
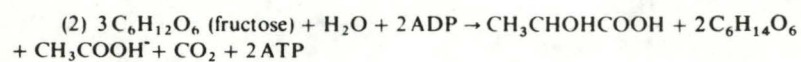
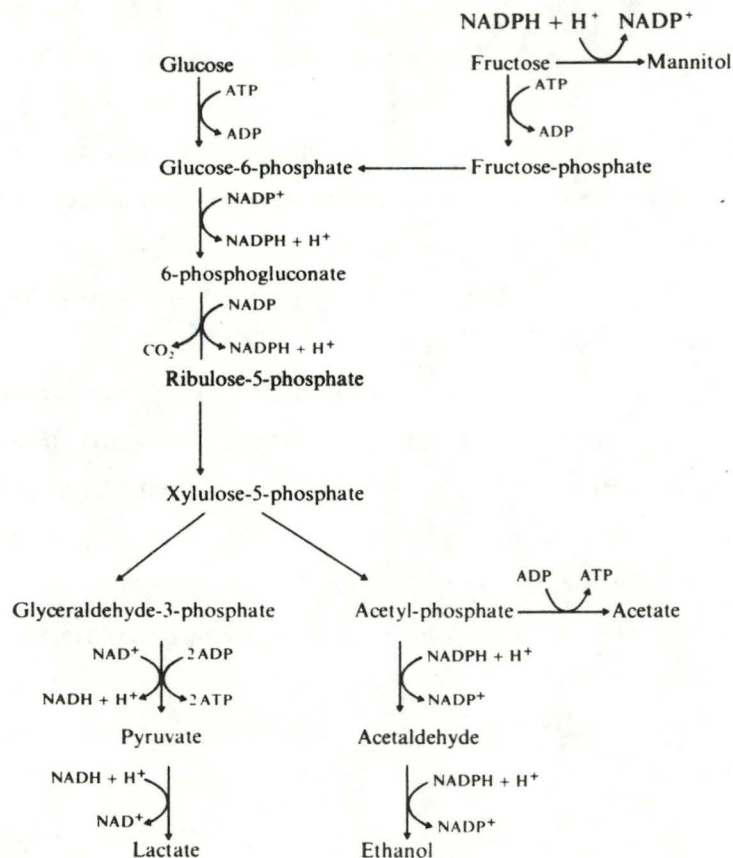


Fig 2 fermentation du glucose et du fructose par les bactéries lactiques hétérofermentatives ( d'après Mc Donald (1981) pg 70 )



I. 3. 1. 5. La biochimie des bactéries lactiques

I. 3. 1. 5. 1. La fermentation des hydrates de carbone

a) La fermentation homolactique des hexoses ( fig 1 )

La voie métabolique suivie pour la fermentation du glucose et du fructose en pyruvate est la glycolyse de Embden-Meyerhof-Parnas. Dans les conditions anaérobies, les deux moles de pyruvate formées à partir d'une mole de glucose ou de fructose sont transformées en deux moles de lactate.

b) La fermentation hétérolactique des hexoses ( fig 2 )

Le type d'hexose utilisé, fructose ou glucose, conditionne les voies métaboliques secondaires et donc les produits formés. Le rapport entre les différents hexoses de la matière végétale va dicter les proportions relatives des produits de fermentation.

La voie commune à la fermentation du glucose et du fructose est celle qui passe par le pentose phosphate vers la glycéraldéhyde-3-phosphate et l'acétyl-phosphate ( cfr fig 2 ). Le glycéraldéhyde est oxydé et ensuite réduit en lactate, comme pour la voie homolactique.

Dans la fermentation du glucose, l'acétyl-phosphate joue le rôle d'accepteur d'hydrogène et est réduit en éthanol. Une mole de glucose est asymétriquement rompue en une mole d'éthanol, une mole de lactate et une mole de CO<sub>2</sub>. ( cfr réaction (1) fig 2 ).

Si le fructose est fermenté, il peut servir d'accepteur d'hydrogène et être réduit en mannitol. Dans ce cas, trois moles de fructose sont transformées en une mole de lactate, une mole d'acétate, une mole d'éthanol, une mole de CO<sub>2</sub> et deux moles de mannitol. ( cfr réaction (2) fig 2 ) ( Mc Donald (1981) pg 70, Woolford (1984) pg 98 )

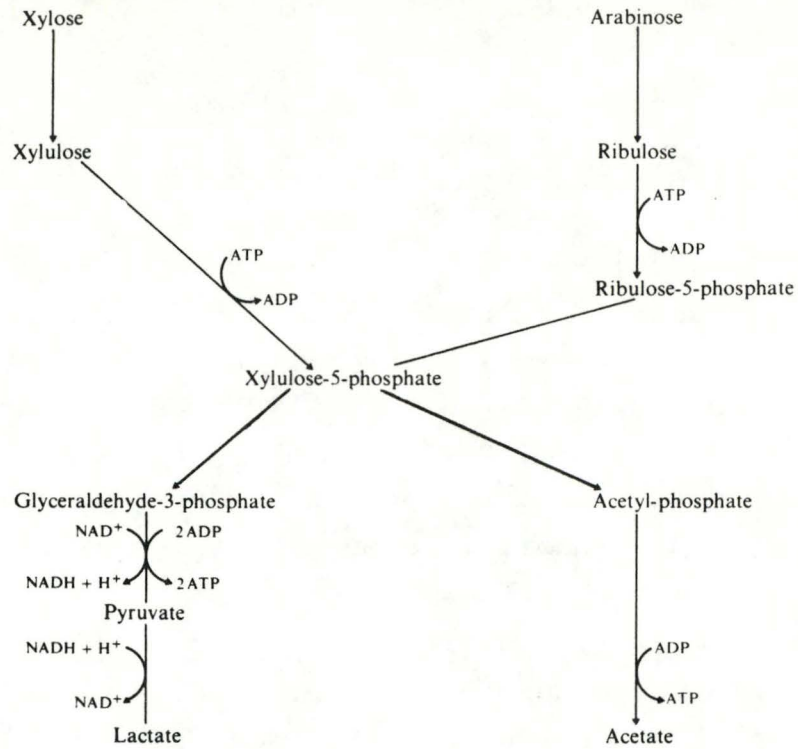
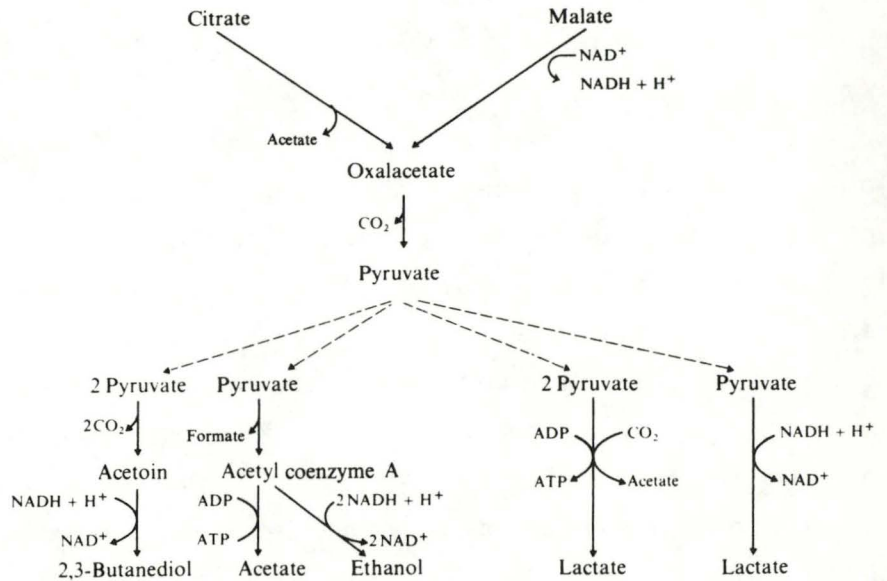


Fig 3 fermentation des pentoses par les bactéries lactiques hétérofermentatives et homofermentatives ( d'après Mc Donald (1981) pg 69 )



- Sum: (1)  $C_6H_8O_7 + H_2O + ADP \rightarrow 2CH_3COOH + HCOOH + CO_2 + ATP$   
 (2)  $2C_6H_8O_7 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_3COCHOHCH_3 + 4CO_2$   
 (3)  $2C_6H_8O_7 + H_2O + ADP \rightarrow 3CH_3COOH + CH_3CHOHCOOH + 3CO_2 + ATP$   
 (4)  $C_6H_8O_7 + 4H \rightarrow CH_3COOH + C_2H_5OH + HCOOH + CO_2$   
 (5)  $C_4H_6O_5 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CO_2$   
 (6)  $2C_4H_6O_5 \rightarrow CH_3COCHOHCH_3 + 4CO_2 + 4H$   
 (7)  $C_4H_6O_5 + H_2O + ADP \rightarrow CH_3COOH + HCOOH + CO_2 + 2H + ATP$   
 (8)  $C_4H_6O_5 + 2H \rightarrow C_2H_5OH + HCOOH + CO_2$

fig 4 fermentation du citrate et du malate par les bactéries hétérofermentatives et homofermentatives ( d'après Mc Donald (1981) pg 72 )



c) La fermentation des pentoses ( fig 3 )

Cette fermentation est commune aux homofermentatives et aux hétérofermentatives. Les pentoses, principalement le xylose et l'arabinose peuvent devenir des substrats accessibles au métabolisme bactérien, si ceux-ci sont libérés des hémicelluloses végétales par l'action d'enzymes végétales. La fermentation d'une môle de pentose produit une môle de lactate et une môle d'acétate. En termes d'acidification, cette voie comme la voie hétérofermentative est moins efficace que la voie homofermentative ( l'acétate est un acide moins fort que le lactate ). Mais la perte de matière sèche sous forme de  $\text{CO}_2$  dans la fermentation des pentoses est évitée ( Mc Donald (1981) pg 69, Woolford (1984) pg 102 ).

I. 3. 1. 5. 2. La fermentation des acides organiques

Les acides organiques quantitativement les plus importants dans les fourrages ensilés sont le malate et le citrate. Ces deux acides sont connus pour être rapidement métabolisés dans l'ensilage ( Mc Donald (1981) pg 71 ). Cette fermentation ne semble être due qu'aux bactéries lactiques ( Woolford (1985) pg 106 ). Les deux acides sont transformés en des produits incluant le lactate, le formate, l'éthanol, le 2-3 butanediol et l'acétoïne ( cfr fig 4 ).

Les rapports quantitatifs entre ces différents composés semble dépendre du pH régnant au moment de leur production. Ainsi, il a été démontré pour les homofermentatives qu'à pH faible, le lactate était le produit prédominant. Lorsque le pH augmente, une plus grande proportion de formate et d'acétate était formée, et à pH 7, le lactate n'est plus du tout formé ( Woolford (1984) pg 106 ).

I. 3. 1. 5. 3. La fermentation des composés azotés

Les bactéries lactiques ne sont généralement pas protéolytiques. Elles sont toutes auxotrophes pour certains

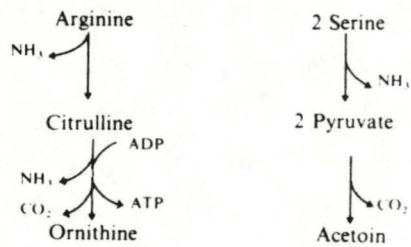


Fig 5 fermentation de l'arginine et de la sérine par les bactéries lactiques ( d'après Mc Donald (1981) pg 73 )



acides aminés avec des variations spécifiques importantes. Leur fermentation des acides aminés ( décarboxylation et désamination ) semble restreinte. Deux acides aminés seraient principalement dégradés, l'arginine et la sérine, mais non de manière systématique par toutes les bactéries lactiques. ( fig 5 ) ( Mc Donald (1981) pg 71-72 ).

Deux autres acides aminés sont faiblement attaqués, la L-lysine et la L-ornithine, qui sont décarboxylés respectivement en cadavérine et en putrescine. La tyrosine est également décarboxylée en tyramine par presque toutes les souches de S. faecalis ( Mc Donald (1981) pg 73 ).

Ces activités de décarboxylation et désamination restent comparativement très faibles par rapport à celles qui sont détaillées dans le groupe des clostridies ( Woolford (1984) pg 107 ).

### I. 3. 2. Clostridia

Sur approximativement soixante espèces qu'inclut le genre Clostridium, sept seulement jouent un rôle important dans l'ensilage. Elles peuvent être définies comme suit : gram + , sporulantes, de forme bâtonnet, anaérobies strictes et fermentant les sucres, les acides organiques ou les protéines. Leur classification a souvent été basée sur l'emplacement de l'endospore et sur leur capacité à liquéfier la gélatine. En ce qui concerne les espèces rencontrées dans l'ensilage, deux groupes physiologiques peuvent être discernés sur la base du substrat principalement fermenté. Les clostridies saccharolytiques ( C. butyricum, C. paraputrificum, C. tyrobutyricum ) fermentent les sucres et les acides organiques ( l'acide lactique y compris, de ce fait souvent référés à lactate fermentatives ) et possèdent des activités protéolytiques limitées.

les comme

Les clostridies protéolytiques ou putréfiantes ( C. bifermentans, C. sporogenes ) fermentent les protéines et les acides aminés, et possèdent des propriétés saccharolytiques faibles.

Il existe des exceptions, par exemple C. perfringens qui possède à la fois des capacités protéolytiques et saccharolytiques élevées ( Woolford (1984) pg 27-28 , Mc Donald (1981) pg 77 ).

#### I. 3. 2. 1. Les causes de développement des Clostridia dans l'ensilage

Le principal habitat des bactéries est le sol. Leur nombre sur les plantes vertes étant généralement faible, leur présence dans l'ensilage est probablement dûe à des contaminations du sol ( Woolford (1984) pg 38 ). Le développement des clostridies est la principale cause d'un ensilage de mauvaise qualité. L'utilisation des sucres et des acides organiques comme le lactate est responsable d'une augmentation du pH. Cette augmentation du pH détruit l'effet préservatif qu'avait le faible pH sur l'ensilage. Le catabolisme des acides aminés a pour effet une diminution de la valeur nutritive du produit fermenté.

Bien que leur capacité de développement dans les premiers stades de l'ensilage soit équivalente à celle des bactéries lactiques pour autant que les conditions anaérobies soient bien établies, un certain nombre de facteurs sont responsables d'une suppression de leur croissance. Les clostridies ne peuvent tolérer des conditions acides ( pH inférieur à 4.2 ) ; le pH optimal de croissance est compris entre 7 et 7.4. Si une quantité suffisante d'acide lactique est produite rapidement, la diminution de pH atteindra



très vite le niveau critique de croissance. Le pH critique de croissance est fonction de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau a été diminuée par l'apport de NaCl ; des tests ont démontré que pour des concentrations en NaCl de 35 g/Kg de matière végétale, le pH 5.6 était le niveau critique de croissance ( Mc Donald (1981) pg 78 ).

Il y a une relation étroite entre la pression osmotique et le niveau critique de pH ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 19 ).

Un autre facteur important est la quantité d'eau proportionnellement à la quantité de matière sèche. Les clostridies se développent plus facilement dans des conditions hydriques élevées. Pour des niveaux supérieurs à 300 g de matière sèche par Kg de matière végétale, leur prolifération est habituellement restreinte. Le préfanage et l'ensilage par temps sec sont deux moyens simples pour augmenter le pourcentage de matière sèche ( Mc Donald (1981) pg 78 , Vanbelle et Bertin (1985) pg 6 ).

Le pouvoir tampon de la matière végétale est également important. Plus celui-ci est élevé, plus la quantité d'acide lactique à produire pour atteindre le pH d'inhibition des clostridies est importante. c'est le cas des légumineuses où le pouvoir tampon est élevé. De plus, les sucres hydro-solubles sont en concentrations faibles. Sans traitement, elles seront préférentiellement colonisées par les clostridies (Mc Donald (1981) pg 80 , Vanbelle et Bertin (1985) pg 4-5 ).

Enfin, la température régnant dans le silo peut avoir une influence marquée sur la croissance des clostridies. Bien que leur optimum de température se situe vers 37° C, leur croissance est favorisée par des températures élevées. La température a une influence directe, mais également une influence indirecte sur la croissance. L'élévation de température étant la conséquence d'une oxydation excessive des sucres, il en résulte une diminution des sucres fermentescibles et donc une diminution de la vitesse d'établissement de la flore lactique ( Mc Donald (1981) pg 80 , Vanbelle et Bertin (1985) pg 20 ).

Fig 6  
fermentation du  
glucose et du  
lactate par les  
clostridies  
( d'après Mc Donald  
(1981) pg 81 )

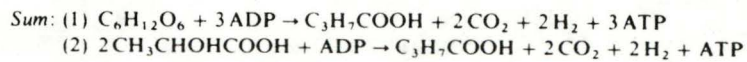
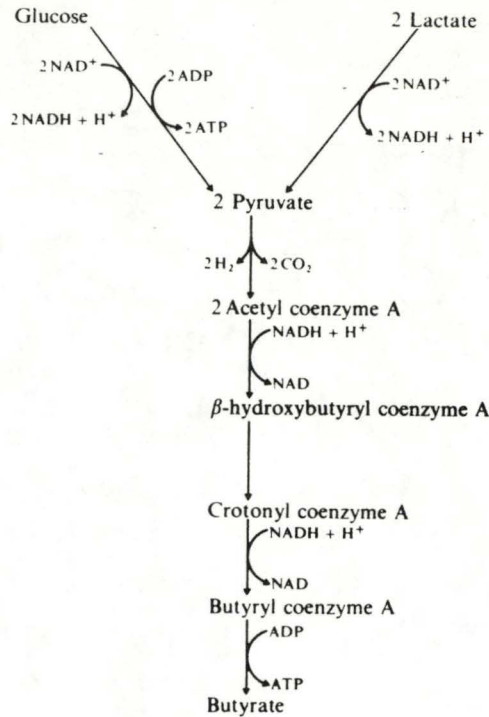
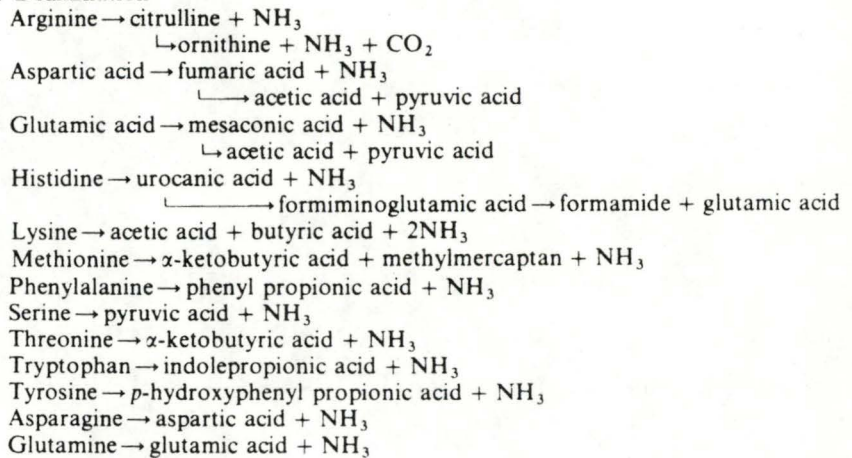
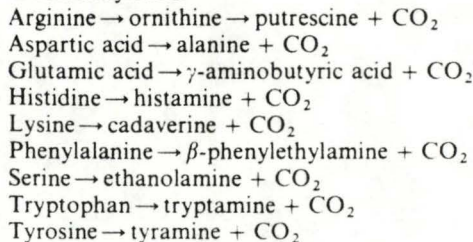


Fig 7  
catabolisme des  
acides aminés et  
des amides par les  
clostridies protéo-  
lytiques ( d'après  
Mc Donald (1981)  
pg 83 )

### 1. Deamination

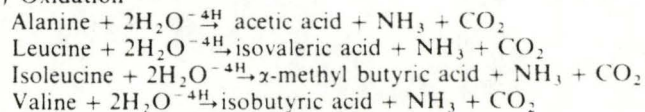


### 2. Decarboxylation

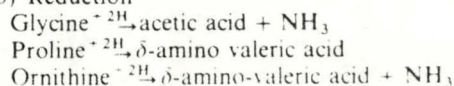


### 3. Oxidation/Reduction (Stickland)\*

#### (a) Oxidation



#### (b) Reduction





Tous ces facteurs peuvent être contrôlés partiellement ou totalement par des améliorations techniques dans la réalisation du processus et par l'ajout d'additifs ( détaillé dans le paragraphe I. 5. ).

### I. 3. 2. 2. La biochimie des clostridies

#### I. 3. 2. 2. 1. La fermentation des sucres et de l'acide lactique ( fig 6 )

Les sucres ( surtout les hexoses ) et l'acide lactique sont fermentés par une voie métabolique commune, avec comme intermédiaire le pyruvate et le crotonyl coenzyme A. Les produits de fermentation sont l'acide butyrique, le  $\text{CO}_2$  et l'hydrogène ( Mc Donald (1981) pg 80 ).

Si une fermentation lactique incomplète est suivie par une fermentation de ce type, il en résultera une augmentation du pH. Le butyrate produit à partir des sucres et de l'acide lactique est un acide plus faible que le lactate. De plus, deux m<sup>o</sup>les de lactate sont nécessaires à la production d'une m<sup>o</sup>le de butyrate ( Mc Donald (1981) pg 81 , Vanbelle et Bertin (1985) pg 19 ).

#### I. 3. 2. 2. 2. La fermentation des composés azotés ( fig 7 )

Trois types de réactions principales sont rencontrées dans la fermentation des acides aminés. *AL*

1) La désamination, où l'amoniaque est libéré et laisse un résidu acide organique ( fig 7 (1)).

2) La décarboxylation menant à la formation d'amines ( fig 7 (2)).

3) La réaction d'oxydo-réduction du type Stickland implique deux acides aminés différents où pendant que le premier est oxydé, le second est réduit ( fig 7 (3)).

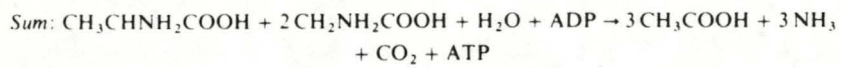
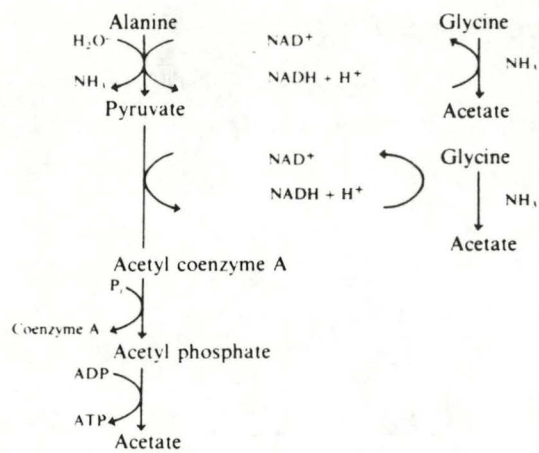


Fig 8 exemple d'une réaction d'oxydo-réduction couplée ( Stickland ) réalisée par les clostridies ( d'après Mc Donald (1981) pg 82 )



Dans cette dernière réaction, l'acide aminé oxydé est transformé en acide gras avec un carbone de moins, tandis que l'acide aminé réduit forme un acide gras avec le même nombre de carbones. Les deux acides aminés ( sauf la proline ) libèrent de l'amoniaque. Un exemple type ( figure 8 ) est celui de l'alanine et la glycine où les produits de fermentation sont l'acétate, l'amoniaque et le  $CO_2$  ( Mc Donald ( 1981 ) pg 81 ).

Presque tous les acides aminés sont catabolisés avec des variations spécifiques. Il est à remarquer que de nombreuses amines produites ( par exemple l'histamine ) sont des composés potentiellement toxiques pour le bétail ( Mc Donald (1981) pg 87 ).

De nombreuses espèces de clostridies sont également connues pour réduire les nitrates et les nitrites en amoniaque ( Woolford (1984) pg 111 ). On a également démontré que certaines espèces pouvaient dégrader les purines et les pyrimidines en libérant du  $CO_2$  et de l'amoniaque ( Mc Donald (1981) pg 88 ).

Toutes ces réactions ont pour conséquence une perte en valeur nutritive de l'ensilage. Après l'augmentation de pH, l'amoniogenèse élevée est un bon indicateur d'une prolifération de clostridies.

### I. 3. 3. Bacilli

Les bacilles diffèrent des clostridies par leur capacité à croître dans des conditions aérobies. Les différentes espèces se différencient par la position de l'endospore, les produits de la fermentation du glucose, leur capacité à hydrolyser l'amidon, leur aptitude à croître dans des conditions anaérobies,.... Les bacilles ne jouent pas un rôle essentiel

dans l'ensilage ( Woolford (1984) pg 30-31 ).  
 Certaines espèces anaérobies facultatives sont quand même rencontrées dans l'ensilage. Parmi celles-ci : B. licheniformis, B. polymyxa, B. coagulans ( Mc Donald (1981) pg 100 ).  
 Leur croissance doit être également découragée durant l'ensilage. Peu d'entre elles fermentent le glucose par la voie homolactique, elles sont donc moins efficaces que les bactéries lactiques pour la production de lactate. Elles sont aussi responsables d'une putréfaction de la matière végétale ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 19 ).

#### I. 3. 4. Les bactéries coliformes

Elles appartiennent à la famille des enterobacteriaceae ; elles sont toutes gram -, en forme de bâtonnets et non sporulantes, aérobies à anaérobies facultatives, catalase +, réduisent les nitrates et fermentent les hydrates de carbone et l'éthanol en acide. Parmi les espèces rencontrées dans l'ensilage, on peut citer : Klebsiella sp, E. coli et Bacterium herbicola ( Mc Donald (1981) pg 91 ).

Leur pH optimal est de 7 ; ces bactéries ne seront actives que pendant les premiers stades de la fermentation et leur développement ultérieur va dépendre de la rapidité avec laquelle les bactéries lactiques vont se développer ( Mc Donald (1981) pg 91-92 ).

Les produits de fermentation des sucres par les enterobacteriaceae comprennent l'acétate, le lactate, l'éthanol et le 2-3 butanediol. Elles sont également aptes à la décarboxylation et la désamination des acides aminés. Pour ces deux caractéristiques métaboliques, leur prolifération n'est pas souhaitée ( Mc Donald (1982)).



### I. 3. 5. Les levures

Les levures présentes dans l'ensilage ont été classées par Beck en deux groupes principaux.

1) Les " sediment yeasts " ( les levures comprises dans la masse ). Elles fermentent les sucres sans décomposer l'acide lactique et ne semblent appartenir qu'au genre Torulopsis.

2) Les " pellicle yeasts " ( les levures de surface )  
Celles-ci possèdent une faible activité fermentative sur les sucres mais décomposent l'acide lactique. Les genres répondant à ces caractéristiques sont Hansenula, Pichia, Candida et parfois Saccharomyces ( Mc Donald (1981) pg 95 , Woolford (1984) pg 32 ).

Le groupe des levures est minoritaire dans l'ensilage mais dans certains cas, son importance n'est pas négligeable. C'est le cas fréquemment dans l'ensilage du maïs ( jusqu'à des pH de 3.5 ), dans les ensilages d'herbe traités à l'acide formique et dans les ensilages où la phase aérobie est prolongée ( Mc Donald (1981) pg 95 ).

Les levures jouent un rôle majeur dans la détérioration aérobie de l'ensilage, lors des prélèvements quotidiens pour alimenter le bétail. Cette détérioration sera d'autant plus rapide que la stabilité de l'ensilage sera faible ( Mc Donald (1982)).

Leur prolifération n'est pas souhaitée, les sucres fermentés ne sont pas transformés en lactate mais principalement en éthanol dont le pouvoir préservatif est à peu près nul dans l'ensilage ( Mc Donald (1981) pg 95 ).

Han

## I. 4. L'évolution de la biocénose microbienne

Après une vue d'ensemble sur les principaux groupes de microorganismes intervenant positivement ou négativement au sein de l'ensilage, il est intéressant de voir comment s'orchestre leur évolution.

### I.4.1. La microflore épiphytique des fourrages

Elle est composée de nombreuses espèces de bactéries et de champignons. Leur importance numérique relative varie avec la variété végétale, les organes de la plante, la saison, la pluviométrie et le pâturage. Les espèces bactériennes ont en commun dans leur grande majorité un métabolisme aérobie ( Flavobacterium, Bacillus, Pseudomonas,...) ou anaérobie facultatif ( Klebsiella, E. coli, Enterobacter,...) et une sensibilité aux pH faibles. La microflore de la plante est sans rapport avec celle du sol si ce n'est pour les spores de clostridies dont l'origine tellurique est certaine.

En ce qui concerne les bactéries lactiques, leur population est très réduite voire même inexistante.

La microflore épiphytique dont on pourrait croire qu'elle sert de " levain " aux fermentations de l'ensilage est totalement différente de celle rencontrée dans celui-ci ; elle est caractérisée par une hétérogénéité importante, un métabolisme surtout aérobie, une sensibilité aux pH acides et une rareté des bactéries lactiques.

### I. 4. 2. L'influence des traitements précédant la mise en silo

Les opérations précédant la mise en silo ( coupe, préfanage, hachage, transport ) jouent un rôle dans la multiplication de la microflore épiphytique indigène.



La coupe met à nu des lésions dans la matière végétale où les jus internes sont libérés. Ces lésions sont le siège d'une multiplication intense de bactéries lactiques ( par exemple les streptocoques ) ( Woolford (1984) pg 40 ). Il est hautement probable que la machinerie qui sert à la préparation de la matière végétale joue le rôle complémentaire d'inoculateur de bactéries lactiques. Ces contaminations sont très aléatoires et varient selon l'espèce végétale ensilée, le séchage plus ou moins long qu'elle a subi, l " essuyage " des remorques, les types de silos utilisés... ( Woolford (1984) pg 40-42 ) , Vanbelle et Gouet (1985) pg 35 ).

#### I. 4. 3. Les différentes phases du processus d'ensilage

##### I. 4. 3. 1. La première phase : la respiration

Dans le premier temps de l'ensilage, l'oxygène atmosphérique est emprisonné dans le silo étanche. Cet oxygène, aussi longtemps qu'il sera disponible, permettra à la matière végétale de respirer. Cette respiration est responsable d'une métabolisation des hydrates de carbone, d'un accroissement du taux d'humidité et d'une augmentation de la température. La respiration doit donc être limitée en assurant un établissement rapide de conditions anaérobies. La respiration est néfaste, car elle est en partie responsable d'une perte de valeur nutritive et établit des conditions favorables au développement des clostridies ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 16-17 ).

Les enzymes végétaux, c'est à dire hémicellulases, cellulases, pectinases, toujours actives dans les conditions physico-chimiques présentes dans les premiers stades, hydrolysent les constituants de la paroi et permettent une libération des sucres fermentescibles par les bactéries ( Mc Donald (1982)).

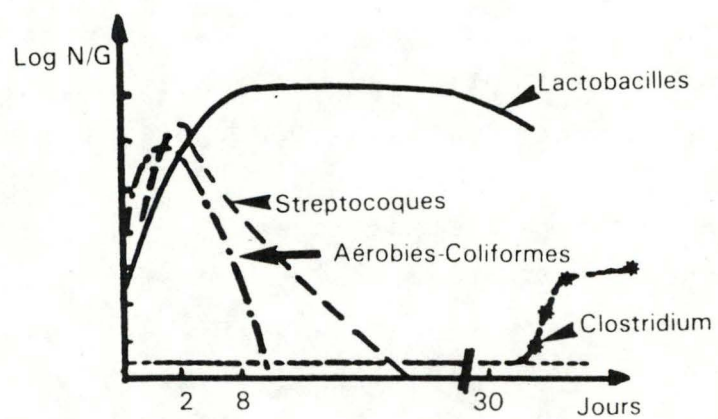


Fig 1 évolution cinétique des principaux groupes bactériens dans les ensilages ( d'après Vanbelle et Gouet (1985) pg 47 )



Les sucres libérés par action enzymatique et par plasmolyse des cellules, les sucres en solution dans le jus des vaisseaux conducteurs, la température moyenne de 30° C, l'humidité importante, l'aérobiose encore suffisante et le pH peu acide sont l'ensemble des conditions favorables à une multiplication des bactéries autochtones.

#### I. 4. 3. 2. La seconde phase : la phase d'acidification

La majorité des microorganismes présents sur les récoltes à l'état frais sont aérobies ou anaérobies facultatives ( moins nombreuses ). Dans un ensilage conventionnel, les conditions aérobies règnent pendant les huit à dix premières heures ; elles vont entraîner une évolution rapide de la microflore épiphytique ( Vanbelle et Gouet (1985) pg 35 ). Entre 18 et 48 heures, sous les effets cumulés de l'apparition de l'anaérobiose et de l'établissement du pH acide, les aérobies stricts disparaissent. Le groupe des coliformes (anaérobies facultatifs ) se maintient plus longtemps, jusqu'au septième jour, pour ensuite diminuer en nombre ( Woolford (1984) pg 43 ). Il est responsable d'une première acidification par fermentation des sucres en acide formique, acide acétique, acide lactique et butyrique ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 17 ).

Les conditions d'anaérobiose ont permis une prolifération des bactéries lactiques. Une sélection microbienne s'opère où une microflore gram - est remplacée par une microflore gram + . Les coliformes sont progressivement remplacés par les coques ( Streptococci, Leuconostocs, Pediococci ) dans un premier temps, suivis des lactobacilles à croissance plus lente. La diminution de pH causée par le développement de ces derniers est fatal aux coliformes ( Woolford (1984) pg 43 ). (fig 1)

L'établissement de la microflore lactique à ce stade va déterminer l'échec ou la réussite de l'ensilage. Cet

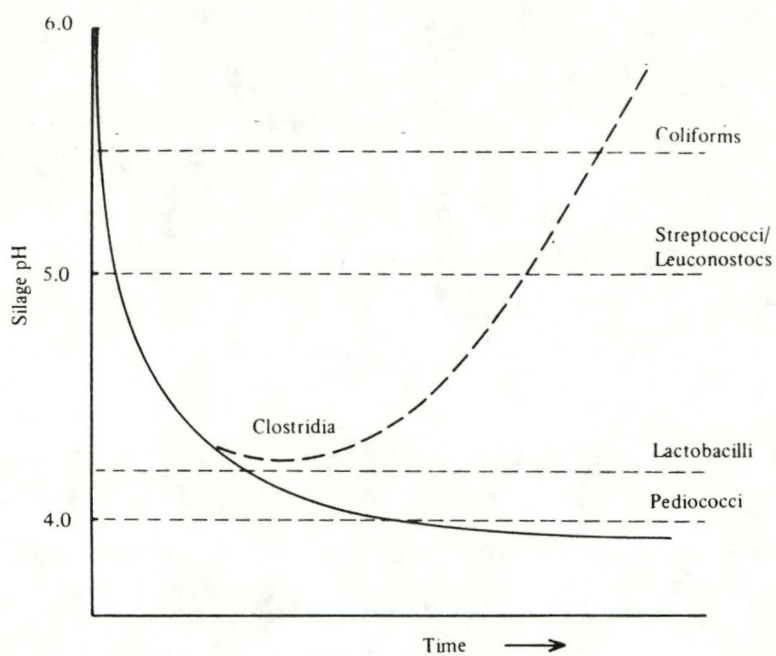


Fig 2 évolution qualitative des différents groupes de la microflore de l'ensilage en fonction du pH  
 ( d'après Woolford (1984) pg 44 )



établissement va être déterminé par le nombre de bactéries lactiques présentes sur le fourrage frais ( s'il est inférieur à 100 par gramme de matière sèche, l'ensilage sera un échec à coup sûr ), les quantités de sucres fermentescibles directement accessibles et les conditions anaérobies maintenues de manière constante dans la masse ensilée ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 18 ).

Les changements qualitatifs dans la microflore des bactéries lactiques sont attribués à leur pouvoir de survie et non pas au fait qu'un groupe croît plus vite qu'un autre. Le pouvoir de survie est lié à l'acidotolérance des bactéries et à leur potentiel acidifiant ( fig 2 ).

Les groupes de bactéries qui disparaissent après les coliformes sont les streptocoques et les leuconostocs, et ceci lorsque le pH approche de 5. Les groupes les plus acidotolérants ( Lactobacilli et surtout les Pediococci ) dominent la population microbienne aux pH les plus bas. Parmi les Lactobacilli, ce sont les hétérofermentatifs que l'on rencontre aux pH faibles. Ils sont plus acidorésistants et plus acétotolérants que les homofermentatifs ( Woolford (1984) pg 43 ).

Après quelques semaines, il est impossible de distinguer entre multiplication et survie à l'intérieur de la microflore. Le pH est le meilleur indicateur de la bonne évolution du processus. L'ensilage évolue vers une phase de stabilisation où l'acide lactique joue le rôle de conservateur. Le pH de stabilisation se situe entre 3.5 et 4.2. Cette forte acidité exerce une stérilisation en masse, la croissance de toutes les bactéries est paralysée, les enzymes sont bloquées et finalement la croissance des bactéries lactiques elle-même est inhibée. Dans cet état, sa conservation est indéfinie tant que les conditions anaérobies sont maintenues ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 18 ).

#### I. 4. 3. 3. La phase de fermentation des bactéries nuisibles

La seconde phase d'acidification par les bactéries lactiques prend toujours place. La phase de fermentation par les bactéries nuisibles peut prendre ou ne pas prendre place ( Woolford (1984) pg 42 ). Si elle s'établit, elle le fait généralement tardivement ( après quelques semaines ), bien que dans les ensilages particulièrement négligés, les Bacilli et les Clostridia peuvent se multiplier pendant les premiers jours ( Woolford (1985) pg 45 ). Les causes de cette prolifération sont liées à une mauvaise multiplication des bactéries lactiques. La fermentation lactique démarre trop lentement et le pH de stabilisation n'est pas atteint.

Les clostridies saccharolytiques, plus acidorésistantes, sont les premières à proliférer. Cette prolifération a pour conséquence une augmentation du pH et permettra le développement des clostridies protéolytiques. A un pH un peu plus élevé, les Bacilli se développent à leur tour. Ces deux derniers groupes sont responsables d'une putréfaction de l'ensilage avec des pertes en valeur nutritive qui s'étendent de 30 à 50 % ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 19 ).

Il est à remarquer que la présence d'acide butyrique, par son odeur rance et nauséabonde, rend l'ensilage moins bien apprécié par le bétail.



## I. 5. Les additifs d'ensilage et le contrôle de la fermentation

### I. 5. 1. Considérations générales

Depuis le début de ce siècle, un ensemble de moyens est utilisé pour tenter d'améliorer la conservation de l'ensilage. L'utilisation des additifs ne doit être réalisée que pour les fourrages difficiles à ensiler et n'est toutefois prescrite que pour des ensilages techniquement bien réalisés.

Les principales caractéristiques d'un ensilage bien réalisé sont les suivantes : des conditions anaérobies bien maintenues et rapidement obtenues, préfaner si nécessaire afin d'augmenter le pourcentage de matière sèche ; hacher ou lacérer pour augmenter la libération des sucres et faciliter la compaction, travailler proprement en évitant les souillures par la terre... Malgré toutes ces conditions, des fourrages restent difficiles à ensiler pour des causes liées à la matière végétale elle-même. Les végétaux possèdent souvent des pourcentages en matière sèche favorables au développement des clostridies, des concentrations en hydrates de carbone insuffisantes, une flore épiphytique souvent trop peu représentée par les bactéries lactiques... Ainsi les légumineuses et les graminées, deux groupes de fourrages très importants, s'ensilent avec beaucoup de problèmes.

Il existe sur le marché une quantité impressionnante d'additifs dont la composition est très variable et souvent gardée secrète par le fabricant. Leur efficacité n'a pas toujours été démontrée, mais un certain nombre ont fait leurs preuves. On peut les classer en deux grandes catégories : les conservateurs chimiques et les conservateurs biologiques. On entend par conservateurs chimiques, des conservateurs artificiels dans le sens qu'ils ne sont normalement pas présents dans l'ensilage naturel. A l'opposé, les conservateurs biologiques sont constitués de composés intervenant directement dans le processus naturel, mais considérés comme étant insuf-



fisants d'un point de vue qualitatif ou quantitatif.

Parmi ces deux grands groupes ne seront cités que ceux utilisés dans des conditions pratiques. Ces additifs ne sont intéressants que si les doses qui doivent être utilisées pour être efficaces ne sont pas hors de prix. Sachant qu'à peu près 20 % de la valeur nutritive est gagnée entre un ensilage de bonne qualité ( 10 % de pertes ) et de mauvaise qualité ( 30 % de pertes ) et que le prix d'une tonne de fourrage vert possède une valeur approximative de 750 fB ( 1978 ), le prix du conservateur ne pourra excéder 150 fB par tonne de fourrage ; et dans ce cas, on ne fait pas de bénéfices, on récupère simplement les frais ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 36 ). Malheureusement, rares sont les conservateurs dont le prix ne dépasse pas 100 fB par tonne.

Mis à part le gain en valeur nutritive, un ensilage de bonne qualité a d'autres avantages. Il est mieux appété par le bétail, les risques d'intoxication et de développement de bactéries toxiques ( Listeria ) sont moindres, les problèmes liés au passage des spores de Clostridia dans le lait sont diminués. Il est important de savoir qu'un lait contaminé par des spores de clostridies est inapte à la fabrication de fromage. Ces spores germent lors de l'affinage et peuvent entraîner des pertes énormes. Ce problème d'une importance économique non négligeable a grandement limité l'utilisation de l'ensilage comme aliment de base dans la nutrition du bétail dont le lait est utilisé dans l'industrie fromagère ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 62 ).

↑  
 fgs méthonné  
 au fromage

## I. 5. 2. Les conservateurs chimiques

### I. 5. 2. 1. Les acides

#### a) Les acides inorganiques ( procédé AIV )

Le procédé AIV a été développé en 1920. Il a été couramment employé en Scandinavie. Ce système consiste en une



dose très forte d'un mélange de  $H_2SO_4$  et d' $HCl$  ( 12 N dilué 5x ) appliquée à raison de 5 à 8 % de la masse du fourrage. Ce procédé entraîne une diminution radicale du pH vers 3.5 et inhibe toutes les enzymes végétales, la respiration et presque toute fermentation. Mais ce procédé s'avéra trop radical et entraîna des problèmes physiologiques chez le bétail. Parmi ces problèmes, on peut citer les acidoses, les déséquilibres minéraux où les ions sulfate et chlorure sont laissés en quantité importante dans l'organisme. De plus, les ensilages traités s'avérèrent plus difficiles à manipuler et entraînèrent une corrosion poussée de certains silos ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 41 , Woolford (1984) pg 220-223 , Mc Donald (1981) pg 137-138 ).

#### b) Les acides organiques

Les acides inorganiques ont perdu leur popularité et ont été progressivement remplacés par des acides organiques, dont le plus intéressant est l'acide formique. Les acides organiques ont l'avantage d'être métabolisés et de ne laisser aucun résidu minéral dans l'organisme. Aux doses prescrites, la fermentation lactique n'est pas inhibée. L'effet de l'acide formique sur la fermentation est dû en partie à son effet acide mais également à ses propriétés antimicrobiennes sélectives. Il favorise la fermentation lactique et concourt de ce fait à l'abaissement du pH. Mis à part son prix élevé par rapport au système AIV, il reste le principal concurrent des conservateurs biologiques. Il est à remarquer que son coût peut être diminué par l'addition d'acides inorganiques. S'ils ne dépassent pas 20 à 30 % du volume final, ils n'ont pas les désavantages rencontrés dans le système AIV ( Woolford (1984) pg 222-225 , Mc Donald (1981) pg 138-142 ).

L'acide propionique est également utilisé mais est loin de concurrencer l'acide formique. Son prix bien supérieur et son acidité inférieure limitent son utilisation. Mais il possède un pouvoir fongicide réel. Il est souvent utilisé pour éviter le développement des champignons en surface lorsque les conditions aérobies sont restaurées lors du désilage ( Woolford (1984) pg 229 , Vanbelle et Bertin (1985) pg 43 ).

### I. 5. 2. 2. Les produits bactériostatiques

Ils ont pour but de stopper toute fermentation ou alors de stopper sélectivement les fermentations néfastes. De nombreux bactériostatiques ont été testés : antibiotiques, métabisulfite de soude, NaCl, ... Ils se sont révélés inefficaces car pour les doses où ceux-ci jouent leur rôle, leur prix est exorbitant ou leur innocuité sur le bétail est mise en doute ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 37 ).

La formaldéhyde fait exception. Elle est commercialisée sous forme de formol ( 40 % formaldéhyde ). Il est très efficace dans l'ensilage à des doses de 6 à 7 l/T. Son inhibition sur la fermentation ne peut être atteinte qu'à des concentrations très élevées. La formaldéhyde étant un composé très volatile, son évaporation sera importante tant que les conditions anaérobies ne seront pas atteintes. Et même en pratique ces conditions ne sont pas absolues ; si sa concentration est insuffisante, l'ensilage sera soumis à une instabilité aérobie lors de son ouverture. De plus, à haute concentration, il entraîne un tannage des protéines et diminue ainsi leur digestibilité dans l'intestin. Son utilisation courante doit être réalisée à dose réduite, et pour être efficace, il est souvent associé avec des acides ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 37 , Woolford (1984) pg 237-340 ).

*gène!*

### I. 5. 3. Les conservateurs biologiques

Ces conservateurs sont généralement constitués de bactéries lactiques, avec ou sans enzymes, accompagnées d'un support énergétique. Bien que chacun de ces constituants puisse servir d'additif à part entière, leur efficacité n'est réellement démontrée que si leur utilisation est conjointe. Chaque constituant joue un rôle complémentaire par rapport aux autres ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 45 , Mc Donald (1981) pg 131 ).



Ce type de conservateur constitue une alternative intéressante à l'acidification artificielle. Son avantage est qu'il stimule la fermentation en jouant sur les caractéristiques naturelles de la fermentation. Au plus la fermentation lactique sera importante, plus vite le pH de stabilité sera atteint, de même que les conditions d'inhibition envers les microorganismes néfastes.

#### I. 5. 3. 1. Les bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques en tant que stimulant de la fermentation a déjà été envisagée au début du siècle par des chercheurs français. Whittenbury ( 1961 ) fut le premier à définir les critères de sélection d'une bactérie idéale en vue de son utilisation dans l'ensilage. Cette bactérie doit posséder une croissance vigoureuse et être compétitive vis-à-vis des autres organismes, fermenter le glucose, le fructose, le saccharose, les fructosanes et de préférence les pentoses, utiliser la voie homofermentative en produisant un maximum d'acide lactique afin d'atteindre le plus rapidement possible un pH aussi bas que 4, impliquant ainsi une acidotolérance élevée. La bactérie ne doit pas avoir d'activité sur les acides organiques et les protéines, ne doit pas produire de dextrane à partir du mannitol ou du saccharose. Enfin, elle doit être capable de croître dans des ensilages à pourcentage élevé en matière sèche.

Lactobacillus plantarum correspond le mieux à ces critères, mais il a l'inconvénient de n'être actif dans la production d'acide lactique qu'à des pH inférieurs à 5. L'inoculum à priori idéal serait celui qui incluerait une autre espèce de bactérie active entre pH 5 et 6.5. S. faecalis remplit ce rôle et a l'avantage de croître rapidement en conditions aérobies ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 47-50 , Woolford (1984) pg 356-260 , Mc Donald (1981) pg 129-133 ).

Mais cette association n'est vraiment efficace que si les souches de ces deux espèces sont bien sélectionnées. Ces souches, en plus des caractéristiques décrites doivent présenter des activités annexes, comme par exemple : une tolérance à l'acide acétique, posséder des exigences nutritionnelles amoindries, produire l'isomère L ( + ) ( plus facilement assimilable au niveau du rumen ) ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 50 ). De plus, pour être efficace, le nombre inoculé doit être suffisant, le minimum déterminé par Vanbelle et Bertin est de  $10^5$  germes viables par gramme de fourrage frais ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 50 ). Encore faut-il que ces bactéries trouvent des quantités suffisantes de sucres assimilables.

de l'acide  
lactique

#### I. 5. 3. 2. Le support énergétique et les enzymes

Le support énergétique peut être constitué de sucres simples, mais le prix élevé du glucose et du sucrose fait qu'ils ne sont pas utilisés en pratique. Les mélasses ( produits secondaires de l'industrie sucrière ) riches en glucose ( 50 % ) sont par contre à prix abordable. Mais leur popularité est faible, leur manipulation n'étant pas aisée. Elles doivent être diluées dans un égal volume d'eau, entraînant ainsi une diminution du pourcentage de matière sèche, ce qui n'est pas recommandé.

A côté des mélasses, l'amidon reste la source la moins coûteuse d'hydrates de carbone, mais il est malheureusement inaccessible pour la presque-totalité des bactéries lactiques importantes dans l'ensilage ( Mc Donald (1981) pg 133-134, Woolford (1984) pg 247-250 ). L'amidon, souvent fourni sous forme de céréales, doit être associé à l'action d'amylases afin de libérer du glucose ou du maltose. Elles peuvent être apportées en associant 6 % de malt aux céréales, mais cette formule est à la limite du prix maximum pour la rentabilisation du conservateur. Par contre, les amylases industrielles reviennent actuellement moins cher que le malt et peuvent être plus intimement mélangées à l'amidon. ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 38-41 )



A côté de l'apport extérieur de sucres, on peut favoriser l'utilisation des sucres in situ par une dépolymérisation de la cellulose et de l'hémicellulose présents en quantités importantes. Cette dépolymérisation peut être réalisée par des complexes cellulolytiques et hémicellulolytiques. Elle a également pour conséquence une digestibilité accrue du fourrage pour le bétail. Mais l'étude fondamentale de ces complexes n'a été que partiellement abordée. De nombreuses recherches restent à faire pour étudier la relation entre la composition chimique du fourrage et les types de complexes à utiliser ( Vanbelle et Bertin (1985) pg 45 , Woolford (1984) pg 253-255 , Mc Donald (1981) pg 137 ).

#### I. 5. 4. Organisation de la recherche

Les conservateurs biologiques possèdent tous les atouts du conservateur " idéal ", sans effets secondaires et respectant la fermentation naturelle de l'ensilage. Ce qui limite actuellement en partie leur expansion sur le marché est la partie enzyme du conservateur qui conditionne le prix de l'additif. Il est apparu intéressant que les souches de bactéries impliquées dans l'ensilage produisent ces enzymes.

Mais avant d'entreprendre un processus de recherche et développement dans ce domaine, il fallait s'assurer de la faisabilité d'un tel projet. Les deux partenaires, la bactérie lactique ( S. faecalis ) et l'enzyme ( l' $\alpha$ -amylase de Bacillus licheniformis ) ont été choisis en fonction de leur accessibilité aisée à une manipulation génétique.

Les deux paragraphes suivants vont présenter les deux partenaires impliqués dans cette association.

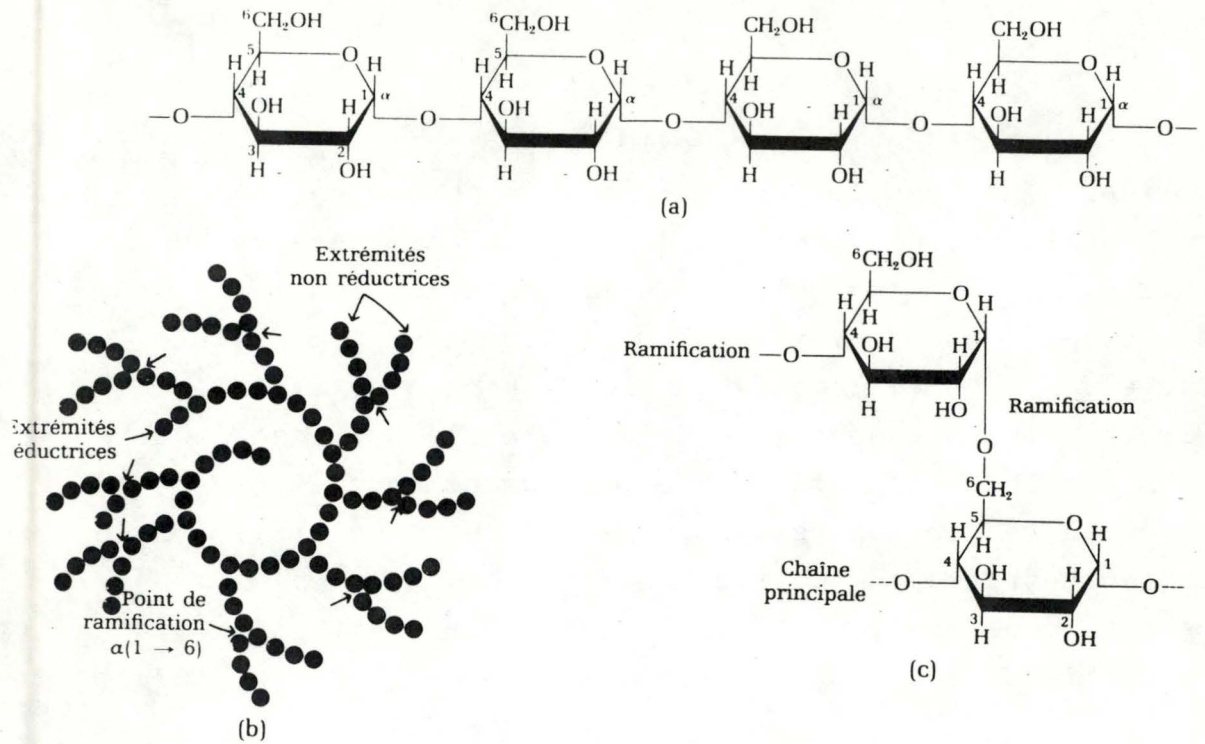


Fig 1 amylose et amylopectine, les deux polysaccharides de l'amidon

- (a) amylose, polymère linéaire constitué d'unités de D-glucose liés par des liaisons  $\alpha(1-4)$
  - (b) amylopectine, chaque cercle plein représente un résidu glucose
  - (c) structure d'un point de ramification
- ( Lehniger (1985) pg 289 )



## II. Les amylases

### II. 1. Le substrat

Les amylases sont capables d'hydrolyser l'amidon et le glycogène. L'amidon est constitué de deux types de polymères de glucose : l' $\alpha$ -amylose et l'amylopectine et ceci dans un rapport pondéral qui va généralement de 1/3 à 1/4. L' $\alpha$ -amylose est formé de longues chaînes non ramifiées d'unités D-glucose unies par des liaisons  $\alpha(1-4)$  ( fig 1 (a)). L'amylopectine est par contre extrêmement ramifiée ( fig 1 (b)). Les résidus successifs de D-glucose sont unis par des liaisons  $\alpha(1-4)$ , mais les points de ramification dans l'amylopectine sont des liaisons  $\alpha(1-6)$  (fig 1 (c)). ( Lehninger (1985) pg 288-289 ).

### II. 2. Les différents types d'amylases

La production d'amylase se retrouve aussi bien chez les eucaryotes supérieurs que chez les procaryotes. Les amylases utilisées dans les processus industriels appartiennent à trois groupes. Les céréales avec les enzymes du malt, les champignons avec les amylases produites par les genres Aspergillus, Mucor, Rhizopus, et les bactéries avec les amylases produites par Bacillus et les enzymes produites industriellement par Aerobacter aerogenes ( Durand et col (1982)). Les amylases peuvent être classées en trois grandes catégories : les exoamylases, les endoamylases et les enzymes débranchants. es

#### II. 2. 1. Les exoamylases

Elles hydrolysent séquentiellement les liaisons  $\alpha(1-4)$  de l'amylose et de l'amylopectine à partir des extrémités non réductrices ( cfr fig 2 (a)). Dans ce groupe on retrouve les  $\beta$ -amylases et les amyloglucosidases.

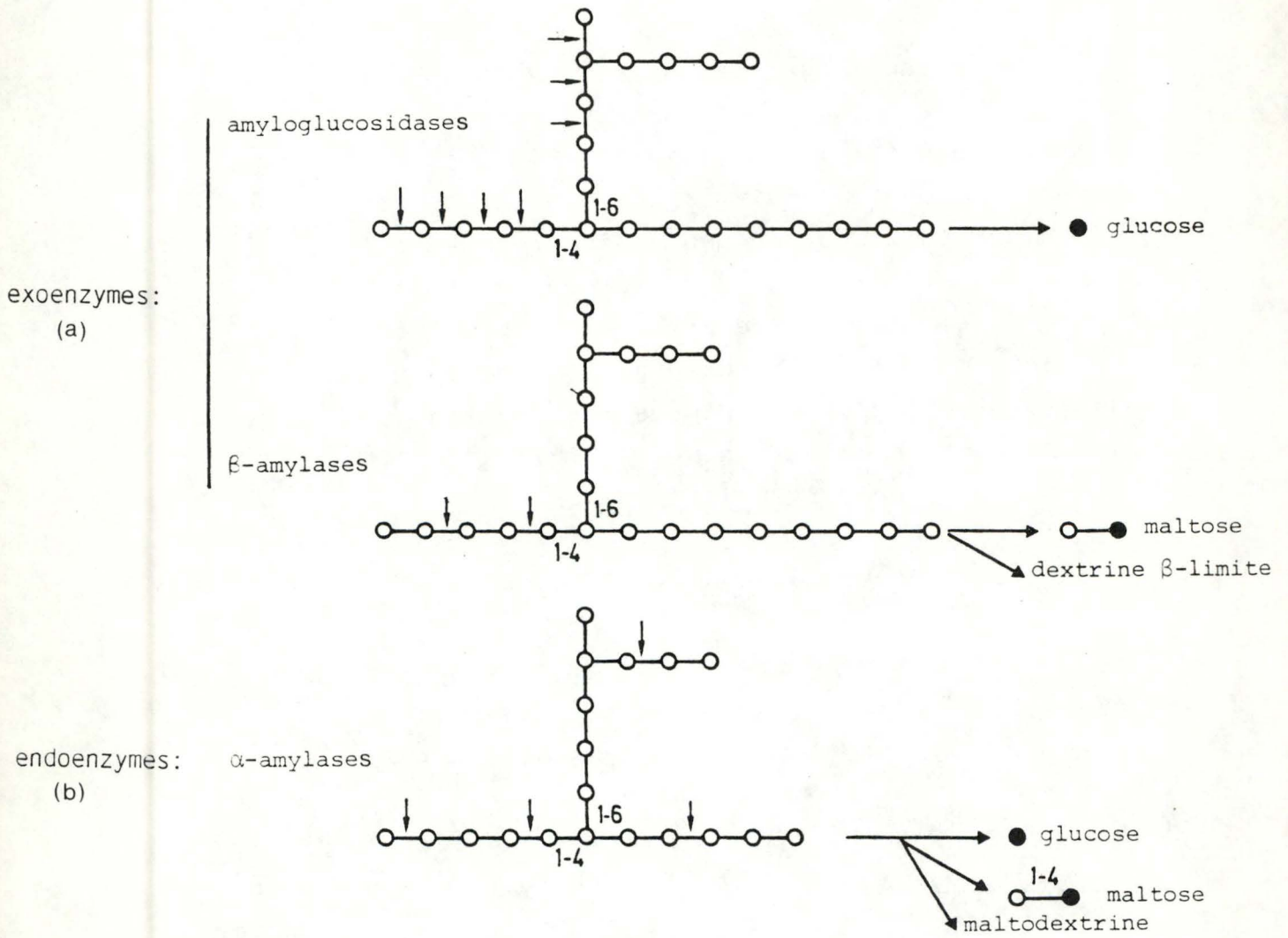


Figure 2: Dégradation de l'amidon par les amylases  
 Les flèches indiquent les sites probables de clivage. ○ : unité de glucose, ● : unité de glucose avec une extrémité réductrice.

( d'après Willemot K.(1986))



## II. 2. 1. 1. Les $\beta$ -amylases

Leur activité exoamylolytique sur les liaisons  $\alpha(1-4)$  s'exerce par une libération de maltose. Cette hydrolyse se fait avec une inversion de configuration au niveau du C (1) impliqué dans le processus; de sorte que l'on obtient du  $\beta$ -maltose. La  $\beta$ -amylase se caractérise par une inactivité sur les liaisons  $\alpha(1-6)$  de l'amylopectine, son action s'arrête aux points de branchement. Les produits d'hydrolyse sont donc du  $\beta$ -maltose à raison de 50 à 60 % et un résidu moléculaire branché appelé  $\beta$ -dextrine limite. Traditionnellement, ce type d'amylase est obtenu à partir d'extrait de malt. Mais on a pu isoler des producteurs bactériens ; ainsi certaines souches de Bacillus circulans, B. polymyxa, B. cereus var mycoïdes ( Durand et col (1982) pg 128 ).

## II. 2. 1. 2. L'amyloglucosidase ou glucoamylase

Son activité séquentielle sur les liaisons  $\alpha(1-4)$  des extrémités non réductrices se marque par une libération d'unités  $\alpha$ -D glucose. Cette enzyme possède une activité secondaire sur les liaisons  $\alpha(1-6)$ , ce qui permet de libérer les chaînons linéaires de l'amylopectine. Le produit résultant de l'hydrolyse complète de l'amidon peut posséder de 72 à 96 % de glucose. Ce sont essentiellement des souches d'Aspergillus niger qui sont utilisées dans la production industrielle, bien que certains genres de bactéries possèdent ce type d'activité, comme par exemple Aerobacter et Clostridium ( Durand et col. (1982) pg 129-132 ).

## II. 2. 2. Les endoamylases

Elles se caractérisent par une activité endohydrolytique sur les liaisons  $\alpha(1-4)$  de l'amidon. Cette hydrolyse

a lieu au hasard au sein du polymère et non plus à partir des extrémités ( fig 2 (b)).

Ce groupe est représenté par les  $\alpha$ -amylases. Elles hydrolysent les liaisons  $\alpha(1-4)$ , mais pas les liaisons  $\alpha(1-6)$  de l'amylopectine. L'hydrolyse de l' $\alpha$ -amylose entraîne une conversion complète de celui-ci en maltotriose et maltose suivie d'une hydrolyse lente du maltotriose. L'hydrolyse de l'amylopectine résulte en une production de glucose, de maltose et une série d' $\alpha$ -dextrines limites branchées.

Ces dextrines limites branchées proviennent du fait que les liaisons  $\alpha(1-4)$  proches des points de branchement ne sont que lentement attaquées. Les  $\alpha$ -amylases utilisées industriellement sont d'origine fongique ou bactérienne. Les  $\alpha$ -amylases fongiques sont essentiellement produites par des souches d'Aspergillus oryzae et A. niger. Les  $\alpha$ -amylases bactériennes sont principalement produites par le genre Bacillus. Deux espèces sont couramment utilisées pour la thermostabilité élevée de leur  $\alpha$ -amylase : Bacillus amyloliquefaciens et B. licheniformis. L' $\alpha$ -amylase de B. acidocaldarius est également intéressante car son pH optimal d'activité est de 3.5 ( Rose et col.(1980) pg 131-132 , Durand et col.(1982) pg 126-128 ).

## II. 2. 3. Les enzymes débranchants

L'activité de ces enzymes s'effectue spécifiquement sur les liaisons  $\alpha(1-6)$  de l'amylopectine. Ces enzymes sont surtout utilisées de concert avec les amylases à activité nulle sur les liaisons  $\alpha(1-6)$ .

### II. 2. 3. 1. La pullulanase

Cet enzyme se caractérise par l'hydrolyse du pullulane ( polymère d'unités maltotriose enchaînées par des liaisons  $\alpha(1-6)$ ). Mais cet enzyme est également capable d'hydrolyser spécifiquement les liaisons  $\alpha(1-6)$  de l'amylopectine. Cet enzyme est produit par de nombreuses bactéries, mais Aerobacter aerogenes est utilisé pour la production industrielle de pullulanase ( Durand et col.(1982) pg 132 ).



## II. 2. 3. 2. L'isoamylase

Enzyme qui se différencie de la pullulanase par une inactivité sur le pullulane et une activité plus rapide sur les polymères natifs et où un minimum de trois résidus glucoses sur la partie branchée sont nécessaires, au lieu de deux pour la pullulanase. Les applications sur l'hydrolyse des liaisons  $\alpha(1-6)$  sont comparables à la pullulanase. Parmi les microorganismes producteurs, on peut citer : Bacillus amyloliquefaciens, Pseudomonas sp. ( Durand et col. (1982) pg 133 ).

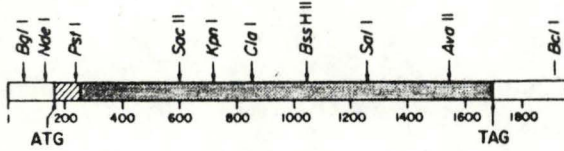
## II. 3. L' $\alpha$ -amylase de Bacillus licheniformis

### II. 3. 1. Ses propriétés

L' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis est de type liquéfiante ( opposé à saccharifiante ) où la production de sucres réducteurs est relativement faible. Le maximum de dégradation que l'on peut obtenir conduit à l'obtention d'un amidon liquéfié ayant un DE ( dextrose-équivalent ou pourcentage pondéral de sucres réducteurs exprimé en équivalent de glucose anhydre ) de 30 ( Yuuki et col.(1985) ; Durand et col.(1982) pg 127 ). Elle est caractérisée par une thermostabilité élevée. La température optimale d'activité est fonction de la souche de B. licheniformis dont l'enzyme est issue. Deux  $\alpha$ -amylases sont utilisées dans ce travail. L' $\alpha$ -amylase issue de la souche RP01 possède un optimum de température supérieur à 100° C ( Piggott et col.(1984) et l' $\alpha$ -amylase de la souche FD02 un optimum de 93° C ( Ortlepp et col. (1983)).

Fig 1

(a)



(b)

```

ACCTTGAALAGTGAALAAAGAGAGAGGCTATTGAATAAATGAGTGAAGAGGCTATATCGGCTTTCTTTGGAG
AAAATATAGGGAAAATGGTACTTGTATAAATTCGGAAATTTATAACACATCATATGTTTACATCGAAGGGGGGA
-10      -11      -12      -13      -14      -15      -16      -17      -18      -19
Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu
GAGTC ATG AAG TCA TCA AAG TGG TTT TAT TCA TCA TTA TTA CTG AAG CTG TTA TTT GGC CTC
-20      -21      -22      -23      -24      -25      -26      -27      -28      -29
Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln
ATC TTC TTG CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GGG ACG CTG ATG CAG
30      40      50      60      70      80      90      100      110      120
Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser
TAT TTT GAA TGG TAC ATG CCC AAT GAC GCG CAA CAT TGG AAG CGT TTG CAA AAC GAC TCG
130      140      150      160      170      180      190      200      210      220
Ala Tyr Leu Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr
GCA TAT TTG GCT GAA CAC GGT ATT ACT GCG TCG ATG ATT CCC GCG GCA TAT AAG GGA ACG
230      240      250      260      270      280      290      300      310      320
Ser Gln Ala Asn Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe His Gln
ACG CAA GCG GAT GTG GCG TAC GGT TAC GAC CTT TAT GAT TTA GGG GAG TTT CAT CAA
330      340      350      360      370      380      390      400      410      420
Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser
AAA GGG ACG CTT CCG ACA AAG TAC GCG ACA AAA GGA GAG CTG CAA TCT GCG ATC AAA AGT
430      440      450      460      470      480      490      500      510      520
Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala
CCT CAT TCC GCG LAC AIT AAC GTT TAC GCG GAT CTG GTC ATC AAC CAC AAA CCG GCG GCT
530      540      550      560      570      580      590      600      610      620
Ile Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile
ASP GCG ACC GAA GAT GTA ACC GCG GTT GAA GTC GAT CCC GGT GAC GCG AAC GCG GTA AIT
630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg Gly Ser Thr
TCA GAA GAA LAC LTA AIT AAA GCG TGG ACA CAT TTT CAT TTT CCG GCG GCG AGC ACA
730      740      750      760      770      780      790      800      810      820
Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr Ser Trp Asp Glu Ser Arg
TAL ACG GAT TTT AAA TGG CAT TGG TAC TAT TTT GAC GGA ACC GAT TGG GAC GAG TCC CCA
830      840      850      860      870      880      890      900      910      920
Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu
AAG CTG AAC GCG AIT TAT AAG TTT CAA GCA AAG GCT TGG CAT TGG GAA GTT TCC AAT GAA
930      940      950      960      970      980      990      1000      1010      1020
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala
AAL GGG AAC TAT GAT TAT TTG ATG TAT GCG GAC ATC GAT TAT GAC CAT CCT GAT GTC GCA
1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp Gly Phe Arg
GCA GAA ATT AAG AAG TGG GCG GCG AAT TGG TAT GCG AAT GAA CTG CAA TTG GAC GGT TTC CGT
1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200      1210      1220
Leu Asn Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg
CTT GAT GCT GTC ACA CAC AIT AAA TTT TCT TTT TTG CCG GAT TGG GTT AAT CAT GTC ACG
1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300      1310      1320
Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala
GAA AAA ACG GGG AAG GAA ATG TTT ACG GTA GCT GAA TAT TGG CAG AAT GAC TTG GCG GCG
1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400      1410      1420
Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His
CTG GAA AAC TAT TTG AAC AAA ACA AAT TTT AAT CAT TCA GTC TTT GAC GTC CCG CTT CAT
1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys Leu Leu Asn
TAT CAG TTC CAT GCT GCA TCG ACA CAG GGA GCG GCG TAT GAT ATG AGG AAA TTG CTG ACA
1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610      1620
Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr
GGT ACG GTC GTT TCC AAG CAT CCG TTG AAA TCG GTT ACA TTT GTC GAT AAC CAT GAT ACA
1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700      1710      1720
Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
CAG CCG GGG CAA TCG CTT GAG TCG ACT GTC CAA ACA TGG TTT AAG CCG CTT GCT TAC GCT
1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr
TTT AIT CTC ACA AGG GAA TCT GGA TAC CCT CAG GTT TTC TAC GGG GAT ATG TAC GGG ACG
1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro Ile Leu Lys
AAA GGA GAC TCC CAG CCG GAA AIT CCT GEC TTG AAA CAA AAT GAA ATT GAA CCG ATC TTA AAA
1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000      2010      2020
Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val
GCG AGA AAA CAG TAT GCG TAC GGA GCA CAG CAT GAT TAT TTC GAC CAC CAT GAC AIT GTC
2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100      2110      2120
Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr
GGC TGG ACA AGG GAA GCG GAC ACG TCG GTT GCA AAT TCA GGT TTG GCG GCA TTA ATA ACA
2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200      2210      2220
Asp Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp
LAC GGA CCC GGT GGG GCA AAG CGA ATG TAT GTC GCG CAA AAC GCG GGT GAG ACA TGG
2230      2240      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu
CAT GAC AIT ACC GGA AAC CGT TCG GAG CCG GTT GTC ATC AAT TCG GAA GCG TGG GGA GAG
2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400      2410      2420
Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg Asn
TTT CAC GTA AAC GCG GGG TCG GTT TCA AIT TAT GTT CAA AGA TAG AAGACGAGAGAGGACGGA
TTTCTCGAAGGAAATCCGTTTTTTTTTTTTCGCGGCTTATAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAAACA
AAGTCTCATAGCCCTTAGGAAGACTTGTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGCCGGGATGAATGGCAGCGTTA
TCTGATGTAGCAAAAGAAAGCAATGTGTGAAAATGACGGTATCCGGGTGATCAATCATCTCGAGCTGTGACCGGAT
GAAATGGAAAAGCT

```

- (a) carte de restriction du gène d'  $\alpha$ -amylase de B. licheniformis. La partie ombrée représente la partie codante de l'  $\alpha$ -amylase mature. La région codant pour la séquence signal est représentée par la partie hachurée. Les régions ouvertes à droite et à gauche représentent les extrémités 5' et 3' non-codantes.
- (b) séquence nucléotidique du gène d'  $\alpha$ -amylase de B. licheniformis NCIB8061. Les codons de la séquence signal sont représentés par les chiffres négatifs et les codons de l'  $\alpha$ -amylase mature par les chiffres positifs. La séquence entourée d'une boîte représente la séquence Shine-Dalgarno. Les séquences soulignées représentent en amont du gène la séquence promoteur et en aval la séquence terminateur de transcription.
- ( d'après Gray et col.(1986)).



L'optimum de pH s'étend de 5.0 à 9.0 ( Saito (1973)). Toutes les  $\alpha$ -amylases sont des métalloprotéines où l'apport de l'ion calcium est requis non pas pour catalyser la réaction mais surtout pour assurer la stabilité de l'enzyme dans les conditions extrêmes de pH et de température. L' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis requiert relativement peu d'ions calcium ( 50 ppm ) pour travailler dans des conditions satisfaisantes ( Durand et col.(1982) pg 127 ; Allen et Spradlin (1974)).

## II. 3. 2. Aspects génétiques

### II. 3. 2. 1. Carte de restriction et séquence génique

Le gène de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis a été isolé par plusieurs laboratoires ( Ortleppet col.(1983) , Piggott et col.(1984) , Yuuki et col.(1985) , Gray et col. (1986)) à partir de souches d'origine différente. La carte de restriction ( fig 1 (a)) s'est avérée très semblable dans tous les gènes clonés.

Certains de ces gènes ont été séquencés partiellement ou complètement. Ainsi, la séquence de la région 5', soit les 312 premiers nucléotides de la partie codante du gène de la souche FDO2 a été déterminée ( Stephens et col.(1984)), de même que plusieurs segments de la souche RP01 ( J. Delcour, travail personnel à Dublin (1986)). Ces fragments se sont avérés identiques au gène entièrement séquencé de la souche NCIB 8061 ( Gray et col.(1986)) et presque identique ( à quelques nucléotides près ) au gène entièrement séquencé de la souche 584 ( ATCC 27811 ) ( Yuuki et col.(1985)). La figure ci-contre (b) représente la séquence de Gray et col. pour la souche NCIB 8061. A partir de de la séquence génique, on peut déterminer les signaux de reconnaissance de la machinerie de transcription et de traduction, de même que la partie codante du gène.

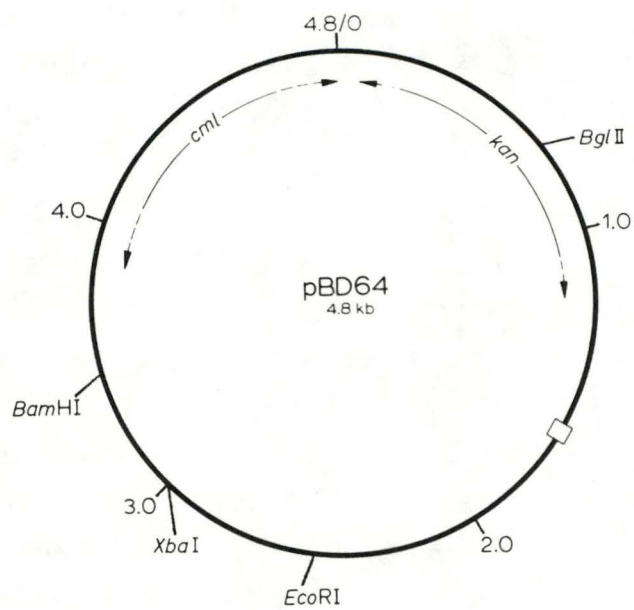


Fig 2 carte de restriction du plasmide pBD64 ( 4,8 kb )  
 le carré représente l'origine de répliation  
 les symboles cml et kan représentent respective-  
 ment les marqueurs de résistance au chloramphénicol  
 et à la kanamycine  
 ( d'après Pouwels et col ( 1985 ) )



La partie codante du gène de ATG à TAG soit du codon -29 à 483 comprend 1536 nucléotides. Les codons -29 à -1 codent pour la séquence signal, responsable de l'exportation de la protéine. Cette séquence est excisée par une peptidase lors de la traversée de la membrane. La protéine mature est constituée des codons 1 à 483.

En amont de la séquence signal se retrouvent les signaux potentiels de transcription et traduction. Le promoteur est constitué de deux hexamères, celui-ci est le site de reconnaissance de transcription pour la RNA polymérase. Le premier hexamère dans notre cas est 5'...TTGTTA...3' et est séparé du second hexamère 5'...TACAAC...3' par 17 nucléotides ( fig 1(b)). Une troisième séquence est reconnaissable sur ce gène juste en aval de la séquence promoteur. La séquence Shine-Dalgarno 5'...GAAGGGG...3', séquence de reconnaissance sur le mRNA pour la petite sous-unité du ribosome où les bases s'apparient avec l'extrémité 3' du 16 S rRNA. Cette séquence est à la base de l'initiation de la traduction chez les procaryotes ( Stephens et col.(1985) , Lewin (1985)).

### II. 3. 2. 2. CLonage du gène chez B. subtilis

Pour permettre l'établissement de la carte de restriction et la séquence du gène, celui-ci situé au niveau chromosomique a dû être cloné dans des plasmides autorépliquatifs de B. subtilis et E.coli. Le clonage de gènes issus des souches FD02 et RP01 chez B. subtilis a été réalisé comme suit : après purification du DNA chromosomique de B. licheniformis, celui-ci a été clivé avec de l'enzyme de restriction EcoRI, générant ainsi un ensemble de fragments de taille différente. Le plasmide pBD 64 ( fig 2 ) également clivé au site unique EcoRI a été mis en présence de DNA chromosomique restreint afin de réaliser une ligation sur l'ensemble ( ligation : cfr paragraphe V. 5. de " Matériels et méthodes "). Le produit de la ligation a été soumis à des cellules compétentes. Les transformants ont été sélectionnés par leur résistance au chloramphénicol portée par le plasmide et la présence du

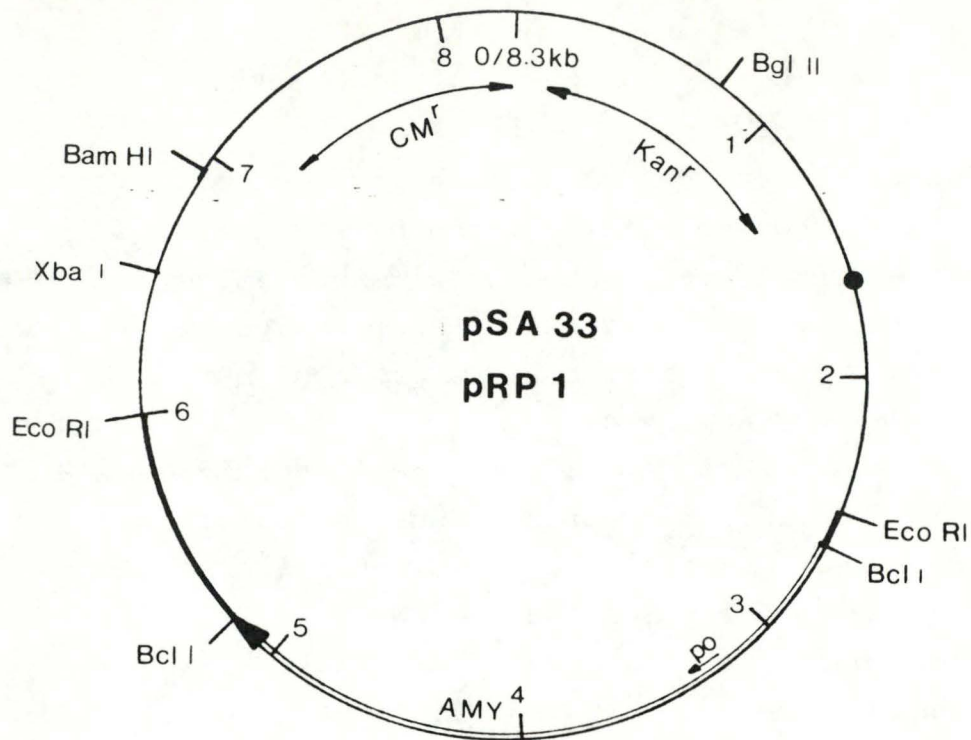


Fig 3 carte de restriction des plasmides pSA33 et pRP1 (8.3 kb)

- la ligne fine représente le DNA du pBD64  
(le cercle plein représente l'origine de réplication)
- la ligne double entourée des 2 morceaux de ligne épaissie représente le fragment EcoRI de 3.5 kb du DNA de Bacillus licheniformis des souches FDO2 et RPO1, respectivement pour le pSA33 et le pRP1
- la ligne double représente le fragment BclI de 2.5 kb suffisant pour l'expression du gène d' $\alpha$ -amylase (AMY) (l'orientation de l'insert est indiqué par la flèche)

$\underline{po}$  : emplacement du promoteur du gène d' $\alpha$ -amylase

$CM^r$  : marqueur de résistance au chloramphénicol

$Kan^r$  : marqueur de résistance à la kanamycine



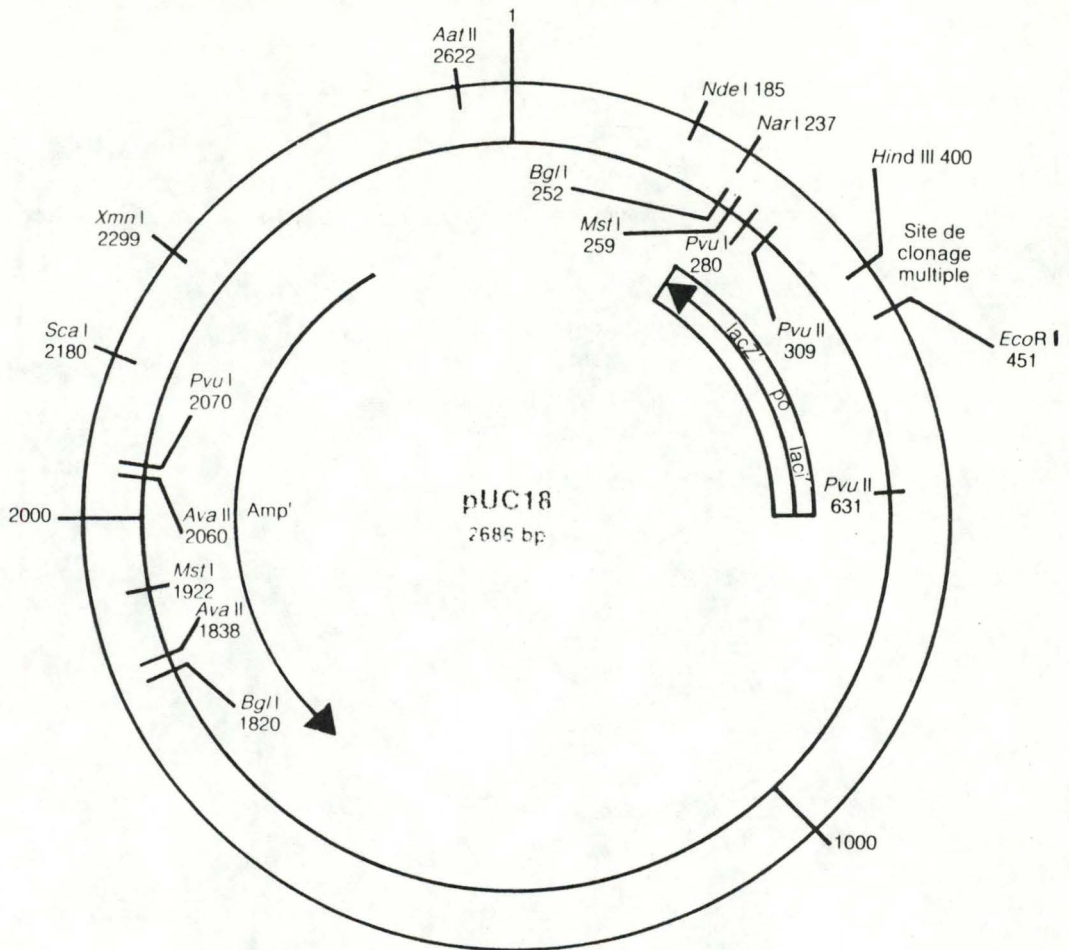


Fig 4 (a) carte de restriction du plasmide pUC18 (2.686 kb)  
 -les sites de restriction indiqués à l'intérieur du cercle clivent le plasmide en plusieurs endroits  
 -les sites de restriction indiqués à l'extérieur du cercle sont des sites uniques  
 -la flèche entourée d'une boîte représente une partie de l'opéron lactose  
     -lac I': gène délété qui codait au départ pour le répresseur  
     -po: promoteur et opérateur  
     -lac Z': partie du gène lac Z codant pour l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la β-galactosidase  
     -Amp<sup>r</sup>: marqueur de résistance à l'ampicilline

|       |     |     |     |       |     |      |     |     |      |     |      |      |       |      |     |     |        |      |     |      |         |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-------|-----|------|-----|-----|------|-----|------|------|-------|------|-----|-----|--------|------|-----|------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| pUC18 | 1   | 2   | 3   | 4     | 5   | 6    | (1  | 2   | 3    | 4   | 5    | o    | 7     | 8    | 9   | 10  | 11     | 12   | 13  | 14   | 15      | 16  | 17  | 18) | 7   | 8   |     |
|       | THR | MET | ILE | THR   | ASN | SER  | ser | ser | val  | pro | gly  | asp  | pro   | leu  | glu | ser | thr    | cys  | arg | his  | ala     | ser | leu | ala | LEU | ALA |     |
|       | ATG | ACC | ATG | ATT   | ACG | AAT  | TCG | AGC | TCG  | GTA | CCC  | GGG  | GAT   | CCT  | CTA | GAG | TCG    | ACC  | TGC | AGG  | CAT     | GCA | AGC | TTG | GCA | CTG | GCC |
|       |     |     |     | EcoRI |     | SstI |     |     | KpnI |     |      | XmaI | BamHI | XbaI |     |     | SalI   | PstI |     | SphI | HindIII |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |       |     |      |     |     |      |     | SmaI |      |       |      |     |     | AccI   |      |     |      |         |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |       |     |      |     |     |      |     |      |      |       |      |     |     | HincII |      |     |      |         |     |     |     |     |     |     |

Fig 4 (b) séquence nucléotidique du site multiple de clonage du pUC18 inséré en aval du promoteur et opérateur (po) ( d'après le catalogue GIBCO BRL ( sd ) )

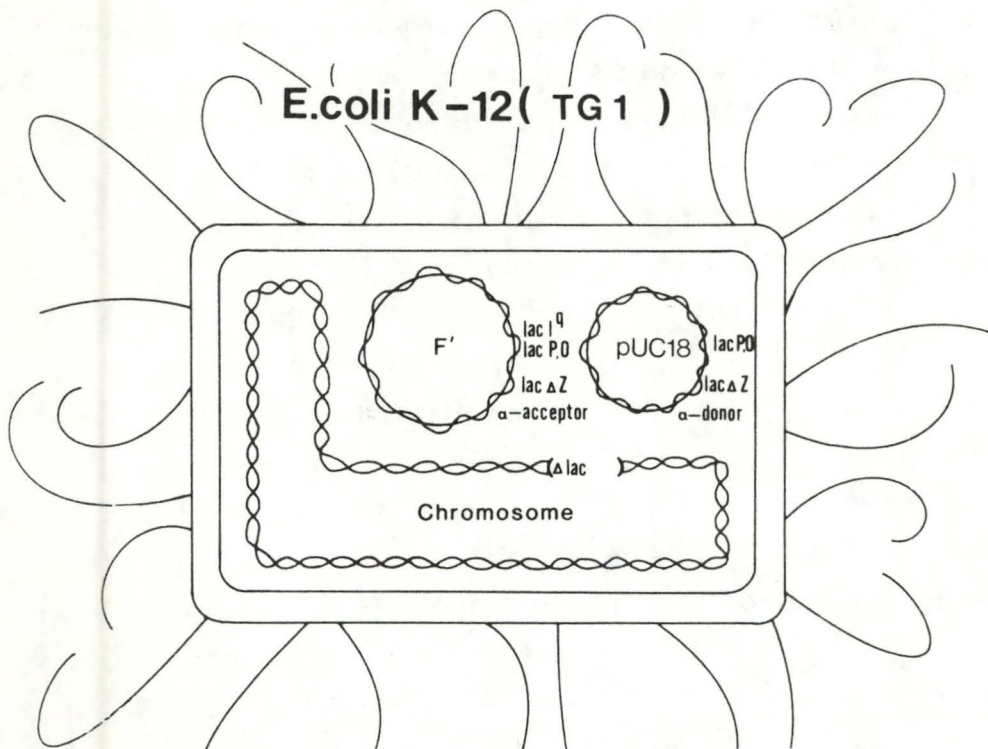
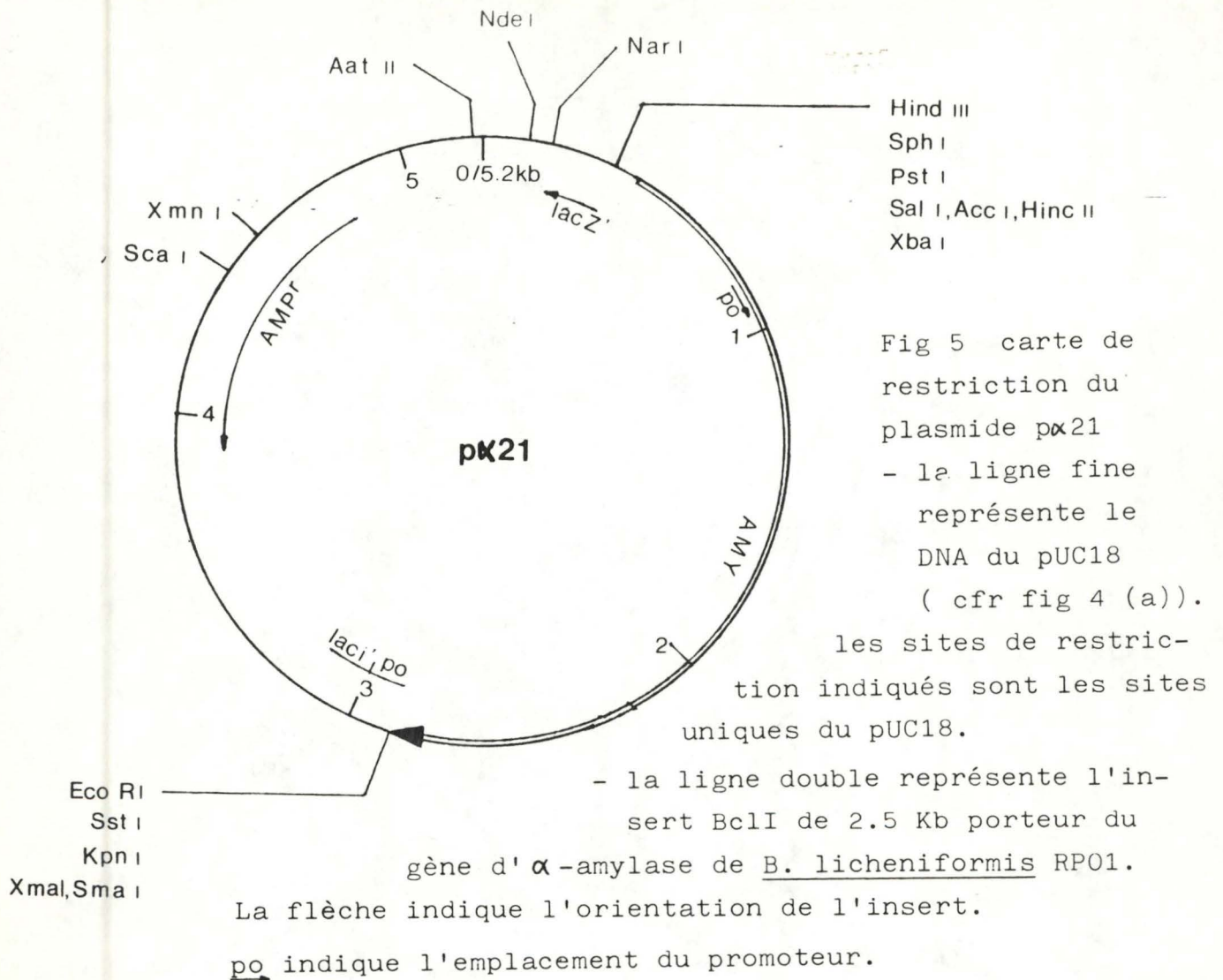


Fig 6 schéma de la composition génétique de la souche TG1 (pUC18) pour le système lac Z ( les filaments à la surface de la cellule représentent les pili sexuels codés par le facteur F'. )

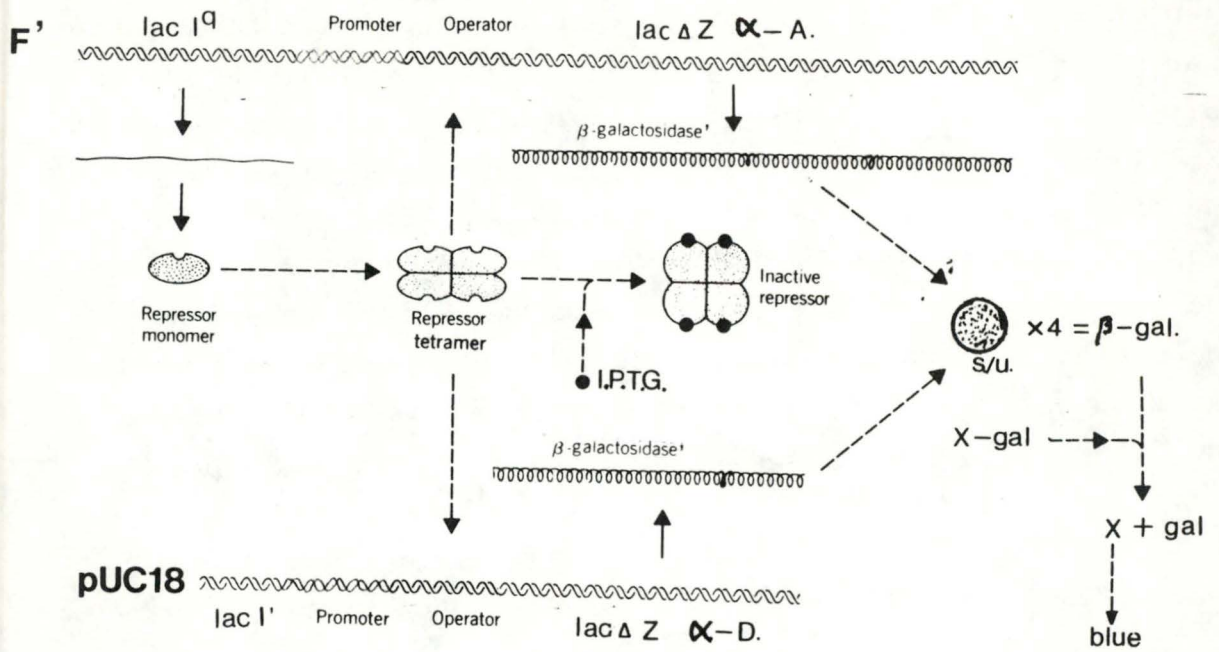
$\Delta$  = délétion ( d'après Rodriguez et Tait (1983) pg 11 )



gène d' $\alpha$ -amylase par un halo autour de la colonie ( cfr paragraphe V. 7. 1. de " matériels et méthodes "). Le plasmide résultant de de l'incorporation d'un fragment ECORI-EcoRI portant le gène de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis au site EcoRI du pBD 64 a été appelé pSA 33 et pRP 1 ( fig 3 ) respectivement pour le gène originaire de la souche FDO2 et de la souche RP01. Cet insert s'est avéré être de 3.5 Kb et ne pas être la taille minimum du gène. Au sein de cet insert se trouvent deux sites BclI encadrant une séquence de 2.5 Kb suffisante pour l'expression du gène ( Ortlepp et col.(1983)).

### II. 3. 2. 3. Clonage du gène chez E. coli

La séquence de 2.5 Kb du pRP1 a été également clonée dans un plasmide de petite taille, à haut nombre de copies par cellule de E. coli : le pUC 18 ( fig 4 (a)). Le clonage du fragment BclI-BclI au site Bam HI du site multiple de clonage du pUC18 (fig 4 (b)) a donné naissance au p $\alpha$ 21 (fig 5). Les sites Bam HI et Bcl I sont compatibles par une ligation, mais une fois réalisée, les deux sites sont perdus. La sélection des transformants s'est effectuée suivant le système Lac Z. Ce système nécessite trois composants ( fig 6 ). La souche délétée pour le gène Lac Z (  $\beta$ -galactosidase (  $\beta$ -gal ) ) de l'opéron lactose, le facteur F' qui possède la partie du gène codant pour la partie COOH-terminale de la  $\beta$ -gal ; le peptide produit est appelé  $\alpha$ -accepteur. Le facteur F' est également porteur du promoteur et de l'opérateur ( site de fixation du répresseur ) de l'opéron lactose, de même que le gène codant pour le répresseur ( Lac I<sup>q</sup> ) dont l'expression est amplifiée d'un facteur 10 par une mutation au niveau du promoteur de Lac I. Le troisième composant est le plasmide pUC 18. Il porte la partie lac Z codant pour la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la  $\beta$ -gal, le peptide produit étant appelé  $\alpha$ -donneur. Le pUC 18 porte le même promoteur et opérateur que le facteur F'. Le gène codant pour le répresseur est lui délété dans presque toute sa longueur et donc non fonctionnel ( Lac I' ). Ce système tel qu'il est présenté entraîne une répression de la



- Fig 7 principe du système lac Z ( décrit dans le texte )
- lac ΔZ α-A. : partie du gène lac Z codant pour la partie COOH-terminale de la β-galactosidase
  - lac ΔZ α-D : partie du gène lac Z codant pour la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la β-galactosidase
  - Δ = délétion
  - lac I<sup>q</sup> : gène codant pour le répresseur dont l'expression est amplifiée d'un facteur 10 par une mutation au niveau du promoteur
  - lac I' : gène codant pour le répresseur mais délété et donc inactif
  - S/U. : sous-unité de la β-gal. constituée par une α-complémentation entre le peptide α-donneur et le peptide α-accepteur, 4 sous-unités s'associent en une β-gal. active



production de  $\beta$ -galactosidase, le gène Lac I<sup>q</sup> étant constitutif pour la production de répresseur ( fig 7 ). Le système peut être induit par l'addition d' IPTG ( isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside ) ; cette molécule joue le rôle de l'inducteur vrai mais est non métabolisable. L'IPTG inactive le répresseur et empêche ainsi sa fixation sur l'opérateur du facteur F' et du pUC 18. Les deux peptides, l' $\alpha$ -donneur et l' $\alpha$ -accepteur s'associent en une sous-unité active. On parle d' $\alpha$ -complémentation (intragénique ). Quatre sous-unités s'associent en un tétramère et forment une  $\beta$ -galactosidase active.

L'activité  $\beta$ -galactosidase peut être mise en évidence par l'ajout au milieu d' un chromogène, le X-gal ( 5-bromo-4-chloro-3 indolyl- $\beta$ -D galactoside ) qui sous l'action de la  $\beta$ -galactosidase libère une substance bleue. La sélection lac Z intervient dans le système induit en présence de X-gal.

Lorsqu'une séquence est introduite au site multiple de clonage ( inclus en phase dans le gène lac Z et sans effet visible sur l'activité  $\beta$ -galactosidase ), la partie  $\Delta$ lac Z du pUC 18 est rompue et l'activité  $\beta$ -galactosidase perdue. Les colonies recombinantes seront dans ce cas dépourvues de couleur bleue ( Rodriguez et Tait (1983) pg 9-11 ).

### II. 3. 2. 3. Conclusion

Le choix de l'amylase s'est porté sur l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis pour différentes raisons. Premièrement, ce gène est facilement accessible car cloné dans des plasmides chez B. subtilis et E. coli. Il est relativement bien connu d'un point de vue génique. Il est d'origine bactérienne du groupe gram +, son clonage chez une autre bactérie gram + est moins problématique.

Il est probable qu'un autre gène serait plus adapté au contexte de l'ensilage. Ce gène pourrait coder pour une amylase travaillant à des pH plus bas, possédant un optimum de température inférieur et produisant plus de

glucose et de maltose. Cependant, il n'est pas exclu que l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis puisse se révéler satisfaisante au vu d'essais pratiques d'ensemencement.



### III. Streptococcus faecalis

#### III. 1. Classification

Le genre Streptococcus est classé dans la famille des Streptococcaceae avec les genres Pediococcus, Leuconostoc, Aerococcus et Gemella.

En 1937, Sherman a proposé la première classification systématique des streptocoques en quatre groupes principaux : pyrogenic, lactic, viridans et enterococcus. S. faecalis, S. faecium, S. avium se trouvèrent assimilés au groupe enterococcus. Depuis lors, la multiplication des tests biochimiques et immunologiques a mené à une révision des principaux groupes sur la base établie par Sherman. Une classification proposée par Dorothy Jones a assimilé S. faecalis dans le groupe des " streptocoques fécaux " avec les quatre autres espèces S. faecium, S. avium, S. equinus et S. bovis. Sherman avait classé au départ S. equinus et S. bovis au sein du groupe " viridans ". Le groupe des streptocoques fécaux est également souvent désigné comme le groupe streptococcal D. Ces cinq espèces possèdent le même antigène C de Lancefield ( polysaccharide pariétal ) classifié dans le groupe sérologique D ( Skinner et Quesnel (1978) pg 1-9 ). Très récemment, la classification des streptocoques fécaux a été revue où le nom de genre Streptococcus a été remplacé par enterococcus ( Schleifer et Kilpper-Bälz (1984)). Le genre Enterococcus a été divisé en neuf espèces distinctes : E. faecalis, E. faecium, E. durans, E. hirae, E. avium, E. gallinarium, E. casseliflavus, E. malodoratus et E. mundtiri (Williamson et col.(1986)).

#### III. 2. Caractéristiques morphologiques et structurales

S. faecalis est de forme ovoïde, les coques s'associent en chaînes de tailles diverses. Sur milieu solide,

les colonies sont de petite taille et à aspect blanc crayeux caractéristique ( lié à l'absence de pigments ). Les cellules ne se divisent que dans un seul plan et ne forment donc pas de tétrades. Il ne forme pas de spores et la structure de sa paroi est de type gram + .

### III. 3. Caractéristiques biochimiques

S. faecalis possède un métabolisme préférentiellement anaérobie mais a la possibilité de croître relativement vite en conditions aérobies sur un milieu bien adapté. Il est décrit comme étant aérobie facultatif ou anaérobie micro-aérophile. Il ne possède pas d'enzyme à groupement hémique, donc ni catalase ni cytochromes et est apparemment incapable de former de l'ATP via la chaîne de transport des électrons. Il a essentiellement un métabolisme de fermentation ( Skinner et Quesnel (1978) pg 51-52 ). Mais S. faecalis peut inclure l'oxygène dans son métabolisme sans nécessairement impliquer l'accumulation d' $H_2O_2$  ( Skinner et Quesnel (1978) pg 63 ). Il possède une flavoprotéine peroxydase et une pseudo-catalase non hémique qui lui permet de libérer une molécule d'eau par molécule de peroxyde d'hydrogène.

Il fermente le glucose et le fructose suivant la voie homofermentative en produisant l'isomère L (+) du lactate. Il fermente également d'autres hydrates de carbone, parmi lesquels : le galactose, le lactose, le maltose, le manitol, le sorbitol, le sucrose, le cellobiose et le mélèzitose ( Mc Donald (1981) pg 63 , Skinner et Quesnel (1978) pg 23 ). Il n'hydrolyse pas naturellement l'amidon, à l'opposé de S. bovis ( hôte habituel du rumen ).

Il est également apte à utiliser le glycérol en conditions aérobies et anaérobies. Il possède des exigences nutritionnelles pour 7 à 13 acides aminés et pour 5 vitamines du groupe B, ne dégrade que très peu les acides aminés ( sauf l'arginine qu'il utilise comme source d'énergie et la tyrosine qu'il décarboxyle en tyramine ( Mc Donald (1981) pg 64 et 73 ).



S. faecalis est un microorganisme très résistant. Il croît entre 10 et 45° C et peut survivre à un traitement thermique de 62° C pendant 30 minutes. Il peut également pousser sur un milieu contenant 6.5 % de NaCl, ou sur milieu contenant 0.05 % d' azide de sodium (  $\text{NaN}_3$  ) qui est un inhibiteur de la cytochrome oxydase. Comme les streptocoques n'en possèdent pas, leur développement aérobie n'est pas affecté par la présence de  $\text{NaN}_3$ . Il existe des sensibilités différentes à l'azide de sodium, S. faecalis et S. faecium possédant le seuil d'inhibition de croissance le plus élevé. Le test de croissance sur 0.05 % de  $\text{NaN}_3$  permet de séparer les enterocoques des autres streptocoques ( Skinner et Quesnel (1978) pg 372-373)). De nombreuses souches rencontrées sont très résistantes aux antibiotiques, rendant ainsi parfois difficile le traitement de l'endocardite entérocoquale ( Davis et col.(1970) pg 724 ).

### III. 4. Considérations pratiques

La souche de S. faecalis utilisée dans ce travail n'a pas été sélectionnée sur des critères définis pour une utilisation dans l'ensilage. La sélection d'une souche sauvage compétitive, possédant des exigences faibles en acides aminés, produisant le maximum d'acide lactique, travaillant aux pH les plus bas , et se prêtant le mieux aux méthodes industrielles de fermentation et de conditionnement devra être réalisée. La souche utilisée dans ce travail est la souche OG1X ( sans activité protéolytique sur la gélatine ). Elle a été choisie afin de faciliter l'accès à la méthode génétique de transformation mise au point par Wirth et col. (1986)

#### IV. But du travail

Les aptitudes biochimiques et physiologiques de S. faecalis en font un " starter " de fermentation intéressant dans la perspective de son utilisation dans l'ensilage. Il produit des quantités importantes d'acide lactique L (+) par la voie homofermentative avant même que les conditions anaérobies soient instaurées, et ceci jusqu'au pH 5. Il ne lui manquait plus que d'être compétitif via une source complémentaire en sucres, qui dans la perspective d'un additif d'ensilage doit être la moins coûteuse possible. Cette source potentielle de sucres, l'amidon, ne peut lui être accessible que s'il possède l'enzyme, dans ce cas une amylase, pour le dégrader. Jusqu'à il y a peu, le clonage de gènes chez S. faecalis était inaccessible par la technique courante de transformation génétique directe par du DNA exogène. Cette méthode a été mise au point récemment par Wirth et col. (1986) pour S. faecalis et a permis de rendre ce type de projet réalisable.

Dans la perspective du clonage du gène de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis chez S. faecalis, deux approches pouvaient être envisagées : soit cloner le gène au sein d'un plasmide maintenu à l'état autorépliatif chez S. faecalis, soit le cloner dans un plasmide d'intégration, plasmide qui permet au gène de s'insérer définitivement au niveau chromosomique. C'est la première approche qui a été envisagée dans ce travail. Le clonage présentait deux inconnues : l'expression du gène et l'exportation de son produit.



C H A P I T R E   I I

M A T E R I E L S   E T   M E T H O D E S

---

tableau I : liste des souches bactériennes

| Souches            | Marqueurs chromosomiques                                                                     | Marqueurs plasmidiques | Origines et références                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <u>E. coli</u>     |                                                                                              |                        |                                                                 |
| TG1                | $\Delta$ lacpro, supE, thi, hsdD5,<br>F' traD36, proAB, lac I <sup>q</sup><br>Z $\Delta$ M15 | /                      | Souche distribuée par<br>Amersham                               |
| DB11<br>(pVA838)   | F <sup>-</sup> , met, thi, gal, nal, rif,<br>hsdR, Em <sup>S</sup>                           | erm, cat               | Macrina et col.(1982)<br>Wirth et col.(1986)<br>Reque de Clewel |
| <u>B. subtilis</u> |                                                                                              |                        |                                                                 |
| PSL1<br>(pGKV2)    | arg, leu, thi, r <sup>-</sup> , m <sup>-</sup> , stp,<br>recE4                               | erm, cat               | Van der Vossen et col.<br>(1985)                                |
| 8G5<br>(pGK13)     | trp, tyr, his, ade, met,<br>rib, ura, mic                                                    | erm, cat               | Kok et col.(1984)<br>Reques de Kok                              |
| <u>S. faecalis</u> |                                                                                              |                        |                                                                 |
| OG1X               | str, gel                                                                                     | /                      | Wirth et col.(1986)<br>Reque de Clewel                          |

Les significations des symboles représentant les différents marqueurs sont reprises dans l'article de Bachman (1983) pour E. coli et de Piggott et Hoch (1985) pour B. subtilis.



## I. Souches

Les souches utilisées au cours de ce travail sont décrites dans le tableau I. La signification des symboles représentant les différents marqueurs chromosomiques sont repris dans l'article de Bachman ( 1983 ) pour E. coli et de Piggott et Hoch ( 1985 ) pour Bacillus subtilis.

Le travail de clonage a été réalisé avec la souche TG1 pour E. coli et la souche OG1X pour Streptococcus faecalis.

Les souches DB11 ( pVA 838 ), PSL1 ( pGKV2 ), 8G5 ( pGK 13 ) furent utilisées en tant que sources de plasmides pour les différents clonages.

## II. Milieux

### II. 1. Milieux de culture pour E. coli et B. subtilis

#### II. 1. 1. Milieu LB

Milieu complet utilisé pour la culture des bactéries soit en milieu solide soit en milieu liquide. La composition en poids par volume ( p/v ) d'eau distillée est la suivante: 1 % de bacto-tryptone ( Oxoïd ), 0.5 % de bacto-yeast extract ( Oxoïd ), 0.5 % NaCl. Si celui-ci est utilisé en milieu solide, 1.5 % de bacto-agar ( Oxoïd ) est ajouté. ( Maniatis et col.(1984) pg 68,70 )

#### II. 1. 2. Milieu 2xTY

Milieu riche utilisé en routine pour la culture de de bactéries en milieu liquide. La composition en p/v est la suivante : 1.6 % de bacto-tryptone ( Oxoïd ), 0.5 % de bacto-yeast extract ( Oxoïd ), 0.5 % NaCl. ( M13 cloning and sequencing Handbook (M13 c.s.H Amersham pg 47 )

Ces milieux sont rendus sélectifs par l'ajoute d'antibiotiques aux concentrations suivantes (  $\mu\text{g/ml}$  ) :

| Type de milieu | Souche    | Erythromycine<br>( Boehringer ) | Chloramphénicol<br>( Boehringer ) | Ampicilline<br>( Boehringer ) |
|----------------|-----------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Solide         | TG1       | 80-100                          | 10                                | 50                            |
|                | 8G5, pSL1 | 50                              |                                   | /                             |
| Liquide        | TG1       | 100                             | 20                                | 100                           |
|                | 8G5, pSL1 | 100                             |                                   | /                             |

### II. 1. 3. Milieu minimum M9/glucose

Milieu utilisé pour la croissance de la souche TG1, en vue de la préparation des cellules compétentes. Sa composition en p/v est la suivante : 0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 0.3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0.1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0.05 %  $\text{NaCl}$  ; 0.025 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0.0015 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0.2 % glucose ; 0.0337 % Thiamine HCl ( vit B1 ) ; 1.5 % minimal agar. ( M13 c.s.H pg 47 )

### II. 2. Milieux de culture pour *Streptococcus faecalis*

#### II. 2. 1. Milieu THB ( Todd Hewitt broth )

Milieu performant pour la croissance de *S. faecalis*. Celui-ci est utilisé en routine aussi bien pour la culture en milieu liquide que pour la culture en milieu solide. Les différents constituants du THB font partie d'un mélange complexe réalisé par le fabricant ( Oxoïd ). Le THB est ajouté à raison de 3 % en poids par volume d'eau distillée. Si celui-



ci est utilisé en milieu solide, 1.5 % de bacto-agar ( Oxoïd ) est ajouté. ( Wirth et col.(1986) )

Pour la culture en milieu sélectif, les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations suivantes : 50 µg/ml pour l'érythromycine, 20 µg/ml pour le chloramphénicol, 100 µg/ml pour la streptomycine ( Sigma ) et 500 µg/ml pour la kanamycine ( Boehringer ).

#### II. 2. 2. Milieu THB/ succinate de sodium

En milieu solide, celui-ci est utilisé pour la régénération des protoplastes de S. faecalis. La composition en p/v de ce milieu est la suivante : 3 % de THB ( Oxoïd ) ; 13.5 % de succinate de sodium ( Sigma, Mallinckrot ) ; 0.5 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ; 1 % glucose ; 0.01 % de SAB ( albumine de sérum bovin, Merck ) et 0.8 % de bacto-agar ( Oxoïd ).

En milieu liquide, celui-ci est utilisé pour le maintien des protoplastes lors de l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par les plasmides avant leur passage sur milieu sélectif. Sa composition en p/v est la suivante : 3 % de THB ( Oxoïd ) , 13.5 % succinate de sodium ( Sigma, Mallinckrot ) et 0.01 % SAB ( Merck ). Si la version solide du THB/succinate de sodium est utilisée comme milieu sélectif, les antibiotiques sont ajoutés dans les concentrations suivantes : 5 µg/ml pour l'érythromycine , 5 µg/ml pour le chloramphénicol. ( Wirth et col. 1986 )

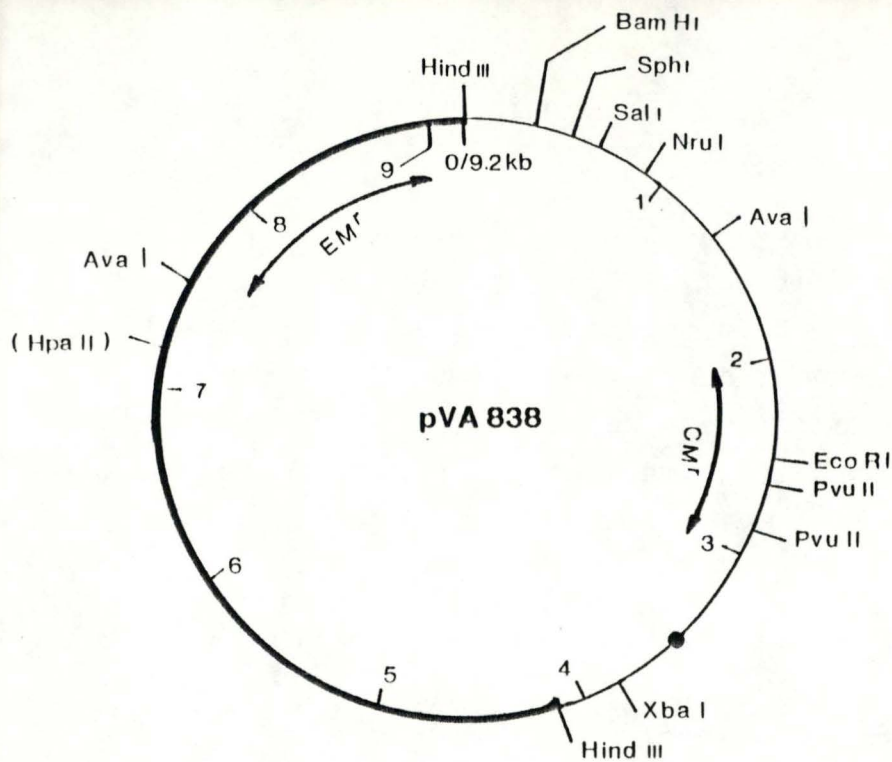


Fig 1 carte de restriction du plasmide pVA838 ( 9.2 Kb )

- la ligne épaissie représente le DNA du pVA749 ( 5.2 Kb )  
ce fragment porte le marqueur de résistance à l'érythromycine ( EM<sup>r</sup> )
- la ligne fine représente le DNA du pACYC184 ( 4 Kb )  
ce fragment porte le marqueur de résistance au chloramphénicol ( CM<sup>r</sup> )

le cercle plein représente l'origine de réplication du pACYC184 nécessaire à la multiplication du plasmide chez E. coli

( d'après la carte de restriction établie par Macrina et col. (1982))

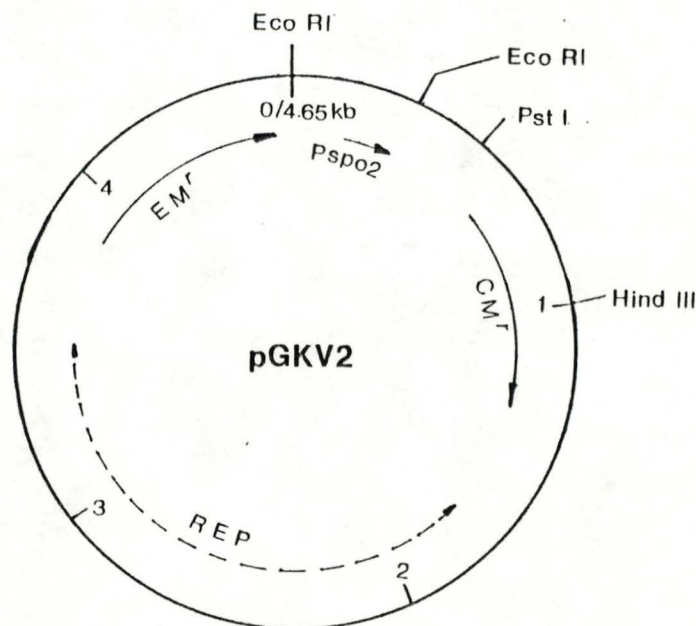


Fig 2 carte de restriction du plasmide pGKV2 ( 4.65 Kb )

- EM<sup>r</sup> : marqueur de résistance à l'érythromycine
- CM<sup>r</sup> : marqueur de résistance au chloramphénicol
- pSPO2 : promoteur du bactériophage SPO2
- REP : zone dans laquelle se situe l'origine de réplication issue du plasmide pW01

( d'après la carte de restriction établie par van der Vossen et col.(1985))



### III. Plasmides

#### III. 1. pVA 838

Ce plasmide a été construit par Macrina et col. ( 1982 ) ( fig 1 ). Ce vecteur est un plasmide navette capable à la fois de répllication chez E. coli, Streptococcus ferus ( Pouwels et col. (1985)), S. sanguis, S. faecalis ( Wirth et col. (1986)). Il consiste en un concaténaire de deux vecteurs autoréplicatifs : la pACYC 184 ( 4 Kb) de E. coli et le pVA 749 ( 5.2 Kb ) dérivé d'un plasmide de S. ferus. Chaque origine de répllication permet la multiplication du plasmide chimérique au sein de chaque hôte. Ses caractéristiques structurales et fonctionnelles sont les suivantes : sa taille est de 9.2 Kb, il porte deux marqueurs de résistance aux antibiotiques. Le marqueur de résistance au chloramphénicol, (  $CM^R$  ) apporté par le pACYC 184 dont le gène n'est exprimé que chez E. coli et le marqueur de résistance à l'érythromycine (  $EM^R$  ) apporté par pVA 749 dont le gène est exprimé chez tous les hôtes cités. Son nombre de copies par cellule est également déterminé par le type d'hôte. Pour les deux souches étudiées par Macrina, il est respectivement de  $8 \pm 0.9$  pour E. coli DB 11 et de  $15 \pm 1.1$  chez S. sanguis V 839.

#### III. 2. pGKV 2

Plasmide construit par Van der Vossen et col. ( 1985 ) ( fig 2 ). Ce vecteur est également un plasmide navette. Son spectre d'hôtes comprend E. coli, B. subtilis, Streptococcus cremoris, S. pneumoniae et S. lactis. Ce plasmide se différencie du précédent dans le sens qu'il ne possède qu'une seule origine de répllication fonctionnelle dans tous les hôtes précités. Cette origine de répllication provient d'un plasmide sans

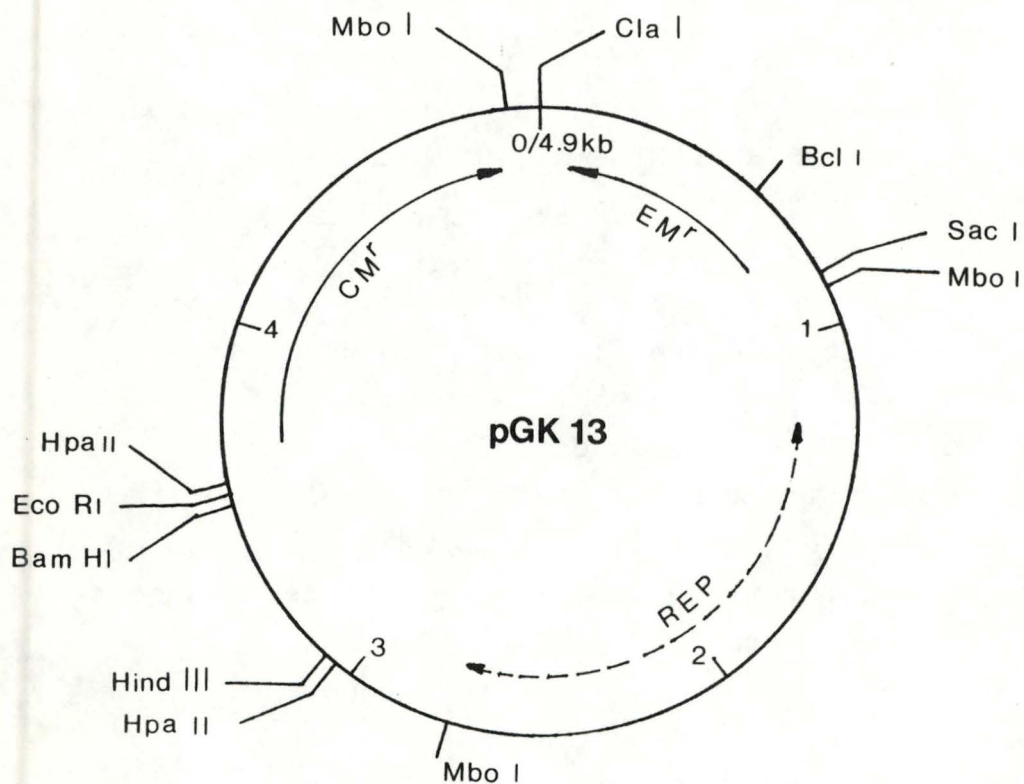


Fig 3 carte de restriction du plasmide pGK13 ( 4.9 Kb )  
 $CM^r$  = marqueur de résistance au chloramphénicol  
 $EM^r$  = marqueur de résistance à l'érythromycine  
 REP = zone dans laquelle se situe l'origine de  
 réplication issue du pW01  
 ( d'après la carte établie pour le pGK12 par Kok  
 et col.(1984))



fonction connue ( cryptique ), le PWO 1 natif de S. cremoris Wg 2. La taille de ce plasmide est de 4.65 Kb. Il porte deux marqueurs de résistance aux antibiotiques. Le marqueur chloramphénicol est issu de Bacillus pumilis ( Pouwels et col. (1985)). Le gène codant pour cette fonction est d'expression faible. Cette expression est amplifiée, par la présence en amont du gène, d'un promoteur de bactériophage SpO 2 ( pSPO 2 ) de Bacillus subtilis. Ce promoteur est compris dans un fragment de 0.3 Kb EcoRI-EcoRI ( cfr fig 2 ). Le gène de résistance à l'érythromycine est quant à lui issu d'un plasmide naturel de Staphylococcus aureus. Ces deux gènes de résistance sont exprimés dans tous les hôtes cités.

### III. 3. pGK 13

Plasmide construit par Kok et col. ( 1984 ) ( fig 3 ), du moins pour une construction fort proche, le pGK 12 qui ne diffère du pGK 13 que par l'absence d'un fragment HpAII-HpAII de 0.6 Kb portant les trois sites uniques EcoRI, BamHI et Hind III. Ce plasmide est fort proche du pGKV2, il possède la même origine de répllication et donc le même spectre d'hôtes. Sa taille est de 4.9 Kb. En ce qui concerne les gènes de résistance au chloramphénicol et à l'érythromycine, ils sont issus tous les deux de Staphylococcus aureus et sont exprimés tous les deux chez tous les hôtes cités.

Le nombre de copies est variable en fonction du type d'hôte. Certaines valeurs ont été déterminées par Kok pour le pGK 12 : 60 pour E. coli, 5 pour B. subtilis et 3 pour S. lactis.

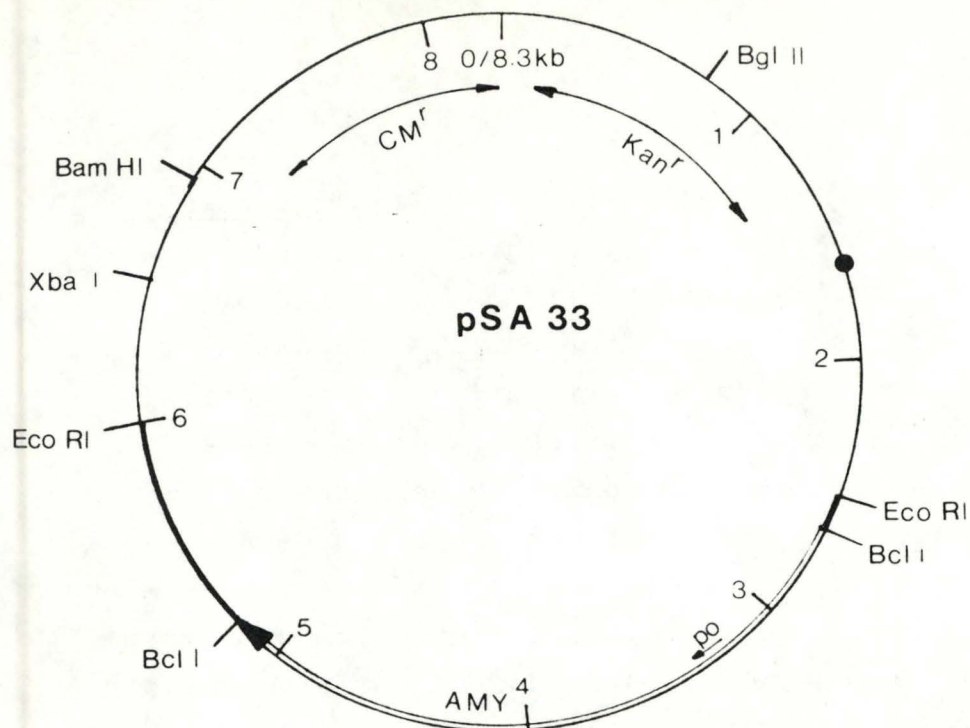


Fig 4 carte de restriction du plasmide pSA33 ( 8.3 Kb )  
 ( cfr description fig 3 présentée dans l'introduction  
 au parag. II. 3. 2. 2 )

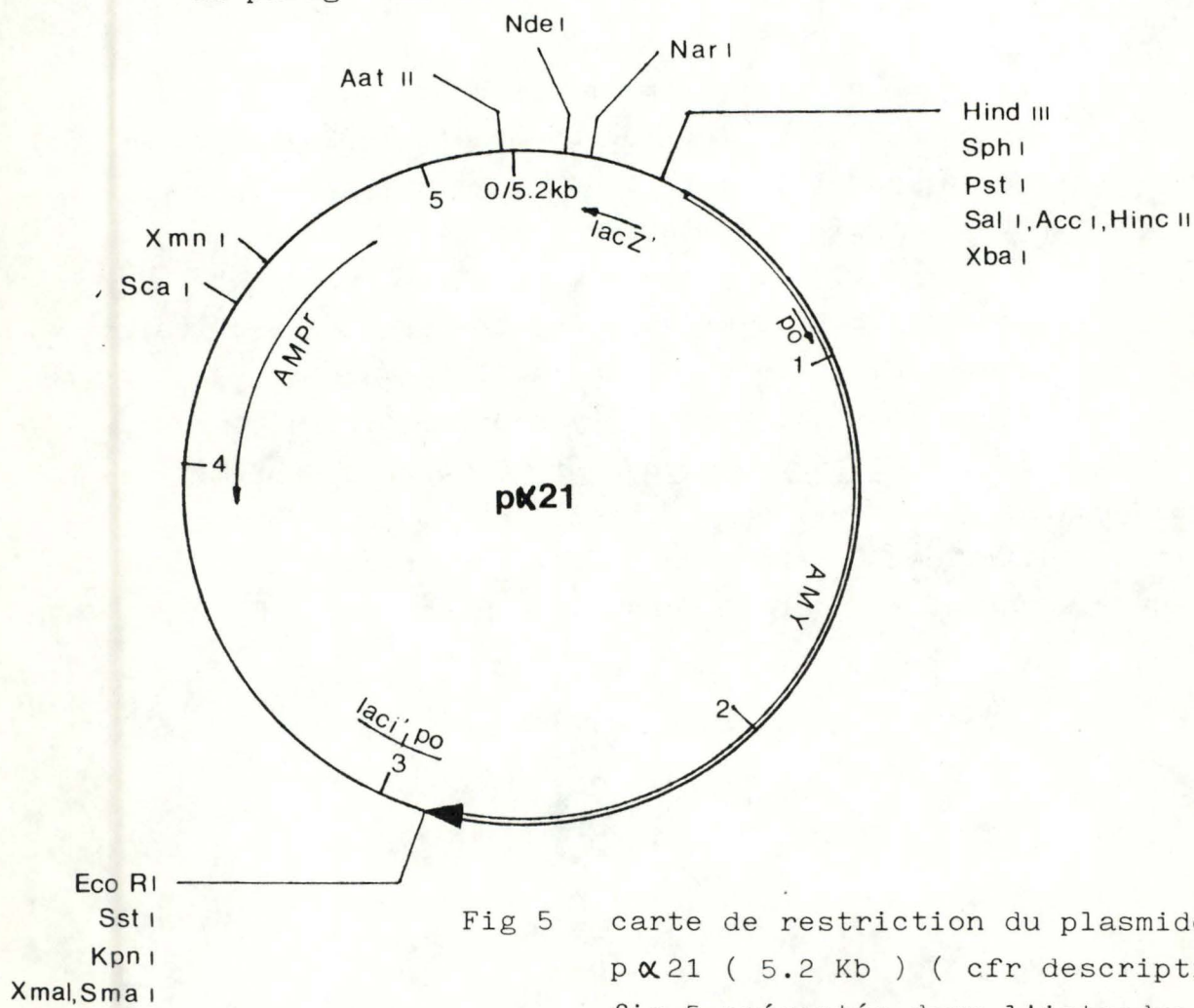


Fig 5 carte de restriction du plasmide  
 pK21 ( 5.2 Kb ) ( cfr description  
 fig 5 présentée dans l'introduction  
 au parag. II. 3. 2. 3 )



### III. 4. pSA 33

Les détails de sa construction ont été précisés dans l'introduction. Pour rappel, ce plasmide possède pour matrice le pDB 64 dans lequel a été cloné au site EcoRI le fragment EcoRI de 3.5 Kb comprenant le gène d' $\alpha$ -amylase de Bacillus licheniformis ( fig 4 ). Le pBD 64 est un dérivé du PUB 110 ( réplicon naturel de S. aureus ). Ce plasmide est couramment utilisé dans le clonage de gènes chez B. subtilis. Il possède deux marqueurs de résistance : la résistance à la kanamycine et la résistance au chloramphénicol ( le même gène de résistance que celui du pGK 13 ). Il faut également savoir que l'origine de répllication ( PUB 110 ) est fonctionnelle chez Clostridium acetobutilicum ( Lin et Blaschek (1984)). de même que le gène de résistance à la kanamycine.

### III. 5. p $\alpha$ 21

Les détails du clonage ont été donnés dans l'introduction. Pour rappel, le p $\alpha$  21 possède le fragment de 2.5 Kb porteur du gène d' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis ( BclI-BclI ), inséré au site BamHI du pUC 18 ( fig 5 ). Bien qu'une fois la ligation réalisée les deux sites soient perdus, il reste à proximité de chaque extrémité du fragment cloné de nombreux sites uniques. Ces sites sont bien disposés, permettant ultérieurement d'exciser le gène d' $\alpha$ -amylase et de le transférer dans d'autres vecteurs tels que le pGKV2, pGK13, pVA838.

Tableau II : récapitulation des caractéristiques  
des différents vecteurs.

|         | Taille  | Marqueurs                                              | Hôtes                                                                        |
|---------|---------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pVA 838 | 9.2 Kb  | EM <sup>r</sup> , CM <sup>r</sup> ( <u>E.coli</u> )    | <u>E. coli</u> , <u>S. sanguis</u><br><u>S. faecalis</u> , <u>S. ferus</u> . |
| pGKV 2  | 4.65 Kb | EM <sup>r</sup> , CM <sup>r</sup>                      | <u>E. coli</u> , <u>B. subtilis</u> ,                                        |
| pGK 13  | 4.9 Kb  | " "                                                    | <u>S. cremoris</u> , <u>S. lactis</u> ,<br><u>S. pneumoniae</u> .            |
| pSA 33  | 8.3 Kb  | Kan <sup>r</sup> , CM <sup>r</sup> , amyl <sup>+</sup> | <u>B. subtilis</u> , <u>C. acetobutilicum</u> ,<br><u>S. aureus</u> .        |
| pα 21   | 5.2 Kb  | Amp <sup>r</sup> , amyl <sup>+</sup>                   | <u>E. coli</u> .                                                             |

EM<sup>r</sup> : marqueur de résistance à l'érythromycine

CM<sup>r</sup> : marqueur de résistance au chloramphénicol

Kan<sup>r</sup> : marqueur de résistance à la kanamycine

Amp<sup>r</sup> : marqueur de résistance à l'ampicilline

amyl<sup>+</sup> : présence du caractère α-amylolytique



## IV. Les méthodes génétiques

### IV. 1. La transformation chez E. coli

Les bactéries ont été transformées par du DNA plasmidique, selon la méthode de Cohen, Chang et Hsu (1973 ). Les cellules peuvent être rendues " compétentes ", c'est à dire capables d'accepter du DNA plasmidique par un traitement au  $\text{CaCl}_2$ .

#### Préparation des cellules compétentes

Les bactéries sont d'abord cultivées pendant 24 à 36 heures sur milieu minimum M9/glucose limitant pour la proline. La souche TG1 a été rendue déficiente pour la synthèse de proline au niveau chromosomique ( cfr génotype  $\Delta$  pro ). Cette déficience est complétée par la présence des allèles correspondants sur le facteur F'. La souche ne peut donc pousser sur le milieu minimum M9/glucose que si le facteur F' est présent. La présence de celui-ci est requise pour la sélection lac Z décrite dans l'introduction. On ensemence le milieu liquide 2xTY avec une colonie isolée du milieu minimum M9/glucose. La culture est arrêtée en phase exponentielle ( DO 550 nm 0.3 ) et celle-ci est ensuite maintenue 10 minutes à 0° C. Les cellules sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 4000 g et resuspendues dans du  $\text{CaCl}_2$  0.05 M pour un volume équivalent à la moitié du volume de départ. Un nouveau lavage des cellules dans le  $\text{CaCl}_2$  est répété dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite maintenues 20 minutes à 0° C, centrifugées et resuspendues dans du  $\text{CaCl}_2$  0.05 M 15 % glycérol (v/v) pour un volume équivalent au dixième du volume de départ. La suspension est aliquotée et stockée à moins 70° C.

#### La transformation

Un volume de 0.2 ml de cellules compétentes est mis en présence de 0.01 à 0.5  $\mu\text{g}$  de plasmide dilué dans

0.01 ml de TE ( 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8 ). Le mélange est maintenu 40 minutes dans la glace et incubé 2 minutes précisément à 42° C. Celui-ci est ensuite dilué avec 1 ml de 2xTY et incubé 1 heure à 37° C pour permettre l'expression de la résistance aux antibiotiques. 0.02 et 0.1 ml du mélange sont étalés au râteau sur milieu LB contenant les antibiotiques prescrits.

#### IV. 2. La transformation chez *Streptococcus faecalis*

La méthode sera décrite en détail dans le chapitre III ( Résultats ) au paragraphe I.



## V. Les méthodes biochimiques

### V. 1. Préparation rapide de DNA plasmidique chez E. coli

Cette méthode a été développée par Holmes et Quigley ( 1985 ). Le DNA préparé selon cette méthode sera utilisé comme matériel de base pour toutes les expériences de clonage : transformation chez E. coli et S. faecalis, restriction et ligation ( décrite dans les paragraphes V. 4. et V. 5.). La méthode consiste en une lyse obtenue par une action combinée du Triton X 100, du lysozyme mais surtout par la température élevée ( 100° C ) à laquelle les cellules sont portées. La température élevée a pour effet une dénaturation des protéines, du DNA chromosomique et du RNA de haut poids moléculaire qui s'agrègent avec les débris membranaires en un précipité insoluble. Le DNA plasmidique n'est pas altéré par la température. Ceci est lié à sa petite taille par rapport au DNA chromosomique. Il est de ce fait moins sensible aux forces mécaniques de cisaillement et donc plus thermorésistant que le DNA chromosomique. Dans des conditions dénaturantes, une séparation totale des deux brins de DNA plasmidique n'est pas possible, la forme super-enroulée ( CCC ) du DNA plasmidique étant formée de deux brins circulaires solidaires l'un de l'autre. Le DNA chromosomique en solution est à l'état linéaire, la dénaturation a donc dans ce cas pour effet une séparation complète entre les deux brins. Lorsque les conditions renaturantes sont restaurées, le plasmide retrouve sa forme native, alors que le DNA chromosomique ne se réassocie que sur de courtes séquences d'homologie. En ce qui concerne le rôle du LiCl, il se marque lors de la centrifugation suivant la lyse. Le LiCl permet une séparation différentielle, où le plasmide reste en solution et le précipité est culotté.

Une mini-culture de 10 ml de 2xTY ( + antibiotique ) d'une souche possédant un plasmide est arrêtée en phase stationnaire. 3 ml sont centrifugés à la centrifugeuse eppendorf. Les cellules sont resuspendues violemment dans 0.2 ml de TELT ( 50 mM Tris HCl pH 8, 62.5 mM EDTA pH 8, 0.4 % triton X 100, 2.5 mM LiCl ). A cette suspension est ajouté 0.025 µg de lysozyme ( Boehringer ). Le mélange est porté pendant une minute précisément à 100° C et immédiatement après placé 5 minutes à 0° C. Ce mélange est ensuite centrifugé 15 minutes à la centrifugeuse eppendorf. Le surnageant est récupéré et ses constituants sont précipités avec deux volumes d'éthanol 100 % froid. La précipitation se poursuit 45 minutes à moins 70° C. La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à température ambiante à la centrifugeuse eppendorf. Le culot est alors séché sous vide et redilué dans du TE au volume désiré.

#### V. 2. Préparation rapide de DNA plasmidique chez S. faecalis et B. subtilis

La méthode utilisée est dérivée de celle de Ish-Horowicz et Burke (1981). Cette méthode est basée sur la dénaturation alcaline sélective du DNA chromosomique de poids moléculaire élevé alors que le DNA plasmidique reste double brin. Lors de la renaturation, le DNA chromosomique reste à l'état dénaturé et forme un agrégat insoluble. Le plasmide reste intact en solution.

5 ml d'une culture ( avec antibiotique ) est prélevée en phase stationnaire. Les cellules sont récupérées par une centrifugation à la centrifugeuse eppendorf. Elles sont resuspendues dans 0.2 ml de 2 % glucose, 50 mM Tris HCl, 25 mM EDTA pH 8 contenant 0.6 mg de lysozyme et 0.1 mg de RNase pancréatique ( Sigma ) dépourvue d'activité DNAsique



par un traitement à 100° C pendant 15 minutes. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37° C. Le lysozyme a pour effet une dégradation de la paroi. Les protoplastes formés lysent et la RNase dégrade partiellement le RNA de poids moléculaire élevé. Après la lyse, 0.2 ml d'une solution fraîche SDS 1 % dans du NaOH 0.2 N est ajoutée et gardée 10 minutes à 0° C. On ajoute ensuite 0.15 ml d'une solution saline, 30 % (p/v) acétate de potassium dans de l'eau distillée ( pH 5 ). Le mélange est agité très doucement à ce stade afin de ne pas dissocier la masse glaireuse résultant de la précipitation des protéines, du DNA chromosomique et du RNA de haut poids moléculaire. La précipitation est poursuivie 10 minutes à 0° C. La suite des manipulations ( centrifugations et précipitation à l'éthanol ) est réalisée comme pour la préparation rapide chez E. coli.

### V. 3. Extraction au phénol/chloroforme

L'extraction au phénol/chloroforme a pour rôle de déprotéiniser les préparations où les protéines s'avéreraient néfastes dans la suite des manipulations. Ainsi toutes les préparations rapides de DNA plasmidique seront systématiquement déprotéinisées afin d'éliminer les traces éventuelles d'activité DNAsique, de faciliter l'action des enzymes de restriction dont l'action pourrait être limitée par la présence de protéases endocellulaires et de faciliter la visualisation des bandes de DNA sur gel d'agarose.

La méthode est dérivée de celle proposée par Maniatis et col. ( 1984 ) ( pg 458 ). La mixture dénaturante est constituée de 49 % (v/v) de phénol distillé sous vide ( afin d'éliminer les composés oxydés néfastes pour le DNA ), 49 % (v/v) de chloroforme, 2 % (v/v) d'alcool isoamylique et 0.05 % (p/v) de 8-hydroxyquinoline.

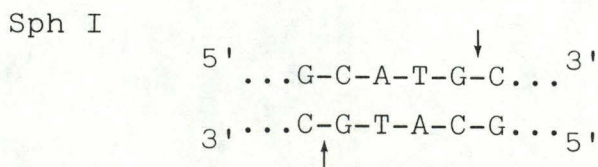
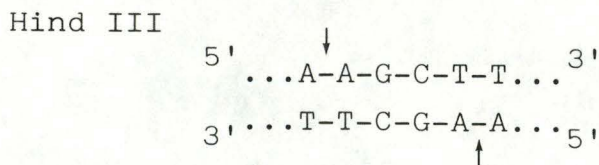
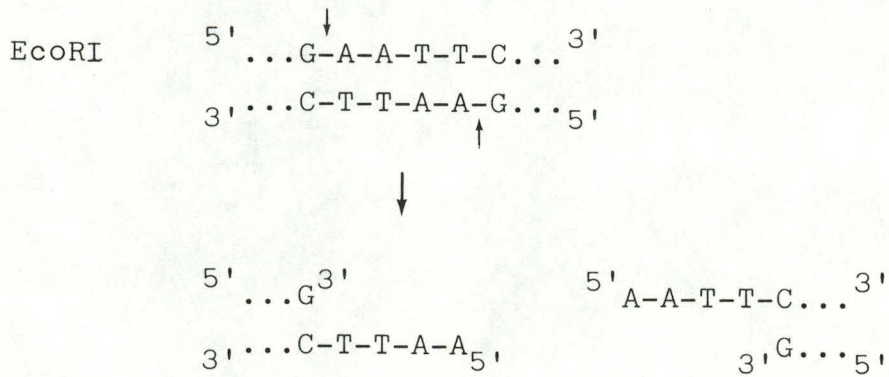
La mixture est saturée avec du TE pH 8. La combinaison chloroforme/phénol a un effet synergique déprotéinisant ( Maniatis et col. (1984)). De plus, le chloroforme limite le transfert de la phase aqueuse dans la phase organique. L'alcool isoamylique a pour rôle d'éviter la formation de mousse et de faciliter la séparation des deux phases. En ce qui concerne la 8-hydroxyquinoline, elle joue un rôle entre autres d'antioxydant ( Stewart et col. (1977), pg 341-342 ).

La mixture dénaturante est mélangée à égal volume avec la solution de DNA. Les deux phases sont mélangées jusqu'à la formation d'une émulsion stable. Les deux phases sont séparées par une centrifugation de 5 minutes à la centrifugeuse eppendorf. La phase aqueuse supérieure est récupérée au moyen d'une micropipette en évitant de s'approcher trop près de l'interface où stagne une partie des protéines à l'état dénaturé. Afin de permettre une meilleure récupération du DNA, l'interface et la phase organique sont " réextraites " comme suit : un égal volume de TE ( pH 8 ) est ajouté à la phase organique et à l'interface. L'opération est répétée comme précédemment. La phase aqueuse est récupérée et additionnée à la précédente. Les traces de solvants organiques transférés dans la phase aqueuse sont éliminés par une extraction à l'éther : 4 volumes d'éther diéthylique saturé en eau sont ajoutés à la phase aqueuse . On mélange jusqu'à émulsion. On laisse se séparer les deux phases pendant une minute et on élimine la phase organique supérieure. L'opération est répétée deux fois. Le DNA est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid et 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 4.6. La précipitation est poursuivie 45 minutes à moins 70° C. On centrifuge à la centrifugeuse eppendorf pendant 30 minutes à 4° C. Le culot est séché sous vide et resuspendu dans de l'eau ou du TE ( pH 8 ) au volume final désiré.



#### V. 4. Réactions de restriction

Le DNA plasmidique peut être clivé in vitro par des enzymes de restriction ( endonucléases spécifiques ) reconnaissant des sites spécifiques sur le DNA.



Le tampon utilisé pour les restrictions dans ce travail est de force ionique moyenne : 50 mM NaCl, 10 mM Tris-Hcl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothréitol ( DTT ). ( Maniatis et col. ( 1984) )

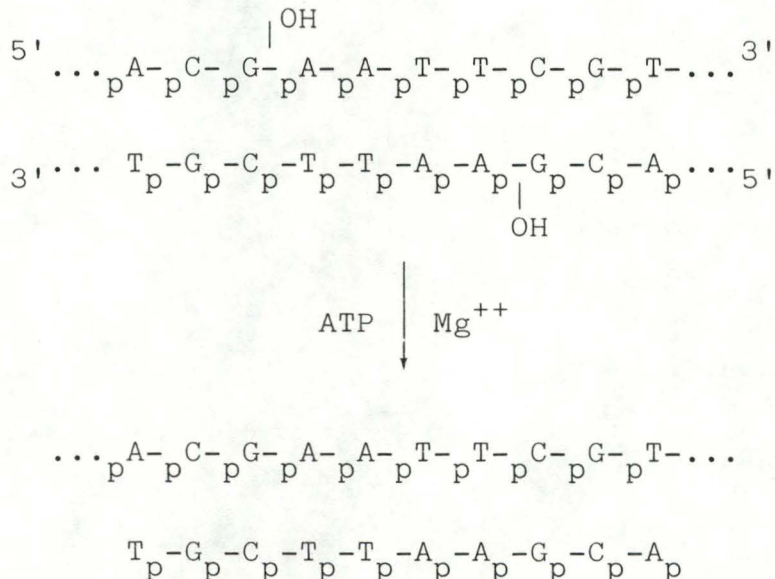
Ce tampon est compatible avec les enzymes suivants : Hind III, Sph I, EcoRI ( Boehringer ). La réaction type s'effectue dans un volume final de 20 µl, où 0.5 à 1 µg de DNA plasmidique dilué dans 10 µl de TE ( pH 8 ) est ajouté à 2 µl de tampon de restriction et à l'équivalent de 5 unités enzyma-

tiques d'enzyme de restriction soit 1 à 2  $\mu\text{l}$ . On ajuste le volume à 20  $\mu\text{l}$  avec de l'eau stérile. On incube de 3 à 15 heures à 37° C. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes à 70° C pour une durée de 5 à 10 minutes.

Pour tester l'efficacité de la restriction, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose. Si celle-ci s'avère partielle, une même quantité d'enzyme est rajoutée et le temps d'incubation est prolongé d'une durée équivalente à la précédente.

#### V. 5. Réaction de ligation

L'enzyme utilisée est la T4 DNA ligase. Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre les extrémités adjacentes 3'-OH et 5'-P du DNA ( Maniatis et col. (1984) pg 146 ). Les ligations ont été réalisées entre des fragments de DNA double brin dont les extrémités monocaténaïres pour un des deux brins s'apparient par complémentarité entre bases, générant sur chacun des deux brins une liaison phosphodiester à reformer ( cfr fig ci-dessous ).





La ligation est effectuée sur du matériel complètement restreint et extrait au phénol/chloroforme, ceci afin d'éliminer toute trace d'activité endonucléasique. La précipitation à l'éthanol suivant l'extraction au phénol permet de diminuer la molarité en sels de la mixture de restriction. Pour les ligations réalisées au cours de ce travail, les plasmides restreints sont mis en quantité équivalente. Dans chaque réaction de ligation, les fragments sont au nombre de quatre. Le produit de la ligation recherché, après transformation, sera sélectionné en fonction des marqueurs portés respectivement par chacun des deux fragments.

Le tampon de ligation est le suivant : 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP.

La réaction type est la suivante pour un volume final de 20 µl : 5 µl de plasmide A restreint ( 250 µg ), 5 µl de plasmide B restreint ( 250 µg ), 2µl de tampon de ligation 10 x, 1 µl de T4 ligase ( 1 unité enzymatique ).

Le volume est complété à 20 µl avec de l'eau stérile.

La mixture est incubée à 14° C pendant 16 heures ( M13 s. c. H Amersham pg 24 ).

#### V. 6. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium a été décrite par Sharp et col.(1973) Au cours de ce travail, les électrophorèses furent réalisées avec des minigels d'agarose ( 52 x 75 mm ou 75 x 105 mm ). Les minigels ont l'avantage de donner une réponse plus rapide après chaque étape du protocole de clonage. Ceux-ci seront utilisés après chaque préparation rapide de DNA. Ceci afin de vérifier la pureté relative du DNA plasmidique et d'estimer approximativement, en fonction de l'intensité des bandes, la quantité de DNA déposé sur le gel.

La méthode est également utilisée systématiquement pour séparer les fragments de DNA produits par le traitement avec les enzymes de restriction.

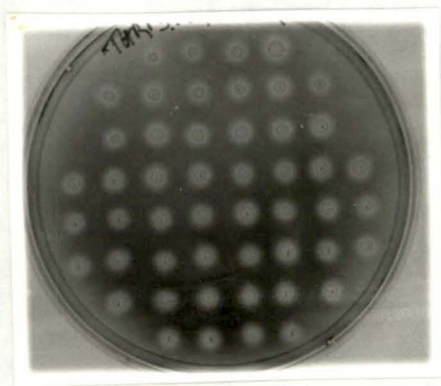
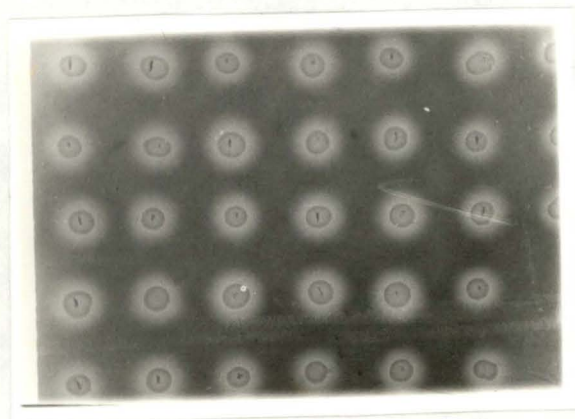
0.8 % d'agarose est dissous par chauffage et ébullition dans le tampon d'électrophorèse TBE ( 0.089 M Tris-borate; 0.089 M acide borique, 0.002 M EDTA ( Maniatis et col. (1984) pg 454)). La solution est refroidie à 50° C et coulée dans le support en présence du peigne. La dimension des crénaux est choisie en fonction de la quantité à déposer. Après refroidissement du gel, le peigne est enlevé, le support est déposé dans l'appareil à électrophorèse horizontal ( Pharmacia ). Le gel est submergé par du tampon TBE et les échantillons déposés dans les crénaux. Pour faciliter le dépôt des échantillons, on ajoute une solution alourdissante ( solution 6 x : 40 % glucose, 0.025 % (p/v) bleu de bromophénol ( Maniatis et col. (1984) pg 455)). Le bleu de bromophénol permet de suivre la migration des échantillons. L'électrophorèse s'effectue à 60-80 volts pendant une à deux heures.

#### Détection des bandes de DNA sur le gel

L'électrophorèse est arrêtée lorsque la trace bleue du bromophénol a atteint les trois quarts de la longueur du gel. Une électrophorèse plus longue pourrait entraîner la perte de petits fragments de DNA.

Pour détecter les bandes, le gel est immergé une heure dans de l'eau additionnée de 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium. Le bromure d'ethidium s'intercale entre les bases de DNA. Le complexe résultant possède une fluorescence accrue par rapport au bromure d'ethidium en solution. La fluorescence est stimulée par illumination aux ondes moyennes ( 302 nm ) du spectre UV. La lumière ultraviolette illumine le gel par transmission directe à travers celui-ci ( transilluminateur TM 40 UVP, inc ).





Mise en évidence de halos de dégradation de l'amidon par  
une coloration aux vapeurs d'iode d'un milieu amidon  
0.2 % (p/v)

Estimation de la taille des fragments de restriction en fonction de leur mobilité sur gel d'agarose

Cette méthode graphique permet d'établir une relation entre la taille des fragments de DNA ( en kilobases Kb ) et leur mobilité sur un gel d'agarose. On exprime graphiquement le log. de la taille en fonction de la mobilité relative. Cette relation est linéaire pour les fragments entre 1 et 10 Kb.

Pour établir la courbe d'étalonnage; les fragments du bactériophage  $\lambda$  CI 857 Sam 7 ( Boehringer ) clivés par Hind III sont utilisés. Les fragments obtenus ont les tailles suivantes : 23.13 Kb, 9.42 Kb, 6.56 Kb, 4.36 Kb, 2.32 Kb, 2.03 Kb, 0.56 Kb et 0.125 Kb.

V. 7. Détection de l'activité amylase

V. 7. 1. Détection par coloration aux vapeurs d'iode

Ce test est utilisé pour détecter directement sur boîte de pétri les colonies  $\alpha$ -amylase positives. Pour permettre ce test, de l'amidon soluble ( Merck ) est additionné au milieu à raison de 0.2 % (p/v). Quelques cristaux d'iode sont déposés dans une boîte de pétri vide. La boîte de pétri avec 0.2 % d'amidon incorporé au milieu est retournée sur la boîte vide. Les vapeurs d'iode colorent en moins d'une minute l'amidon intact en bleu. Les colonies exprimant l' $\alpha$ -amylase sont entourées d'une zone de décoloration ( halo ), mettant ainsi en évidence la digestion de l'amidon par l'enzyme. ( fig ci-contre )

V. 7. 2. Dosage de l'activité amylase par le test au DNS

La méthode exposée ci-dessous est une adaptation de K. Willemot ( Unité de génétique, UCL ) d'une méthode décrite par Fisher et Stein (1961).



Les amylases clivent l'amylose en oligosaccharides. Les sucres réducteurs sont détectés par spectrophotométrie à une densité optique de 540 nm grâce à la coloration au DNS ( acide dinitro salicylique ).

La solution d'amylose 10 % contient 1 gr d' amylose ( Merck ) dans 7 ml de DMSO ( diméthylsulfoxyde ) ; la suspension est bien agitée et chauffée au bain-marie ( 100° C ) en agitant pendant 30 minutes. Quand la solution est refroidie, le volume est ajusté à 10 ml avec du DMSO ( Griffin et Fogarty (1973)). La solution sera diluée 10 fois dans du tampon Tris-HCl 10 mM ( pH 7.5 ) avant usage. La solution DNS contient 1 gr de DNS dans 16 ml de NaOH 10 % et 30 gr de sel de Rochelle ( tartrate de sodium et potassium tetrahydrate ) dans 50 ml d'eau stérile. Les suspensions se dissolvent en chauffant la solution à 100° C. La solution est ajustée à 100 ml avec de l'eau stérile.

La méthode de travail est la suivante : pour chaque expérience, on prépare deux tubes " contrôle " et un tube " substrat " ; pour chaque échantillon, on prépare un tube " enzyme " et un tube " réaction " ;

- le tube "contrôle" contient 400 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.5;
- le tube " substrat " contient 200 µl d'amylose 1 % et 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.5;
- le tube " enzyme " contient 200 µl d'extrait enzymatique et 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.5;
- le tube " réaction " contient 200 µl d'extrait enzymatique et 200 µl d'amylose 1 %.

Les préparations s'accomplissent dans la glace. La réaction est déclenchée lorsque les tubes sont incubés à 50° C pendant 10 minutes. Pour arrêter cette réaction, les tubes sont placés dans la glace et 400 µl de solution DNS sont ajoutés. Le DNS est un colorant spécifique des sucres réducteurs. La coloration s'effectue pendant 5 minutes à 100° C. La densité de coloration se mesure au spectrophotomètre à 540 nm avec, comme références, les deux tubes " contrôle ", ayant subi le même traitement que tous les autres tubes.

Tous les sucres réducteurs présents dans le mélange réagissent à la coloration au DNS. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de mesurer la quantité de sucres réducteurs contaminant l'extrait enzymatique. Cette valeur doit être soustraite de la valeur réelle. On utilise comme références pour tracer la droite d'étalonnage, des solutions de maltose à des concentrations connues. D'après la droite d'étalonnage, la valeur mesurée en unités d'absorption à 540 nm peut être convertie en mg maltose/10 minutes ou en U/ml/min. Une unité enzymatique ( U ) est définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 mg de sucres réducteurs (avec maltose comme référence ) par minute et ceci pour un temps d'action ou une concentration en enzyme où la réaction reste linéaire.



C H A P I T R E    I I I

R E S U L T A T S    E T    D I S C U S S I O N

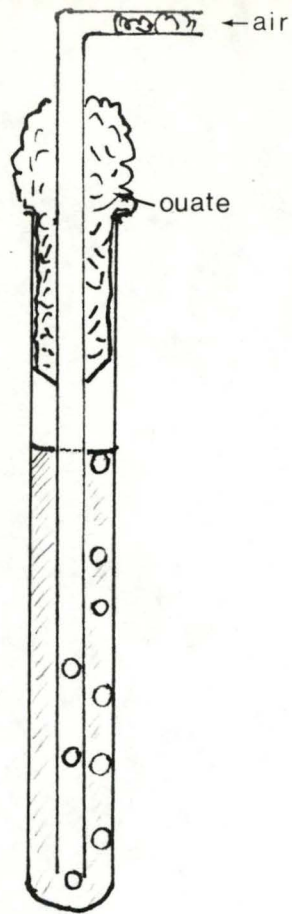


Fig 1 : " bubblers " : système utilisé pour la culture de bactéries en milieu liquide

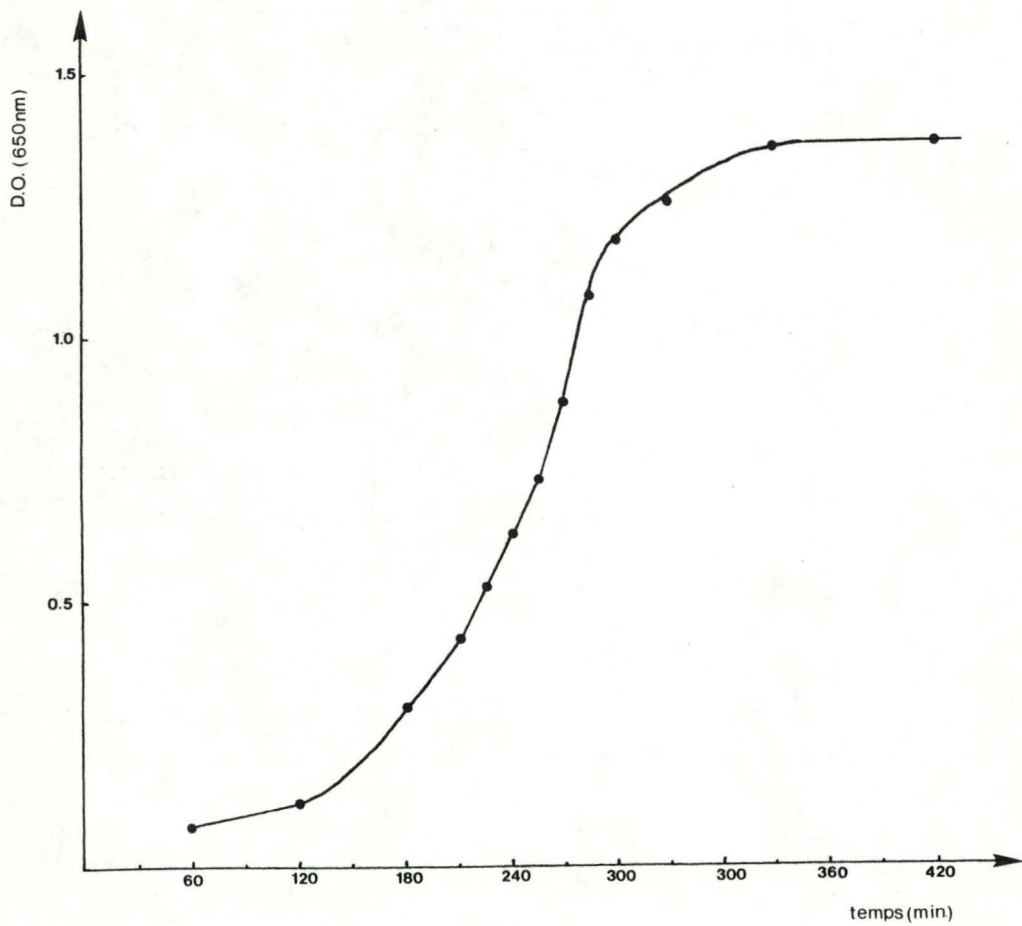


Fig 2 : courbe de croissance de la souche S. faecalis OG1X



## I. La transformation chez S. faecalis

### I. 1. Préparation des protoplastes de OG1X

#### I. 1. 1. établissement de la courbe de croissance en milieu complet THB

Une culture de 20 ml de THB estensemencée avec la souche OG1X et incubée à 37° C. L'agitation est assurée par l'apport régulé de bulles d'air à la base du tube dans un système appelé " bubbler " ( fig 1 ). A des intervalles de temps successifs, 0.8 ml de culture est prélevé et placé dans une cuvette en Quartz. La mesure de DO est réalisée à 650 nm contre du milieu THB frais. La courbe établie est présentée à la fig 2. Le temps de génération en phase exponentielle est d'une heure . Le plateau de la phase stationnaire se situe à une DO de 1.35.

#### I. 1. 2. Préparation des cellules glycinées

La glycine est incorporée au milieu afin de faciliter l'action ultérieure du lysozyme sur la paroi. La glycine remplace en partie la D-alanine dans le peptidoglycan basal de la paroi bactérienne et donc limite les ponts d'acides aminés qui relient les chaînes polymérisées de N-acétyl glucosamide et d'acide N-acétyl muramique ( fig 3 ) ( Hopwood (1981)). Le contenu en glycine pour chaque souche doit être testé car il influence de manière importante l'efficacité de formation des protoplastes. Le pourcentage optimal de glycine pour la souche OG1X a été déterminé par Wirth et col., il est de 2 % .

Une culture de THB 2 % glycine ( Sigma ) portée initialement à pH 7 à 7.5 avec du NaOH est arrêtée en phase stationnaire. La glycine limite la croissance de la culture, le plateau de la phase stationnaire ne se situe plus qu'à une DO ( 650 nm ) de 0.67 ( après 30 heures ).

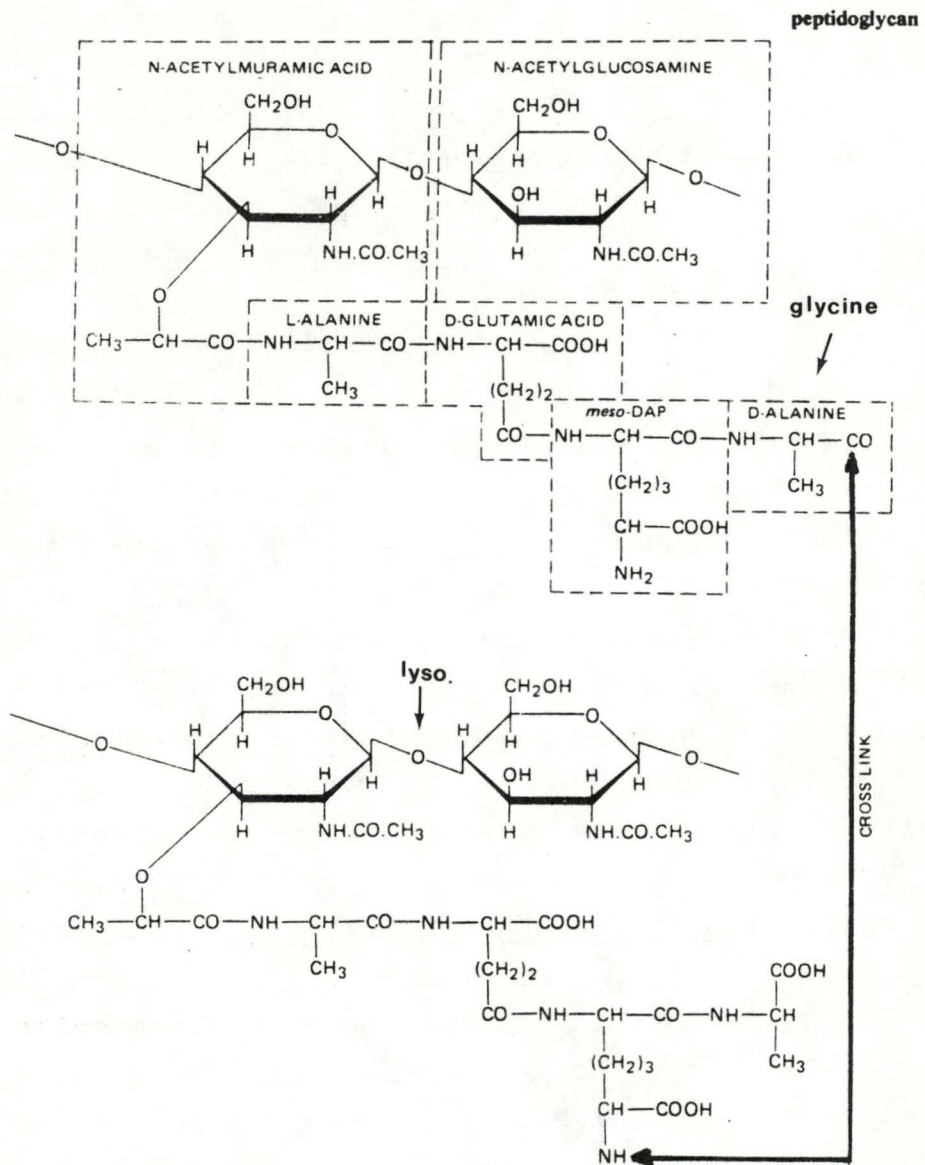


Fig 3 : structure du peptidoglycan basal des parois bactériennes.

- la culture de bactéries en présence de glycine entraîne une substitution partielle de la D-alanine par celle-ci
  - le lysozyme entraîne une rupture des liaisons entre l'acide N-acétyl muramique et le N-acétyl glucosamide
- ( d'après Depelchin (1984))



1 ml de cette préculture est inoculé à 600 ml de THB 2 % glycine. La croissance est arrêtée à une DO ( 650 nm ) comprise entre 0.15 et 0.2. L'arrêt de la croissance au début de la phase exponentielle est nécessaire car seules les cellules prélevées à ce moment sont susceptibles d'être protoplastées avec une efficacité supérieure à 99 % ( Wirth et col. (1986)).

Ces 600 ml de culture sont centrifugés à 6000 Rpm pendant 15 minutes dans le rotor HS4 de la centrifugeuse Sorvall. Les culots sont resuspendus dans 5 ml de THB additionné de 0.5 ml de glycérol 60 % . Les 10 ml sont répartis en 1 ml par Eppendorf et stockés à moins 70° C. On obtient ainsi dix échantillons présentant un comportement identique vis à vis des conditions de préparation des protoplastes.

### I. 1. 3. Préparation et régénération des protoplastes

Les cellules glycinées sont soumises à l'action du lysozyme qui clive les liaisons établies entre l'acide N-acétyl muramique et le N-acétyl glucosamide ( fig 3 ). La préparation des protoplastes a lieu dans un tampon isotonique supplémenté avec de la SAB, ceci afin d'éviter la lyse des protoplastes formés. Le temps d'action du lysozyme doit être contrôlé afin d'obtenir le pourcentage maximum de protoplastes tout en gardant un taux de régénération proche de 100 % . Ce temps d'action doit être déterminé pour chaque souche et pour chaque lot de dix échantillons de cellules glycinées.

Un taux d'au moins 99.9 % de cellules protoplastées doit être réalisé, afin d'obtenir un nombre suffisant de régénérants après la transformation. Sur milieu solide, la croissance des protoplastes de S. faecalis est inhibée par la présence de cellules non protoplastées, celles-ci libérant une substance inconnue qui dans un rayon de 0.5 à 1 cm autour de la colonie inhibe l'émergence de colonies issues de protoplastes. Il est évident que si la densité des colonies issues de cellules non protoplastées est trop élevée, l'émergence de colonies issues de protoplastes sera limitée.

Le temps d'action du lysozyme ne doit pas être prolongé au-delà du temps correspondant au taux maximum de cellules protoplastées car la capacité de régénération de leur paroi diminue avec la longueur du traitement ( Wirth et col.(1986)). De nombreuses études sur les protoplastes ont démontré qu'un minimum de résidus de paroi doit rester associé à la membrane pour que la régénération soit accomplie ( Lee-Wickner et Chassy (1984)).

Un échantillon de 1 ml de cellules glycinées ( équivalant à 60 ml de culture ) est réchauffé à 37° C ( afin de faciliter l'action du lysozyme ) et versé dans un tube Greiner. Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 5000 Rpm dans le rotor SS34 de la centrifugeuse Sorvall. On ajoute 10 ml d'une solution fraîchement préparée ( stérilisée par filtration ) de TSCM ( 100mM Tris-HCl, 500 mM succinate de sodium ( Mal-linckrot, Sigma ), 40 mM CaCl<sub>2</sub> et 10 mM MgCl<sub>2</sub> ) additionnée de 100 mg de SAB et de 10 mg de lysozyme. Le culot est resuspendu au Vortex et le tube est incubé à 37° C.

Après 0, 30, 60, 90 et 120 minutes, 100 µl sont prélevés et dilués de 1 à 10<sup>-6</sup> fois dans du TSCM 100 µg SAB par ml ; 10 µl de chaque dilution sont déposés sur milieu THB/succinate au moyen d'une micropipette sans étaler mécaniquement la solution. L'utilisation d'un râteau est à proscrire car les forces mécaniques encourues par les protoplastes risquent d'entraîner leur lyse. Par contre, l'utilisation d'une pipette en verre de 1 ml pour étaler la suspension s'est avérée sans effet ( ou effet faible ) sur la perte de protoplastes.



(a)



(b)



Fig 4 (a) colonies issues de protoplastes de OG1X après 24 heures de culture sur THB/succinate

Fig 4 (b) colonies issues de cellules protoplastées de OG1X, qui après 48 à 72 heures de culture récupèrent leur paroi et donnent naissance à une colonie d'apparence normale. Les vestiges de la colonie issue de protoplastes après 24 heures sont indiqués par des flèches

## Résultats

### - Différences entre colonies issues de cellules non protoplastées et de protoplastes

Les colonies issues de cellules non protoplastées ou partiellement endommagées par l'action du lysozyme ( Smith (1985)) apparaissent après 16 heures d'incubation à 37° C avec la même apparence qu'une colonie normale de S. faecalis. L'émergence des colonies issues de protoplastes commence après 24 heures, elles ont une apparence différente des précédentes : elles sont bombées, à bords réguliers et translucides ( fig 4 (a)). De plus, elles sont de taille inférieure aux précédentes. Le milieu THB/succinate et un milieu hypertonique ( 0.5 M succinate de sodium ) favorable à la régénération de la paroi. Après 48 à 72 heures, les colonies issues de protoplastes ont une taille supérieure. Celles-ci ont le même aspect que les colonies normales de S. faecalis mais différent par la présence en leur centre d'un point translucide identique au type de colonies apparu après 24 heures ( fig 4 (b)). Le point central est obtenu à partir de la multiplication de protoplastes. A un certain moment, les protoplastes commencent à récupérer leur paroi et la colonie reprend son aspect normal. La vitesse avec laquelle apparaissent les colonies issues de protoplastes est déterminée par la qualité du milieu. Le milieu doit être suffisamment épais, frais et humide. Le milieu THB/ succinate doit être utilisé de préférence le jour de sa préparation; le séchage doit être limité à 15 à 20 minutes à 60° C au lieu de 30 à 45 minutes pour les milieux classiques.

### - Détermination des temps d'action du lysozyme

L'étalement de 100 µl de la dilution  $10^{-6}$  au temps zéro a permis d'estimer le nombre d'unités formant une colonie ( UFC ) dans l'échantillon de 1 ml de cellules glycinées ( ce qui équivaut à 60 ml de culture DO ( 650 nm ) 0.17 ).



Le temps d'action du lysozyme a été choisi comme étant celui où apparaît moins d'une UFC issue de cellules non protoplastées sur  $10^4$  colonies issues de protoplastes. Cette condition fut obtenue après un traitement de 120 minutes au lysozyme.

| temps ( min ) | nombre d'UFC (1)<br>par 60 ml de<br>culture<br>DO (650 nm) 0.17 | nombre de<br>colonies<br>issues de<br>protoplastes<br>par 60 ml de<br>culture DO<br>(650 nm) 0.17 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0             | $2 \times 10^9$                                                 | 0                                                                                                 |
| 120           | $< 2 \times 10^5$                                               | $2.5 \times 10^9$                                                                                 |

(1) Le terme UFC est utilisé pour des colonies issues de cellules non protoplastées où celles-ci sont associées en chaîne. Par contre, les protoplastes sont à l'état isolé ( vérifié au microscope à contraste de phase ).

Le nombre de protoplastes formés après un traitement au lysozyme de 120 minutes à partir de l'échantillon de 1 ml de cellules glycinées est de  $2.5 \times 10^9$ . Dans la transformation,  $1/10^e$  du volume est réparti dans chaque tube de transformation soit l'équivalent de  $2.5 \times 10^8$  protoplastes. Bien que la transformation soit d'abord dépendante de la quantité de DNA plasmidique, le nombre de protoplastes impliqués par tube de transformation doit être suffisant ; ainsi,  $2.5 \times 10^8$  protoplastes est un nombre qui correspond à celui conseillé par Wirth et col. ( compris entre  $10^8$  et  $10^9$  protoplastes par tube de transformation ).

## I. 2. La transformation de protoplastes avec les plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13

Cette méthode permet la pénétration de DNA exogène à l'intérieur des protoplastes. Elle est basée sur l'utilisation de polyéthylène glycol ( PEG ), qui aux concentrations utilisées ne permet pas la fusion de protoplastes. Le mécanisme exact par lequel le PEG permet l'entrée du DNA exogène n'est pas connu. Mais le PEG pourrait rendre la membrane des protoplastes plus perméable au DNA ou alternativement il pourrait entraîner un changement de conformation du DNA et ainsi lui permettre de pénétrer à l'intérieur du protoplaste ( Kondo et Mc Kay (1984)). La concentration en PEG et le temps d'exposition sont deux facteurs critiques intervenant dans la fréquence de la transformation.

### I. 2. 1. Mode opératoire

La suspension de 10 ml de protoplastes ayant subi le traitement au lysozyme pendant 120 minutes est centrifugée pendant 10 minutes à 5000 Rpm au rotor SS34 de la centrifugeuse Sorvall. Un premier lavage est réalisé, le culot est resuspendu dans 10 ml de TSCM contenant 100 µg de SAB/ml ; la resuspension se fait par agitation faible, sans vortexer ( deux minutes de vortex entraînent 95 % de lyse ). La solution est à nouveau centrifugée 10 minutes à 5000 Rpm et les protoplastes sont resuspendus dans 1 ml de TSCM 100 µg SAB/ml. Les protoplastes sont alors aptes à la transformation. Le plasmide en solution dans du TE est ajusté à un volume de 50 µl, 50 µl de 2xSSC ( 1xSSC : 0.15 M NaCl, 0.015 M citrate de sodium ( Mallinckrot ) pH 7 ) sont ajoutés pour porter le volume à 100 µl. 100 µl de la suspension de protoplastes sont prélevés et ajoutés aux 100 µl précédents. Le mélange est rapidement ajouté à 1.8 ml de PEG 1000 40 % ( p/v ) ( Sigma ) dissous dans du TSCM ; la stérilisation est réalisée par une filtration, (c'est-à-dire au travers d'un filtre membranaire de 0.22 µm). Le volume final de 2 ml est versé dans un tube de 16 ml de polycarbonate, le mélange est homogénéisé en inversant le tube 5 fois et incubé 3 minutes à 0° C, ensuite



5 minutes à 37° C. Le mélange est rapidement déposé dans la glace et dilué avec 5 volumes de TSCM 100 µg SAB/ml. Un second lavage est réalisé, la suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 10000 Rpm dans le rotor SS 34 de la centrifugeuse Sorvall. Le culot est resuspendu dans 10 ml de THB/ succinate liquide, une nouvelle centrifugation a lieu et le culot est resuspendu dans 1 ml de THB/succinate liquide. Le tube est placé pendant une à deux heures à 37° C afin de permettre l'expression phénotypique de la résistance aux antibiotiques. 20 et 100 µl sont étalés à la pipette de verre sur THB/succinate additionné des concentrations en antibiotiques adéquates. Les concentrations sont de 5 µg/ml de milieu pour l'érythromycine et le chloramphénicol. Les transformants apparaissent après 3 à 4 jours d'incubation à 37° C. Pour chaque transformation, un contrôle sans DNA est réalisé. Ceci afin de bien discerner les colonies issues de cellules non protoplastées qui ne sont pas sensibles à des concentrations de 5 µg/ ml d'antibiotique et qui peuvent croître sur ce type de milieu.

#### I. 2. 2. Résultats obtenus avec les plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13

Le pVA838 a été utilisé dans un premier temps pour s'assurer de l'efficacité de la méthode, ce plasmide ayant déjà été éprouvé par Wirth et col.(1986). Le pGKV2 et pGK13 n'ont jamais été testés chez S. faecalis, mais ils ont déjà donné des résultats satisfaisants chez S. lactis, S. pneumoniae et S. sanguis.

##### I. 2. 2. 1. Préparation des plasmides

Les souches E. coli DB11 ( pVA838 ), B. subtilis 8G5 ( pGK13 ), pSL1 ( pGKV2 ) ont été vérifiées pour la présence des marqueurs de résistance à l'érythromycine ( EM<sup>r</sup> ) et au chloramphénicol ( CM<sup>r</sup> ). Une préparation rapide de DNA plasmidique a été réalisée pour chaque souche. Mais le rendement de la préparation du pGKV2 et du pGK13 était trop faible pour

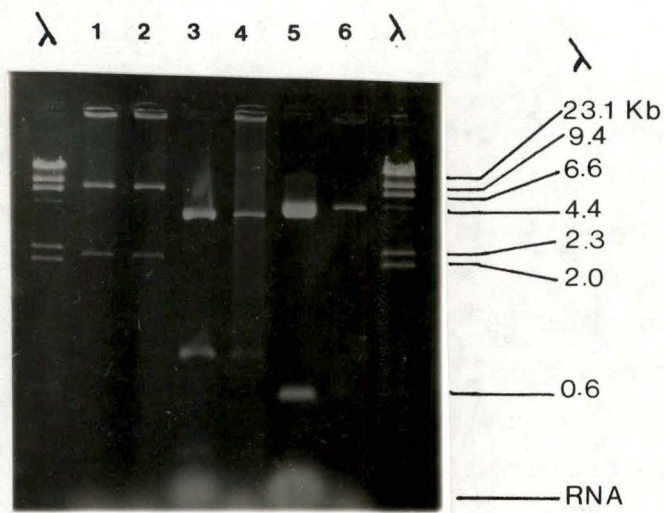


Fig 5 gel d'agarose 0.8 % (p/v) : présentation des profils de restriction des plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13

- pistes 1, 2 : DNA du pVA838 restreint avec EcoRI et SphI
- pistes 3, 4 : DNA du pGKV2 restreint avec EcoRI et HindIII
- pistes 5, 6 : DNA du pGK13 restreint avec EcoRI et HindIII
- pistes 1, 3, 5 : DNA préparé à partir de E. coli TG1
- pistes 2, 4, 6 : DNA préparé à partir de S. faecalis OG1X
- λ : DNA du phage λ restreint avec HindIII



envisager une transformation chez S. faecalis, ceci s'expliquant par le faible nombre de copies par cellule chez B. subtilis ( environ 5 ). Le DNA plasmidique préparé à partir de B. subtilis a servi de base à une transformation chez E. coli TG1. Une préparation rapide a été réalisée, où dans ce cas le rendement fut supérieur car le nombre de copies de ces deux plasmides est beaucoup plus important chez E. coli ( environ 60 ).

Afin de vérifier la taille des plasmides, une double restriction a été réalisée, suivie d'une électrophorèse. Les tailles des fragments ont été estimées à partir des cartes de restriction plasmidiques déjà établies ( tableau I ). Sur gel, la position des fragments a été mise en correspondance avec les marqueurs standard du phage  $\lambda$  restreint avec Hind III ( fig 5 ). Les fragments obtenus ont les tailles attendues.

Tableau I

| plasmides | taille ( Kb ) | enzymes<br>de restrict. | taille des<br>fragments<br>(Kb) | piste<br>fig 5 |
|-----------|---------------|-------------------------|---------------------------------|----------------|
| pVA838    | 9.2           | EcoRI-SphI              | 7.1 ; 2.1                       | 1              |
| pGKV2     | 4.65          | EcoRI-<br>Hind III      | 3.65 ; 0.7 ;<br>0.3             | 3              |
| pGK13     | 4.9           | EcoRI-<br>Hind III      | 4.35 ; 0.55                     | 5              |

Le fragment de 0.3 Kb du pGKV2 est peu visible sur la piste 3 de la fig 5.

### I. 2. 2. 2. Transformation chez S. faecalis

L'identité de la souche OG1X a été vérifiée pour sa croissance sur streptomycine et sur 0.05 %  $\text{NaN}_3$ . La quantité de DNA plasmidique ajoutée à chaque tube de transformation est approximativement de 1  $\mu\text{g}$ . Les protoplastes transformés ont été sélectionnés pour leur résistance à l'érythromycine ( 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ). Les premiers transformants sont apparus après 3 à 4 jours et ceci pour les trois plasmides utilisés.

Le taux de transformation a été déterminé :

| pVA838         | pGKV2          | pGK13          |                                                              |
|----------------|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------|
| $5 \cdot 10^2$ | $2 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^4$ | nombre de transformants par $\mu\text{g}$ de DNA plasmidique |

Un premier test de vérification de l'incorporation des plasmides fut le passage à des concentrations en érythromycine et en chloramphénicol léthales pour les cellules non transformées. 50 transformants OG1X de chaque plasmide furent repiqués sur des milieux contenant 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'érythromycine et sur des milieux contenant 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de chloramphénicol.

| antibiotique                                  | OG1X | OG1X<br>(pVA838) | OG1X<br>(pGKV2) | OG1X<br>(pGK13) |
|-----------------------------------------------|------|------------------|-----------------|-----------------|
| EM 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$                 | -    | +                | +               | +               |
| CM 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$                 | -    | -                | +               | +               |
| streptomycine<br>1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | +    | +                | +               | +               |
| $\text{NaN}_3$ 0.05 %                         | +    | +                | +               | +               |



Les cinquante transformants OG1X ( pGKV2 ) et OG1X ( pGK13 ) ont tous poussé sur érythromycine et sur chloramphénicol. Les cinquante transformants OG1X ( pVA838 ) se montrent résistants à l'érythromycine mais pas au chloramphénicol. La non-résistance au chloramphénicol concorde avec les données observées chez S. sanguis ( Macrina et col.(1982)). Le gène de résistance au chloramphénicol est issu de E. coli et ne s'exprime pas chez le genre Streptococcus.

Les transformants ont également été vérifiés pour leur résistance à la streptomycine et leur croissance sur  $\text{NaN}_3$ . Afin de vérifier la taille et l'intégrité du plasmide, une préparation rapide de DNA a été réalisée pour les trois plasmides, suivie d'une double restriction identique à celle réalisée pour le DNA ayant servi à la transformation. Une électrophorèse a été réalisée avec les produits de ces restrictions. Les produits de restriction issus de préparations de DNA de E. coli ont été mis en correspondance avec ceux issus de S. faecalis. Ces restrictions sur gel sont présentées à la fig 5. Pistes 1 et 2 : pVA838, pistes 3 et 4 : pGKV2, pistes 5 et 6 : pGK13.

La détermination du nombre de copies par cellule de ces trois plasmides chez S. faecalis n'a pas été réalisée. Mais, le rendement des préparations rapides est une estimation grossière du nombre relatif de copies par cellule. Ces rendements sont proches pour le pGKV2 et le pGK13, le pVA838 possédant un rendement supérieur. Ceci peut être mis en relation avec les valeurs de nombres de copies par cellule déterminées pour d'autres espèces de Streptococcus. Ainsi, S. sanguis ( pVA838 ) possède un nombre de copies de  $15 \pm 1.1$ , S. lactis ( pGKV2 ) et S. lactis ( pGK13 ) un nombre de copies proche de trois.

En ce qui concerne le taux de transformation, il a été déterminé avec le pVA838 chez S. faecalis OG1X par Wirth et col.(1986). Sa valeur rapportée par les auteurs est de  $10^4$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA. Cette valeur 20 fois supérieure

à celle obtenue dans notre cas peut s'expliquer par les faits suivants : la préparation de DNA plasmidique utilisée par Wirth et ses collaborateurs est d'une pureté supérieure à celle utilisée dans notre cas. Les différences de pureté de la préparation influencent le taux de transformation. De plus, une certaine variabilité souvent très importante est déterminée par la qualité du milieu de régénération et la rigueur avec laquelle le protocole de transformation est réalisé.

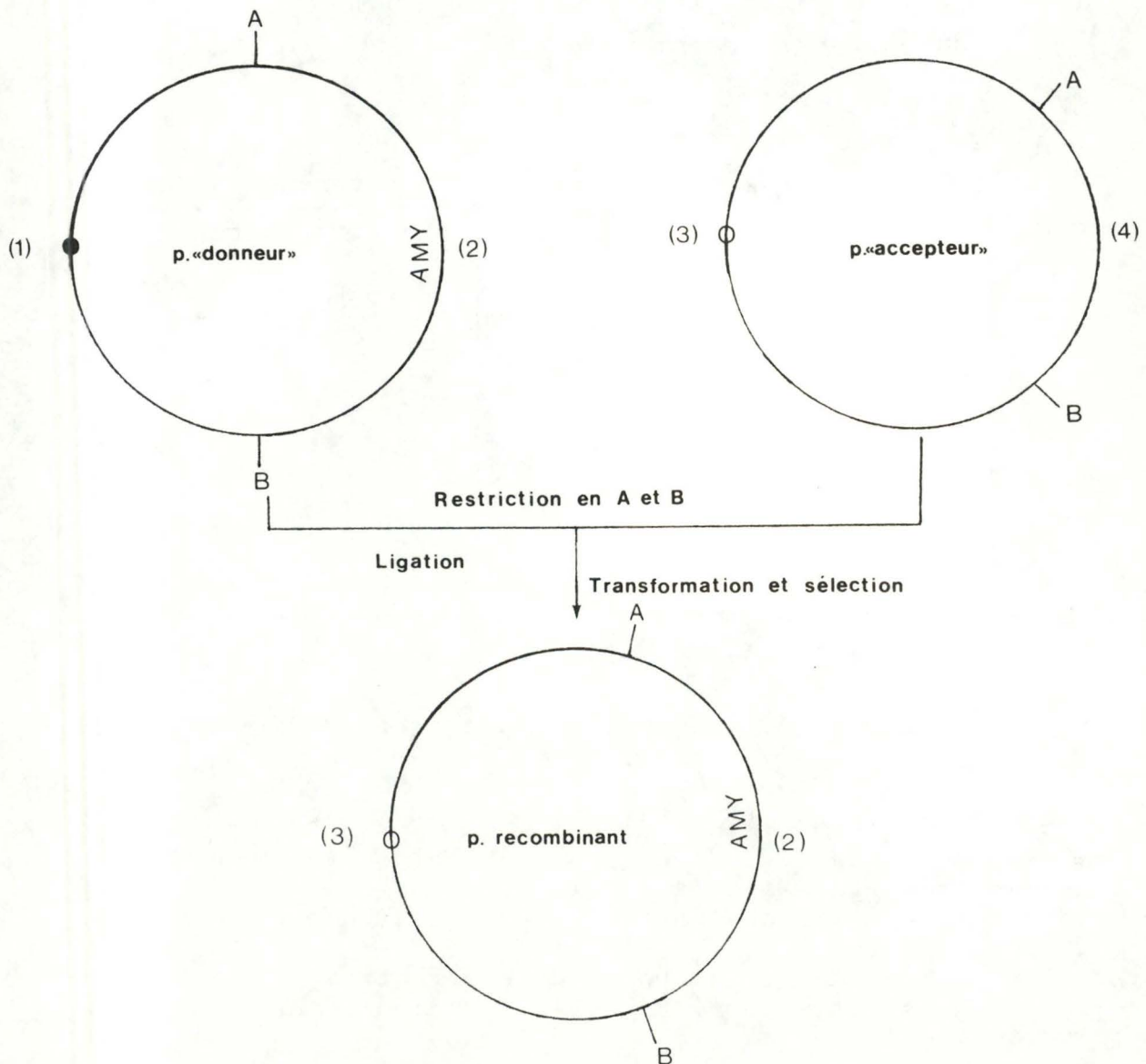
La transformation de S. faecalis par le pGKV2 et le pGK13 est une expérience inédite. Le spectre d'hôtes de ces deux plasmides dans le genre Streptococcus comprenait déjà S. lactis, S. pneumoniae et S. sanguis. Celui-ci s'élargit par cette expérience à S. faecalis. Les deux marqueurs de résistance aux antibiotiques s'expriment tous deux dans ce nouvel hôte tout comme pour les trois hôtes précédents. En ce qui concerne le taux de transformation, la seule donnée existante à ma connaissance pour le genre Streptococcus a été déterminée chez S. lactis par transformation directe de protoplastes. La valeur obtenue avec le pGK12 ( proche du pGK13 ) était de  $0.5 \times 10^4$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA ( Kok et col.(1984)), soit un taux de transformation équivalent à celui obtenu chez S. faecalis.



II. Clonage du gène de l' $\alpha$ -amylase de *B. licheniformis* chez *E. coli* dans les trois plasmides pVA838, pGKV2 et pGK13

la possibilité de réplication de ces trois plasmides chez *E. coli* a permis de réaliser tout le travail de clonage chez la souche *E. coli* TG1, ce qui a grandement facilité celui-ci à différents niveaux. Les préparations de DNA plasmidique possèdent des rendements supérieurs ( en relation avec le nombre de copies par cellule ). La transformation dans son protocole est beaucoup plus simple et l'émergence des transformants ( de 18 à 48 heures ) est beaucoup plus rapide que chez *S. faecalis*.

II. 1. Stratégie générale du clonage



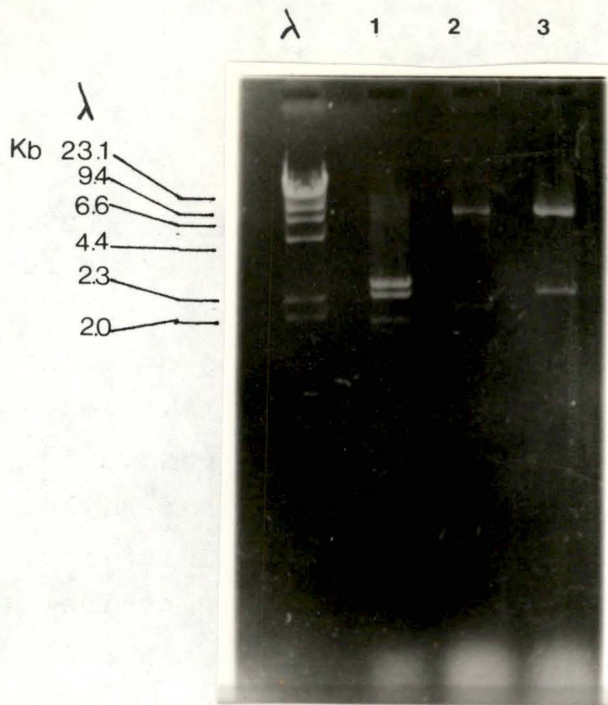


Fig 6 gel d'agarose 0.8 % : présentation des profils de restriction des plasmides p $\alpha$ 21 ( piste 1 ), pVA838 ( piste 2 ) et pVA $\alpha$  ( piste 3 ) restreints avec EcoRI et SphI  
 $\lambda$  = DNA du phage $\lambda$  restreint avec HindIII

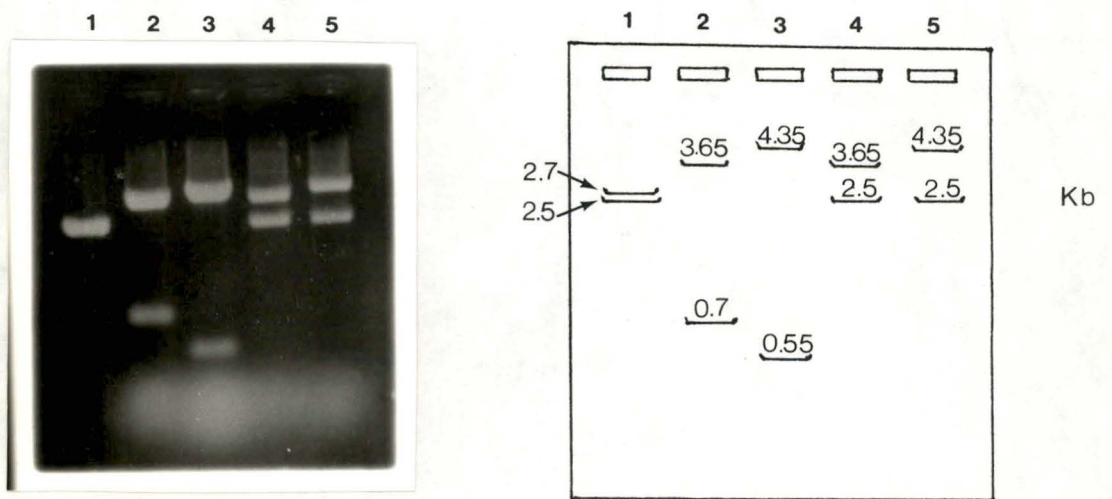


Fig 7 gel d'agarose 0.8 % : présentation des profils de restriction des plasmides p $\alpha$ 21 ( piste 1 ), pGKV2 ( piste 2 ), pGK13 ( piste 3 ), pGKV2 $\alpha$  ( piste 4 ), pGK13 $\alpha$  ( piste 5 )  
 les marqueurs standard du phage  $\lambda$  restreint avec HindIII ne sont pas présents. Mais la taille des fragments attendus est déterminée à partir des cartes de restriction déjà établies pour ces plasmides  
 la piste 1 présentant le profil de restriction du p $\alpha$ 21 où deux fragments attendus ( 2.5 et 2.7 Kb ) n'apparaissent qu'en une seule bande



On peut définir ce clonage comme étant un clonage unidirectionnel de substitution. Le plasmide " donneur ": le p $\alpha$ 21 fournit le gène d' $\alpha$ -amylase. Le gène est extrait par une double restriction. Deux sites de restriction sont utilisés ( le site A et le site B ), respectivement à droite et à gauche du gène d' $\alpha$ -amylase. Ces sites ont été choisis en fonction de leur absence dans la séquence du gène d' $\alpha$ -amylase et de leur présence dans le plasmide " accepteur " ( pVA838, pGKV2 et pGK13 ). Les deux sites présents dans le plasmide accepteur doivent entourer une séquence ne possédant pas l'origine de réplication. Le gène d' $\alpha$ -amylase se substitue à une séquence non essentielle du plasmide et ne peut s'insérer que dans une seule direction, direction conditionnée par la présence de deux sites différents.

## II. 2. Application de la stratégie au pVA838, au pGKV2 et au pGK13

### II. 2. 1. Restriction des plasmides

Les enzymes de restriction utilisés, ainsi que les tailles des fragments attendus, sont représentés au tableau II.

tableau II

| plasmide      | taille des fragments de restriction ( Kb ) |                | figures         |
|---------------|--------------------------------------------|----------------|-----------------|
|               | EcoRI-SphI                                 | EcoRI-Hind III |                 |
| p $\alpha$ 21 | 2.7-2.5                                    | 2.7-2.5        | 6 et 7, piste 1 |
| pVA838        | 7.1-2.1                                    |                | 6, piste 2      |
| pGKV2         |                                            | 3.65-0.7-0.3   | 7, piste 2      |
| pGK13         |                                            | 4.35-0.55      | 7, piste 3      |

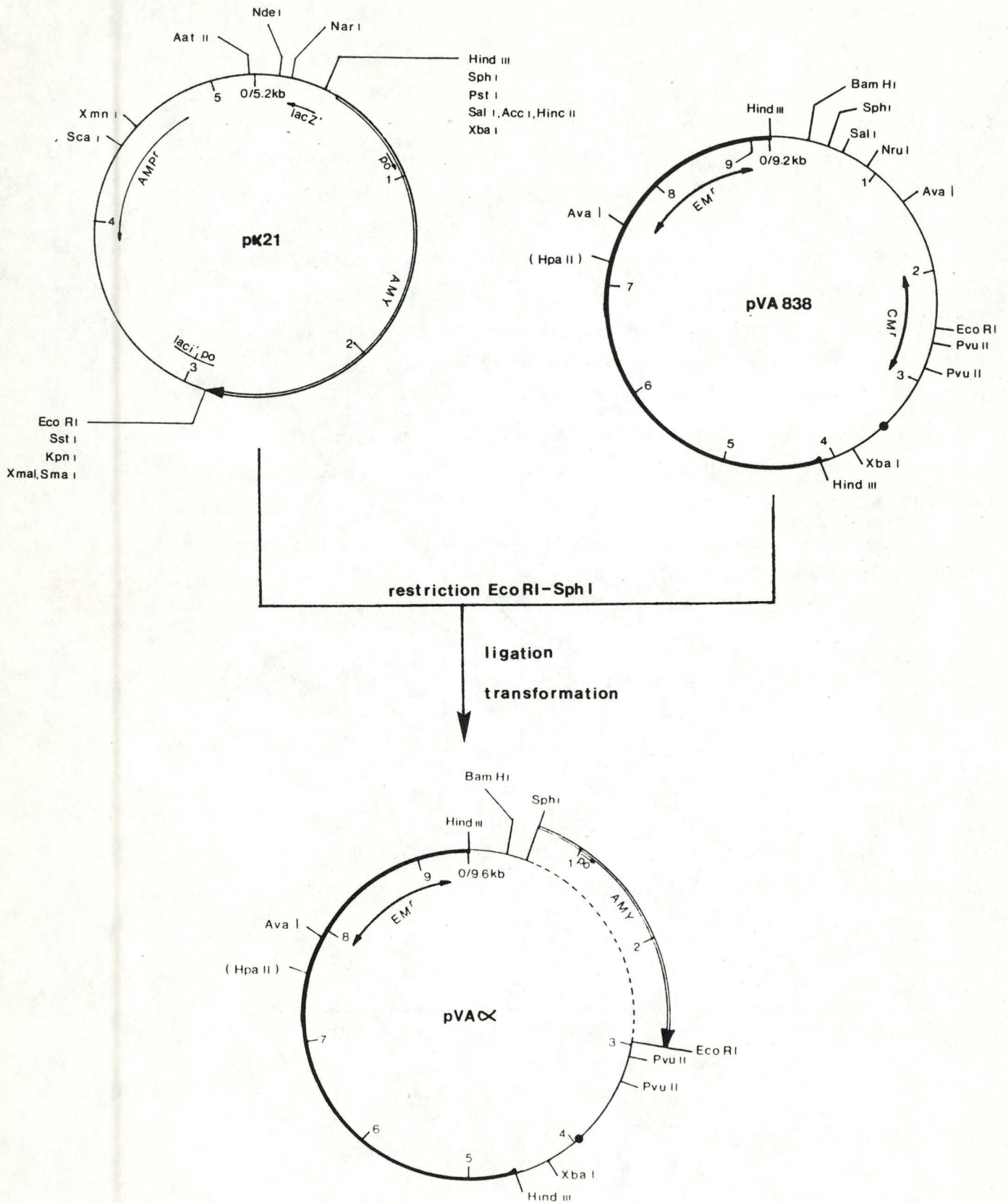


Fig 8 schéma présentant la construction du plasmide pVA $\alpha$  à partir du p $\alpha$ 21 et du pVA838 .

Le plasmide pVA $\alpha$  (9.6 Kb) est porteur d'un marqueur de résistance à l'érythromycine ( $EM^r$ ) et du gène d' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis RPO1 (*AMY*) (ligne double où l'orientation est indiquée par la flèche)



## II. 2. 2. Ligation

La ligation est réalisée sur l'ensemble des quatre ou cinq fragments de la restriction des deux plasmides de chaque couple. La ligation peut générer toute une gamme de molécules recombinantes où un certain nombre de ces molécules peuvent se répliquer pour autant qu'elles possèdent dans un de leurs fragments une origine de réplication.

## II. 2. 3. Transformation et sélection

Le produit de ligation a servi à une transformation chez E. coli TG1. La sélection s'est effectuée en fonction des marqueurs portés par chacun des deux fragments plasmidiques impliqués dans le plasmide recombinant.

### II. 2. 3. 1. Les plasmides p $\alpha$ 21 et pVA838

| plasmide      | taille des fragments<br>de restriction<br>EcoRI-SphI ( Kb ) | marqueurs                          |
|---------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| p $\alpha$ 21 | 2.7                                                         | Amp <sup>r</sup>                   |
|               | 2.5                                                         | $\alpha$ -amylase <sup>+</sup> (1) |
| pVA838        | 7.1                                                         | EM <sup>r</sup> (2)                |
|               | 2.1                                                         | /                                  |

(1) + (2) : pVA $\alpha$ , 9.6 Kb. (fig 8)

Le plasmide attendu doit résulter de l'association du fragment de 7.1 Kb du pVA838 porteur de l'origine de répllication de E. coli et de S. faecalis, et du fragment de 2.5 Kb du p $\alpha$ 21 porteur du gène d' $\alpha$ -amylase. Nous dénomerons ce plasmide pVA $\alpha$ . Il doit avoir une taille de 9.6 Kb, conférer la résistance à l'érythromycine ainsi que la fonction  $\alpha$ -amylolytique ( fig 8 ). Les transformants ont été sélectionnés sur érythromycine et les colonies  $\alpha$ -amylase<sup>+</sup> repérées.

Deux colonies  $\alpha$ -amylase positives et résistantes à l'érythromycine ont servi de base à une préparation rapide de DNA. Mais le produit de la restriction EcoRI-SphI s'est avéré ne pas correspondre à la construction attendue. Il est apparu que les colonies  $\alpha$ -amylase positives et résistantes à l'érythromycine étaient également résistantes à l'ampicilline. Ces colonies n'étaient pas homogènes. Lorsqu'une d'entre elles est striée sur milieu solide contenant de l'ampicilline, certaines apparurent ne plus être  $\alpha$ -amylase positives. Ceci s'explique par le phénomène de co-transformation où deux plasmides différents sont présents au sein de la même cellule. Pour éviter ce problème, la sélection a été poussée plus loin. Les colonies  $\alpha$ -amylase positives et résistantes à l'érythromycine ont été repiquées sequentiellement sur ampicilline et sur chloramphénicol. Les colonies ont été sélectionnées pour leur résistance à l'érythromycine, leur sensibilité au chloramphénicol et à l'ampicilline, et pour le caractère  $\alpha$ -amylase positif.

Une préparation rapide a été réalisée à partir d'une colonie de ce type, une double restriction EcoRI-SphI menée et le produit de restriction déposé sur gel. Une électrophorèse du pVA838 et du p $\alpha$ 21 restreints aux mêmes sites a été réalisée en parallèle. La figure 6 présente ces trois plasmides restreints aux sites EcoRI et SphI. Les fragments de restriction du pVA $\alpha$  se situent aux endroits attendus. Ainsi, la bande correspondant au fragment de 7.1 Kb migre à la même distance que la bande du fragment de 7.1 Kb du pVA838 ; il en est de même avec la bande correspondant au fragment de 2.5 Kb présente dans la restriction du p $\alpha$ 21 et du pVA $\alpha$ .



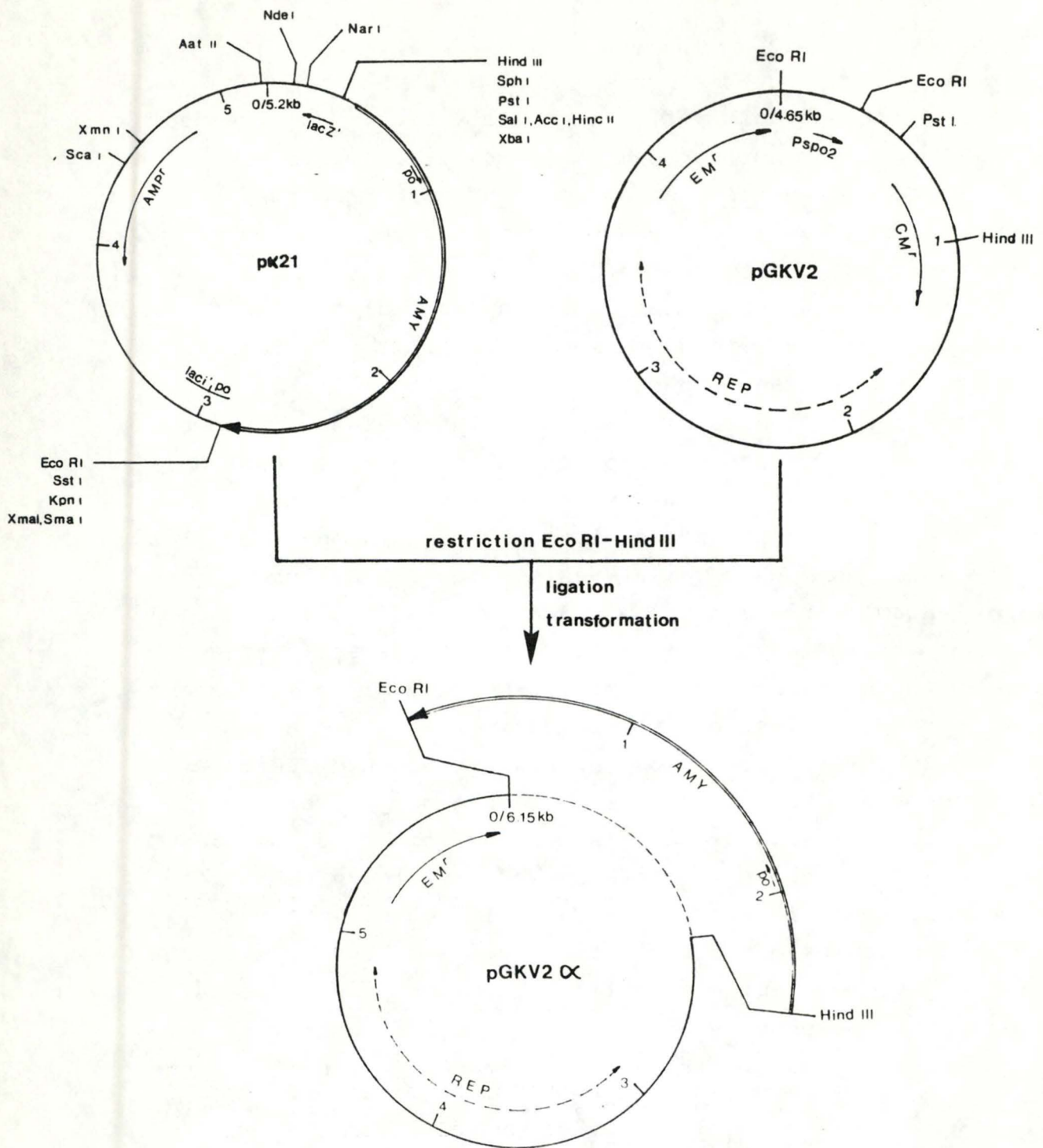


Fig 9 schéma présentant la construction du plasmide pGKV2  $\alpha$  à partir du pK21 et du pGKV2.

Le plasmide pGKV2  $\alpha$  (6.15 Kb) est porteur d'un marqueur de résistance à l'érythromycine (*EM<sup>r</sup>*) et du gène d' $\alpha$ -amylase de *B.licheniformis* RP01 (*AMY*) (ligne double où l'orientation est indiquée par la flèche)

II. 2. 3. 2. Les plasmides p $\alpha$ 21 et pGKV2

| plasmides     | taille des fragments<br>de restriction<br>EcoRI-Hind III ( Kb ) | marqueurs                                   |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| pGKV2         | 0.3<br>0.7<br>3.65                                              | /<br>/<br>EM <sup>r</sup> (1)               |
| p $\alpha$ 21 | 2.7<br>2.5                                                      | Amp <sup>r</sup><br>$\alpha$ -amylase + (2) |

(1) + (2) : pGKV2 $\alpha$ , 6.15 Kb. (fig 9)

Le plasmide attendu que nous dénomerons pGKV2 $\alpha$  doit résulter de l'association du fragment de 3.65 Kb du pGKV2 et du fragment de 2.5 Kb du p $\alpha$ 21. Le plasmide résultant doit posséder une taille de 6.15 Kb, conférer la résistance à l'érythromycine ainsi que la fonction  $\alpha$ -amylolytique. La sélection a été établie sur ces deux caractéristiques associées à une sensibilité au chloramphénicol et à l'ampicilline. Une colonie correspondant à cette sélection a servi de base à une restriction EcoRI-Hind III. Le produit de cette restriction a subi une électrophorèse sur gel conjointement avec le p $\alpha$ 21 et le pGKV2 clivés par les mêmes enzymes. La figure 7 présente le gel correspondant aux trois produits de restriction. Piste 1 : p $\alpha$ 21 ; piste 2 : pGKV2 ; piste 4 : pGKV2 $\alpha$ . Comme pour le pVA $\alpha$ , les fragments de 3.65 et de 2.5 Kb du pGKV2 se retrouvent aux emplacements des produits de restriction du p $\alpha$ 21 et du pGKV2.



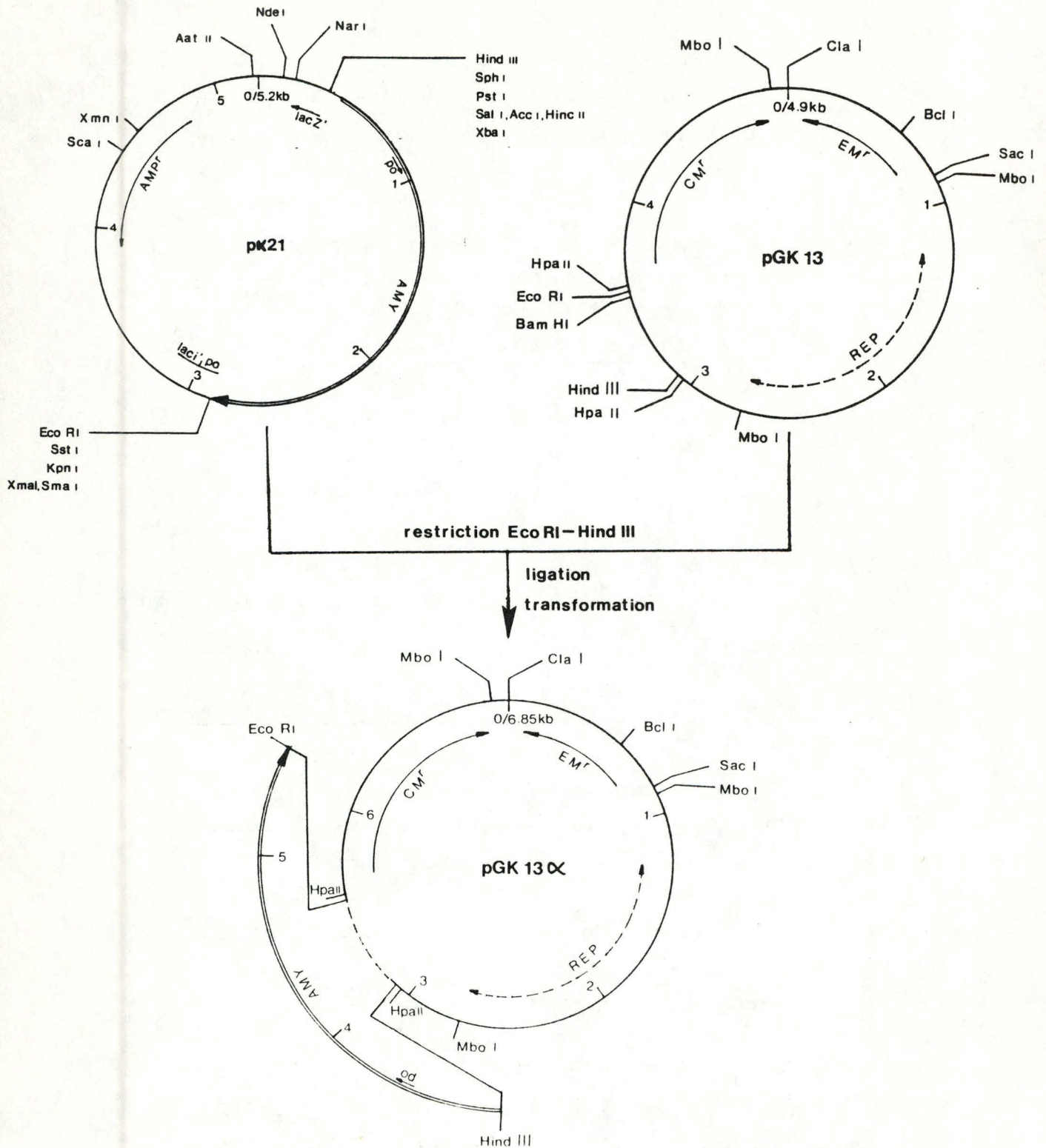


Fig 10 schéma présentant la construction du plasmide pGK13 $\alpha$  à partie du p $\alpha$ 21 et du pGK13.

Le plasmide pGK13 $\alpha$  (6.85 Kb) est porteur des marqueurs de résistance à l'érythromicine ( $EM^R$ ) et au chloramphénicol ( $CM^R$ ), et du gène d' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis RPO1 (*AMY*) (ligne double où l'orientation est indiquée par la flèche)

La présence ou l'absence du fragment EcoRI-EcoRI de 0.3 Kb porteur du promoteur pSP02 a dû être vérifiée. La restriction du pGKV2 $\alpha$  présentée à la figure 7 ( piste 4 ) ne permet pas de visualiser ce fragment. Une restriction EcoRI a été effectuée sur une préparation du pGKV2 et du pGKV2 $\alpha$  ayant subi un traitement à la RNase : les produits de restriction sont migrés en parallèle. La quantité déposée sur gel pour le pGKV2 $\alpha$  était le double de celle du pGKV2. La bande correspondant au fragment de 0.3 Kb était présente pour la restriction du pGKV2 mais pas pour le pGKV2 $\alpha$ .

### II. 2. 3. 3. Les plasmides p $\alpha$ 21 et PGK13

| plasmides     | taille des fragments<br>de restriction<br>EcoRI-Hind III | marqueurs                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| pGK13         | 4.35<br>0.55                                             | CM <sup>r</sup> , EM <sup>r</sup> (1)<br>/             |
| p $\alpha$ 21 | 2.7<br>2.5                                               | Amp <sup>r</sup><br>$\alpha$ -amylase <sup>+</sup> (2) |

(1) + (2) : pGK13 $\alpha$ , 6.85 Kb. (fig 10)

Le plasmide attendu doit posséder une taille de 6.85, résultant de l'association du fragment de 4.35 Kb du pGK13 et du fragment de 2.5 Kb du p $\alpha$ 21. Ce plasmide, que nous appellerons pGK13 $\alpha$  doit être porteur des gènes de résistance au chloramphénicol et à l'érythromycine, et doit posséder le caractère  $\alpha$ -amylolytique ( fig 10 ). Les transformants ont été sélectionnés pour leur résistance à l'érythromycine et au chloramphénicol, pour la présence du caractère  $\alpha$ -amylase et pour leur sensibilité à l'ampicilline.



Un transformant correspondant à ces critères a fait l'objet d'une préparation rapide de DNA plasmidique. Ce DNA a subi une restriction EcoRI-Hind III. Le produit de restriction a été migré en parallèle avec les produits de restriction du p $\alpha$ 21 et du pGK13 clivés avec les mêmes enzymes. Les deux fragments du pGK13 $\alpha$  se sont avérés correspondre aux fragments équivalents dans les produits de restriction du p $\alpha$ 21 et du pGK13 ( fig 7 , pistes 1, 3, 5 ).

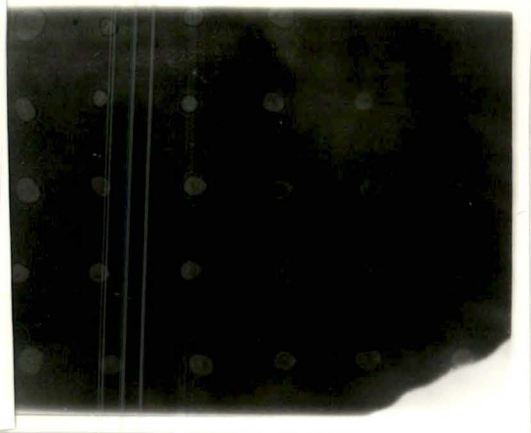
### III. Transformation chez S. faecalis OG1X avec les plasmides pVA $\alpha$ , pGKV2 $\alpha$ , pGK13 $\alpha$ , pSA33.

#### III. 1. pVA $\alpha$ , pGKV2 $\alpha$ , pGK13 $\alpha$

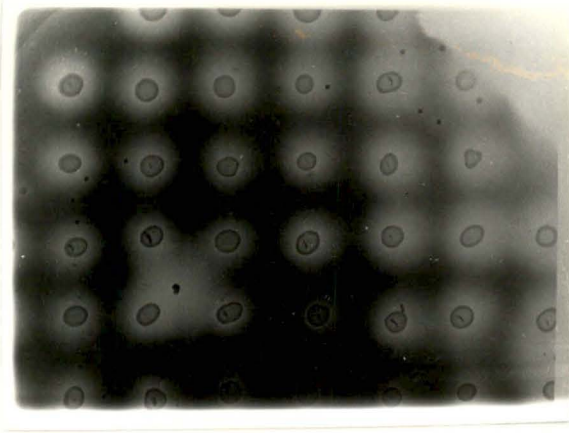
Une préparation rapide de DNA a été réalisée à partir des souches TG1 ( pVA $\alpha$  ), TG1 ( pGKV2 $\alpha$  ) et TG1 ( pGK13 $\alpha$  ). La transformation chez OG1X a été réalisée comme pour les plasmides non recombinants. Les transformants sont apparus après trois à quatre jours d'incubation à 37° C. Les taux de transformation ont été déterminés :

|                                            | pVA            | pGKV2          | pGK13          |
|--------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| nombre de transformants par $\mu$ g de DNA | $2 \cdot 10^3$ | $2 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^4$ |

Les transformants ont été repiqués sur des milieux érythromycine 50  $\mu$ g/ml et sur des milieux chloramphénicol 20  $\mu$ g/ml, afin de vérifier la présence des marqueurs plasmidiques.



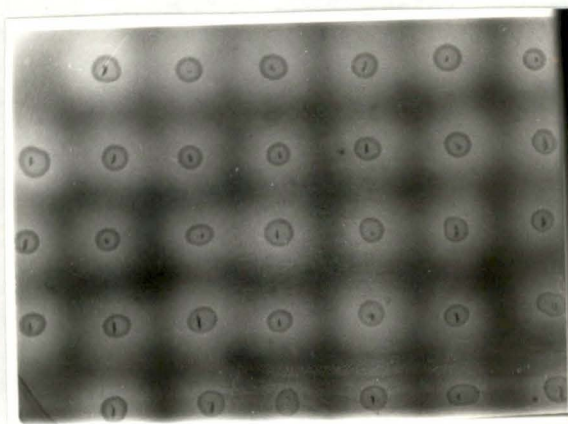
a/



b/



c/



d/

Fig 11 colonies issues des souches OG1X (a/), OG1X (pVA $\alpha$ )(b/), OG1X (pGKV2 $\alpha$ )(c/), OG1X (pGK13 $\alpha$ )(d/) repiquées sur milieu THB/succinate amidon 0.2 % (p/v). Ces boîtes ont subi une coloration aux vapeurs d'iode

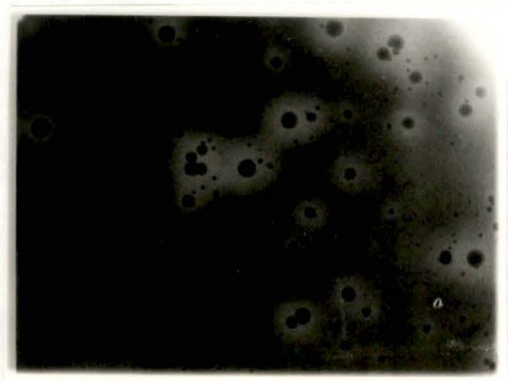


Fig 12 transformant amylolytique de *S. faecalis* OG1X ayant subi un premier striage sur boîte THB/succinate amidon 0.2 % (p/v). ( hétérogénéité dans la taille des colonies )



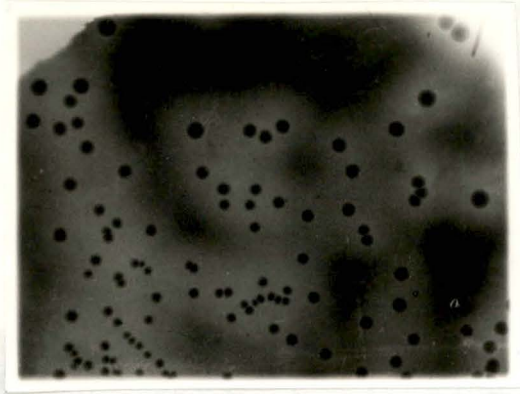


Fig 13 colonie issue du premier passage sur THB/succinate amidon 0.2 % (p/v) striée sur le même type de milieu ( homogénéisation de la taille des colonies )

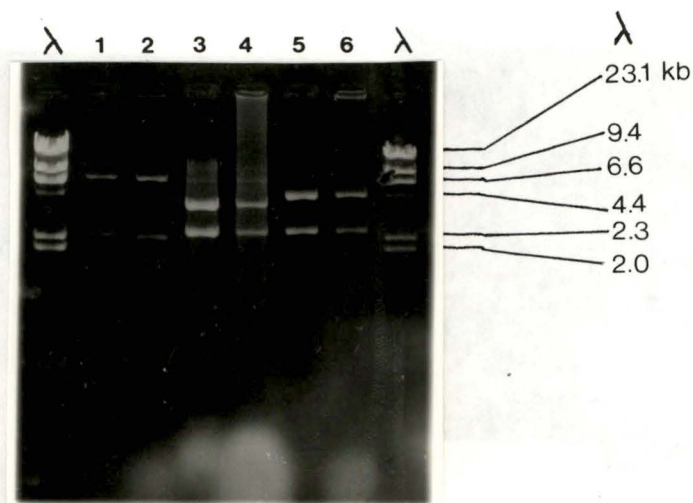


Fig 14 gel d'agarose 0.8 % (p/v) présentation des profils de restriction des plasmides pVA $\alpha$ , pGKV2 $\alpha$  et pGK13 $\alpha$   
 piste 1,2: DNA du pVA $\alpha$  restreint avec EcoRI et SphI  
 piste 3,4: DNA du pGKV2 $\alpha$  restreint avec EcoRI et HindIII  
 piste 5,6: DNA du pGK13 $\alpha$  restreint avec EcoRI et HindIII  
 piste 1,3,5: DNA préparé à partir de E. coli TG1  
 piste 2,4,6: DNA préparé à partir de S. faecalis OG1X

Les transformants OG1X ( pVA $\alpha$  ) et OG1X ( pGKV2 $\alpha$  ) se sont montrés résistants à l'érythromycine, et les transformants OG1X ( pGK13 $\alpha$  ) résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol. Dans ces milieux où l'amidon était incorporé, toutes les colonies repiquées se sont montrées  $\alpha$ -amylase positives, et ceci pour les trois types de transformants ( fig 11 ).

Tous les transformants ont été vérifiés pour leur croissance sur streptomycine et sur 0.05%NaN<sub>3</sub> afin de s'assurer qu'ils étaient issus de la souche OG1X.

Deux colonies de chaque type de transformant ont été striées sur boîte afin de vérifier l'homogénéité de la population aussi bien au niveau de la présence du caractère  $\alpha$ -amylolytique qu'au niveau de la taille des colonies. Il est apparu qu'après un premier striage, la population restait hétérogène au niveau de la taille des colonies ( fig 12 ). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que de nombreuses cellules n'ont pas récupéré totalement leur paroi. Lorsqu'une grosse colonie de ce premier striage est prélevée et striée à nouveau sur boîte de pétri, la population s'homogénéise ( fig 13 ). Cette non homogénéité dans la taille des colonies avait déjà été observée pour les transformants de OG1X des trois plasmides non recombinants ( pVA838, pGKV2 et pGK13 ).

Une préparation rapide de DNA plasmidique a été réalisée pour les transformants OG1X ( pVA $\alpha$  ), OG1X ( pGKV2 $\alpha$  ) et OG1X ( pGK13 $\alpha$  ). Le pVA $\alpha$  est restreint avec les enzymes EcoRI et SphI, le pGKV2 $\alpha$  et le pGK13 $\alpha$  avec les enzymes EcoRI et Hind III. Les produits de ces restrictions sont migrés en parallèle avec les mêmes plasmides restreints avec les mêmes enzymes, mais issus de E. coli ( fig 14 ). Les profils de ces restrictions sont identiques entre le DNA ayant servi à la transformation ( issus de E. coli ) et le DNA préparé à partir de S. faecalis.



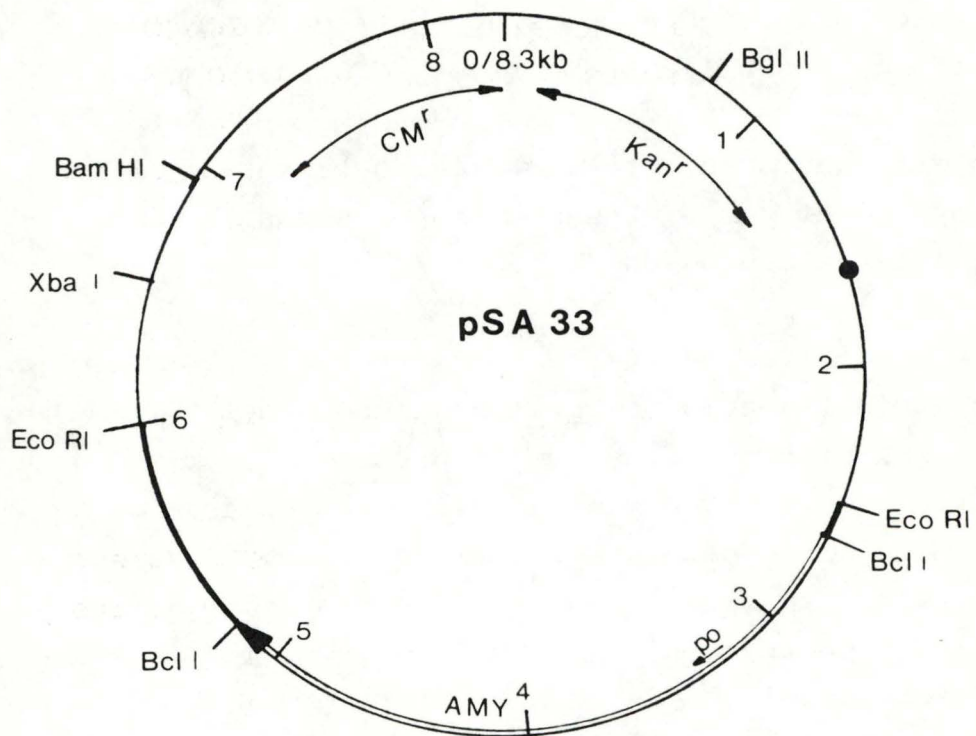


Fig 15 carte de restriction du pSA33 (8.3 Kb)  
 (description cfr. fig 3 présentée dans  
 l'introduction au parag. II.3.2.2.)

III. 2. pSA33 ( fig 15 )

Une préparation de ce plasmide a été testée en transformation chez S. faecalis OG1X. Les transformants sélectionnés sont apparus avec un à deux jours de retard par rapport aux transformants déjà obtenus avec les autres plasmides. Le taux de transformation était de  $6 \times 10^2$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA. Ils ont été repiqués sur milieu chloramphénicol 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et sur kanamycine 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , sans succès. L'expression du gène de résistance au chloramphénicol ne peut être mise en cause, ce gène étant le même que celui présent dans le pGK13 et étant parfaitement exprimé chez S. faecalis. Par contre, on peut mettre en doute la stabilité et le maintien du plasmide. Une hypothèse pourrait être la suivante : le plasmide serait maintenu dans la colonie issue de protoplastes, car les conditions sélectives ( 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) appliquées obligent son maintien pour la survie du protoplaste ; mais dès que les cellules récupèrent leur paroi, elles ne sont plus sensibles à 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de chloramphénicol. A ce moment, si le plasmide n'est présent qu'à un ou deux exemplaires par cellule et si sa répllication est difficile, il ne se maintiendra pas. Ce phénomène peut être défini comme une instabilité ségrégationnelle en l'absence de pression sélective. Ces données concordent avec l'impossibilité de transférer le pUB110 chez S. pneumoniae ( Espinosa et col.(1982)), dont l'origine de répllication de ce plasmide se retrouve dans le pSA33.



IV. Tests préliminaires de comparaison entre les trois souches recombinantes de S. faecalis OG1X

IV. 1. Comparaison de stabilité plasmidique

IV. 1. 1. Protocole utilisé

Une colonie isolée de chaque transformant sert à ensemençer 20 ml de THB supplémenté de 50 µg/ml d'érythromycine. La culture est arrêtée après 18 heures de croissance à 37° C ; un µl est prélevé et sert à inoculer 20 ml de THB sans antibiotiques, soit une dilution de  $2 \times 10^4$ . Cette culture où la pression de sélection exercée par l'érythromycine est supprimée est arrêtée après 18 heures, ce qui correspond à au moins 20 générations. Un µl de cette culture est prélevé et dilué jusqu'à  $10^{-6}$ ; un dixième de cette dilution est étalé sur boîte de pétri sans antibiotiques. Le nombre de colonies varie de 100 à 200 UFC par boîte. Ces colonies sont ensuite repiquées sur milieu sélectif afin de déterminer le nombre de colonies sensibles à l'antibiotique. Les colonies ont été également testées pour le caractère  $\alpha$ -amylolytique, car si le gène constitue un fardeau physiologique ou métabolique et si une mutation supprime son expression, les bactéries possédant un tel type de plasmide seront plus compétitives que les autres et une partie de la population bactérienne pourrait toujours être résistante à l'érythromycine sans pour autant posséder le caractère  $\alpha$ -amylolytique.

IV. 1. 2. Résultats

Cette étude a été menée à la fois sur les vecteurs vierges ( pVA838, pGKV2 et pGK13 ) et sur les vecteurs recombinants ( pVA $\alpha$  , pGKV2 $\alpha$  et pGK13 $\alpha$  ) ceci afin de déterminer l'existence d'une variation significative de stabilité possible liée à la présence du gène d'  $\alpha$ -amylase.

| souche                  | N   | n( EM <sup>S</sup> ) | % ( EM <sup>R</sup> ) | % ( $\alpha$ -amylase <sup>+</sup> )/<br>% ( EM <sup>R</sup> ) |
|-------------------------|-----|----------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------|
| <u>S. faecalis</u>      |     |                      |                       |                                                                |
| OG1X ( pVA838 )         | 130 | 1                    | 99.2                  | /                                                              |
| OG1X ( pVA $\alpha$ )   | 208 | 0                    | 100                   | 100                                                            |
| OG1X ( pGKV2 )          | 115 | 5                    | 95.7                  | /                                                              |
| OG1X ( pGKV2 $\alpha$ ) | 185 | 8                    | 95.7                  | 100                                                            |
| OG1X ( pGK13 )          | 200 | 3                    | 98.5                  | /                                                              |
| OG1X ( pGK13 $\alpha$ ) | 129 | 2                    | 98.4                  | 100                                                            |

N = taille de l'échantillon

n( EM<sup>S</sup> ) = nombre de colonies sensibles à l'érythromycine

% ( EM<sup>R</sup> ) = pourcentage de colonies résistantes à l'érythromycine

On n'a pas pu mettre en évidence une différence significative de stabilité entre les plasmides vierges et leur équivalent amylolytique. Il n'apparaît pas non plus de ségrégation entre la résistance à l'érythromycine et le caractère  $\alpha$ -amylolytique pour les transformants recombinants après plus de 40 générations ( 18 heures en conditions sélectives et 18 heures en conditions non sélectives ). Les deux marqueurs, EM<sup>R</sup> et  $\alpha$ -amylase<sup>+</sup>, sont perdus ensemble lors de la perte du plasmide, car les colonies EM<sup>S</sup> sont toutes  $\alpha$ -amylase négatives.



Il n'y a pas vraiment de différence de stabilité entre les trois groupes de plasmides ; on peut dire qu'ils sont bien maintenus au sein de l'hôte S. faecalis. Ces données sont compatibles avec celles déterminées pour le pGK12 chez S. lactis où par le même protocole et sur échantillon de 206 colonies, le pourcentage de colonies EM<sup>R</sup> était de 100 % (Kok et col.(1984)), et pour le pVA838 chez S. sanguis où le pourcentage de colonies EM<sup>R</sup> était supérieur à 99.9 % (30 générations en conditions non sélectives) (Macrina et col.(1982)).

L'étude de la stabilité plasmidique est un problème très complexe ; le protocole utilisé ne présente qu'une approche de cette problématique. Ce protocole pourrait lui-même être amélioré en augmentant le nombre de générations en conditions non sélectives et la taille des échantillons.

#### IV. 2. Tests préliminaires de dosage de l' $\alpha$ -amylase produite par les souches OG1X amylolytiques

La présence de halos de dégradation de l'amidon dans le milieu certifie l'expression du gène d' $\alpha$ -amylase dans les souches OG1X ( pVA $\alpha$  ), OG1X ( pGKV2 $\alpha$  ) et OG1X ( pGK13 $\alpha$  ), et ceci par rapport à une souche OG1X vierge ( non amylolytique ). Mais sur la base des colonies repiquées au même moment, il apparaît une différence significative de la taille du halo entre les colonies issues de OG1X ( pGK13 $\alpha$  ), OG1X ( pVA $\alpha$  ) et OG1X ( pGKV2 $\alpha$  ) ( fig 11 ). Cette différence est d'autant plus étonnante que le pGK13 $\alpha$  et le pGKV2 $\alpha$  sont issus du même réplicon naturel : le pW01 de S. cremoris WG2. On pourrait donc s'attendre à ce qu'ils manifestent un nombre de copies par cellule similaire. Mais l'environnement d'un gène est souvent déterminant pour son expression et il est possible que l'environnement du gène

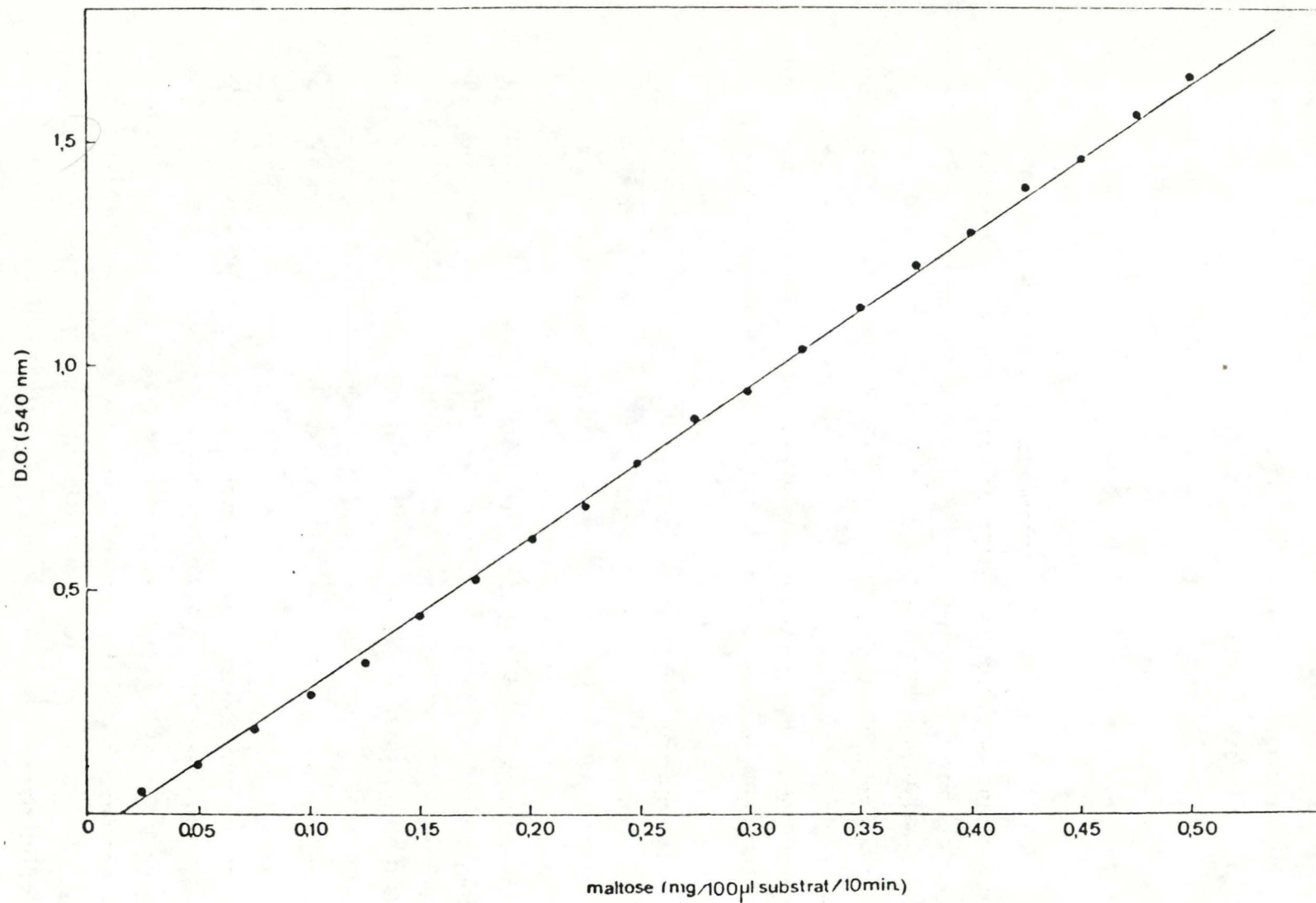


Figure 16 : Droite d'étalonnage pour les mesures d'activité amylase. Les valeurs mesurées en unités d'absorbance à 540 nm peuvent être converties en mg maltose / 100 µl / 10 min. (droite d'étalonnage établie au laboratoire de génétique microbienne U.C.L. ( Willemot K.))



d'  $\alpha$ -amylase dans le plasmide pGKV2 $\alpha$  soit défavorable à son expression, mais ceci n'est qu'une hypothèse. Une étude des séquences en aval du gène pourrait s'avérer utile pour vérifier cette hypothèse.

Il apparaît également une faible différence de taille des halos entre les colonies OG1X ( pVA $\alpha$  ) et OG1X ( pGKV13 $\alpha$  ), mais cette différence est difficilement quantifiable au niveau d'un halo si la taille de celui-ci est fonction de la taille de la colonie.

Une quantification relative de l'expression du gène peut être réalisée par un dosage de l'  $\alpha$ -amylase.

Une culture de 20 ml de THB supplémentée avec les concentrations en antibiotiques adéquates a été réalisée pour chaque souche OG1X amylolytique. Les trois cultures ont été arrêtées à la même DO ( 650 nm ) de 1.2. Les surnageants ont été prélevés après centrifugation et dosés par la méthode au DNS décrite dans " Matériels et méthodes ". Les trois valeurs de DO obtenues pour OG1X ( pVA $\alpha$  ), OG1X ( pGKV2 $\alpha$  ) et OG1X ( pGK13 $\alpha$  ) sont respectivement de 0.1060, 0.0563 et 0.0820. Ces trois valeurs sont très faibles et difficiles à reporter sur la droite-étalon ( fig 16 ), et une comparaison entre ces valeurs serait peu significative. Une solution pour affiner ce dosage serait de concentrer les surnageants, soit par dialyse contre du PEG 20000 ou par précipitation de l'  $\alpha$ -amylase avec du sulfate d'ammonium. L'amélioration de ce dosage n'a pas été réalisée car les investigations nécessaires à sa mise au point correcte furent limitées par le temps qu'il me restait pour réaliser ce travail.

C O N C L U S I O N      E T

P E R S P E C T I V E S



Une méthode développée très récemment par Wirth et col.(1986) permettant la transformation directe de proto-plastes de S. faecalis, et ceci avec des taux de transformation compris entre  $10^2$  et  $10^6$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA, suivant la nature du plasmide , a grandement facilité l'accessibilité de S. faecalis en tant qu'hôte de clonage. Cette technique entièrement nouvelle a été mise en oeuvre dans notre laboratoire dans le cadre de ce travail. Dans un premier temps, nous avons utilisé le plasmide pVA838, ce plasmide ayant déjà été éprouvé par les inventeurs de la méthode. La transformation avec le pVA838 s'est avérée moins efficiente qu'entre leurs mains, mais satisfaisante étant donné la moindre pureté du DNA utilisé ( préparations rapides ).

Deux nouveaux plasmides navettes, le pGKV2 et le pGK13 possédant déjà un spectre d'hôtes étendu ont été également utilisés au cours de ce travail, avec des taux de transformation inégalés avec du DNA provenant de préparations rapides. La valeur maximale en préparation rapide obtenue par Wirth et col. était de  $10^3$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA pour le pAM401, plasmide qui en préparation très purifiée donnait un taux de transformation de  $4 \times 10^6$  transformants par  $\mu\text{g}$  de DNA ( le maximum obtenu par Wirth et col. pour sept plasmides testés ).

Le clonage du gène d'  $\alpha$ -amylase de B. licheniformis n'a pas été directement réalisé chez S. faecalis mais plutôt chez E. coli comme hôte intermédiaire, ceci étant permis par une bonne répllication de ces trois plasmides chez cet hôte. Le clonage a été réalisé chez cette bactérie pour des raisons de facilités techniques : garantie de l'expression du gène et visualisation de celle-ci par le système simple de la coloration aux vapeurs d'iode.

Trois plasmides porteurs du gène d'  $\alpha$ -amylase ont été construits, le pVA $\alpha$  , le pGKV2 $\alpha$  et le pGK13 $\alpha$  . Ces trois plasmides ont transformé efficacement les protoplastes de S. faecalis. Les transformants de ces trois plasmides se sont avérés  $\alpha$ -amylase positifs. Donc, la machinerie de transcription et traduction s'est avérée capable de reconnaître les signaux portés par ce gène étranger originaire de Bacillus licheniformis, où à priori la compatibilité n'était pas assurée, car aucun travail de ce genre ne trouve son équivalent chez S. faecalis.

Sur la base de données semi-quantitatives observées au niveau de la taille des halos et des rendements de préparation rapide de DNA, associées au nombre de copies des vecteurs vierges déterminé dans d'autres espèces du genre Streptococcus, il nous a semblé intéressant de comparer entre eux les différents transformants. Des tests préliminaires d'étude de la stabilité plasmidique et du dosage de l'  $\alpha$ -amylase ont été entrepris, mais la poursuite de ceux-ci s'avère indispensable. A côté de l'étude de ces deux paramètres, la détermination du nombre de copies par cellule aussi bien pour les plasmides vierges que pour leur équivalent porteur du gène d'  $\alpha$ -amylase reste à faire chez S. faecalis. Les seules données actuellement déterminées dans le genre Streptococcus ont été réalisées chez S. sanguis et S. lactis, et ceci seulement pour les vecteurs à l'état non recombiné. La présence du gène d'  $\alpha$ -amylase au sein du plasmide affecte obligatoirement sa taille et probablement l'environnement des séquences de réplication; ces deux paramètres pourraient influencer le nombre de copies du plasmide par cellule.

Un problème physiologique important n'a pas été abordé dans ce travail : l'exportation de l'  $\alpha$ -amylase chez S. faecalis. L'  $\alpha$ -amylase originaire d'un genre différent du genre Streptococcus pose la question d'une compatibilité des systèmes d'exportation. La séquence signal présente dans la pré- $\alpha$ -amylase joue-t-elle un rôle similaire à celui rencontré chez B. licheniformis ? Une approche génétique peut être envisagée pour déterminer le rôle de cette séquence chez



S. faecalis. La construction d'un plasmide porteur du gène d'  $\alpha$ -amylase délété pour la partie de ce gène codant pour la séquence signal a été réalisée chez E. coli ( mémoire O. Laloux.(1987)). Un transfert de ce gène délété chez S. faecalis est réalisable au moyen d'un des plasmides navettes décrits dans ce travail. Un dosage intra- et extra-cellulaire de l'  $\alpha$ -amylase pourra nous éclairer sur l'effi-cience potentielle de cette séquence signal chez S. faecalis. Dès qu'une méthode de transformation est accessible pour un nouvel organisme, les techniques de clonage utilisées pour les autres organismes peuvent lui être appliquées. Une nou-velle approche génétique et physiologique est réalisable. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires assurant la sécrétion des protéines est accessible via des gènes propres à S. faecalis. Pour donner un exemple, on pourrait isoler par complémentation un gène codant pour une protéase ( géla-tinase ) exportée présente dans la souche OG1RF et non dans la souche OG1X. Ce gène pourrait ensuite être caractérisé structurellement et fonctionnellement.

Ces études génétiques fondamentales sont nécessaires avant d'envisager une application pratique de S. faecalis dans l'ensilage, car dans le cadre d'une application, l'approche génétique vise à optimiser des paramètres tels que l'exporta-tion ou l'expression du gène. L'optimisation des caractères propres au gène doit être associée à une étude des vecteurs de clonage. Une recherche doit être menée vers l'exploitation de plasmides à nombre de copies élevé par cellule. On veillera à ce que le plasmide et son gène soient maintenus de manière stable au sein de S. faecalis et ceci tout en conservant une expression maximale du gène sans traumatisme physiologique pour l'hôte.

L'objectif que nous nous étions assigné au début de ce travail a été atteint : nous avons pu démontrer la faisabilité du projet en créant une souche amylolytique de S. faecalis. Cependant, un ensemble d'améliorations génétiques doivent encore être réalisées.

Lorsque celles-ci seront effectuées, on pourra alors seulement envisager une recherche des partenaires adéquats, c'est à dire sélectionner une souche de S. faecalis compétitive au sein de l'ensilage et rechercher l'amylase la plus efficace dans les conditions règnant dans l'ensilage. L'utilisation du couple souche-gène le plus approprié devra encore être précédé d'essais en silo de laboratoire avant d'envisager son utilisation dans le conditionnement d'un additif d'ensilage.



## BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN W. G., SPRADLIN J. E. (1974) Amylases and their properties.  
Brewers Digest 49, 48-52.
- BACHMAN B. J. (1983) Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7.  
Microbiol. Rev. 47, 180-230.
- COHEN S. N., CHANG A. C. Y., HSU L. (1973) Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria, genetic transformation of Escherichia coli by R factor DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110.
- DAVIS B. D., DULBCCO R., EISEN H. N., GINSBERG H. S., BARRYWOOD Jr. W. (1970) Microbiology.  
Harper ( Hoeber medical division ), New-York.
- DELPECHIN A. (1984) Syllabus de microbiologie générale  
Les bactéries 1. Caractères généraux, structure, physiologie.  
FNNDP Namur.
- DURAND G., MONSAN P., (SICARD P.) (1982) Les enzymes : production et utilisation industrielle.  
Gauthier-Villars ( Bordas ), Paris.
- ESPINOSA M., LOPEZ P., PEREZ-VREÑA M. T., LACKS S. A. (1982)  
Interspecific plasmid transfer between Streptococcus pneumoniae and Bacillus subtilis.  
Mol. Gen. Genet. 188, 195-201.
- FISCHER E. H., STEIN E. A. (1961)  $\alpha$ -amylase from human saliva.  
Biochem. prep. 8, 27-33.
- GRAY G. L., MAINZER S. E., REY M. W., LAMSA M. H., KINDLE K. L., CARMONA C., REQUADT C. (1986) Structural genes encoding the thermophilic  $\alpha$ -amylases of Bacillus stearothermophilus and B. licheniformis.  
J. Bacteriol. 166, 635-643.
- GRIFFIN P. J., FOGARTY W. M. (1973) Dimethyl sulphoxide as a solvent for amylose in the determination of amylolytic activity.  
J. App. Chem. Biotechnol. 23, 297-300.

- HOLMES, QUIGLEY, (WILIMZIG M.) (1985) LiCl-boiling method for plasmid mini-preps.  
Trends Genet. 1 (6), 158.
- HOPWOOD D. A. (1981) Genetic studies with bacterial protoplasts.  
Ann. Rev. Microbiol. 35, 237-272.
- ISH-HOROWICZ D., BURKE J.F. (1981) Rapid and efficient plasmid cloning.  
Nucleic Acids Res. 9, 2989-2998.
- KOK J., VAN DER VOSSEN J. M. B. M., VENEMA G. (1984) Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in Bacillus subtilis and Escherichia coli.  
Appl. Environ. Microbiol. 48, 726-771.
- KONDO J. K., Mc KAY L. L. (1984) Plasmid transformation of Streptococcus lactis protoplasts : optimization and use in molecular cloning.  
Appl. Environ. Microbiol. 48, 252-259.
- LEE-WICKNER L. J., CHASSY B. M. (1984) Production and regeneration of Lactobacillus casei protoplasts.  
Appl. Env. Microbiol. 48, 994-100.
- LEHNINGER A. L. (1985) Principes de Biochimie.  
Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- LEWIN B. (1985) Genes II Chap. 7, Chap. 12.  
John Wiley & sons, Inc, New-York.
- LIN Y. L., BLASCHEK H. P. (1984) Transformation of heat treated Clostridium acetobutylicum protoplasts with pUB110 plasmid DNA.  
Appl. Environ. Microbiol. 48, 737-742.
- Mc DONALD (1981) The biochemistry of silage.  
John Wiley & sons, Ltd., Chichester.
- Mc DONALD (1982) silage fermentation.  
Trends Biochem. sci. 7, 164-166.
- MACRINA F. L., TOBIAN J. A., JONES K. R., EVANS R. P., CLEWEL D. B. (1982) A cloning vector able to replicate in Escherichia coli and Streptococcus sanguis.  
Gene 19, 345-353.



- MANIATIS T., FRITSCH E. F., SAMBROOK J. (1984) Molecular cloning : a laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory, New-York.
- ORTLEPP S. A., OLLINGTON J. F., Mc CONNELL D. J. (1983) Molecular cloning in Bacillus subtilis of a Bacillus licheniformis gene encoding a thermostable alpha amylase.  
Gene 23, 267-276.
- PIGGOTT P. J., HOCH J. A. (1985) Revised genetic linkage map of Bacillus subtilis.  
Microbiol. Rev. 49, 158-179.
- PIGGOTT R. P., ROSSITER A., ORTLEPP S. A., PEMBROKE J. T., OLLINGTON J. F. (1984) Cloning in Bacillus subtilis of an extremely thermostable alpha-amylase : comparison with other cloned heatstable alpha-amylases.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 175-183.
- POUWELS P. H., VALK B. E. E., BRAMMAR W. J. (1985) Cloning vectors : a laboratory manual.  
Elsevier, Amsterdam.
- RODRIGUEZ R. L., TAIT R. C. (1983) Recombinant DNA techniques , an introduction.  
Addison-Wesley, London.
- ROSE A. H., (FOGARTY W. M., KELLY C. T.) (1980) Microbial enzymes and bioconversions.  
Academic press, London.
- SAITO N. (1973) A thermophilice extracellular alpha-amylase from Bacillus licheniformis.  
Arch. Biochem. and Biophys. 1155, 290-298.
- SCHLEIFER K. H., KILPPER-BALZ R. (1984) Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.  
International J. System. Bacteriol. 34, 31-34.

- SHARP P. A., SUGDEN B., SAMBROOK J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose- ethidium bromide electrophoresis.  
Biochemistry 12, 3055-3063.
- SKINNER F. A., QUESNEL L. B. (1978) Streptococci  
Academic press, inc ( Ltd ), London.
- SMITH M. D. (1985) Transformation and fusion of Streptococcus faecalis protoplasts.  
J. Bacteriol. 162, 92-97.
- STEPHENS M. A., ORTLEPP S. A., OLLINGTON J. F., Mc CONNELL J. F. (1984) Nucleotide sequence of the 5' region of the Bacillus licheniformis  $\alpha$ -amylase gene : comparison with the B. amyloliquefaciens gene.  
J. Bacteriol. 158, 369-372.
- STEWART P. R., LETHAM D. S., (POULSON R.) (1977) The ribonucléic acids  
Springer-Verlag, New-York.
- VANBELLE M., BERTIN G. (1985) L'ensilage : aspects biologiques nouveaux.  
Sanofi Santé Animale, I.R.S.I.A., Paris
- VANBELLE M., (GOUET Ph.) (1985) L'ensilage : nouveaux aspects biologiques ( symposium ).  
Sanofi Santé Animale, Paris.
- VAN DER VOSSSEN J. M. B. M., KOK J., VANEMA G. (1985)  
Construction of cloning, promotor-screening and terminator-screening shuttle vectors for Bacillus subtilis and Streptococcus lactis.  
Appl. Env. Microbiol. 50, 540-542..
- WILLEMOT K. (1986) Thèse de doctorat : Etude physiologique et génétique de deux  $\alpha$ -amylases de Bacillus (B. megatorium et B. coagulans ) dont les gènes ont été clonés chez Escherichia coli et Bacillus subtilis  
UCL, Faculté des sciences, unité de génétique,  
Laboratoire de génétique microbienne.



- WILLIAMSON R., GUTMANN L., HORAUDT T., DELBOS F., ACAR J. F.  
(1986) Use of Penicillin-binding Proteins for the  
Identification of Enterococci  
J. General Microbiol. 132, 1929-1937.
- WIRTH, AN F. Y., CLEWEL D. B. (1986) Highly efficient protoplast  
transformation system for Streptococcus faecalis and  
a new Escherichia coli-S. faecalis shuttle vector.  
J. Bacteriol. 165, 831-836.
- WOOLFORD M. K. (1984) The silage fermentation.  
Marcel Dekker, inc , New-York.
- YUUKI T., NOMURA T., TEZUKA H., TSUBOI A., YAMAGATA H.,  
TSUKAGOSHI N., UDAKA S. (1985) Complete nucleotide  
sequence of a gene coding for heat and pH-stable  
 $\alpha$ -amylase of Bacillus licheniformis : comparison  
of amino-acid sequences of these bacterial liquefying  
 $\alpha$ -amylases deduced from the DNA sequence.  
J. Biochem. 98, 1147-1156.