

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN
MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

LUC BOURBONNIÈRE

ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE *STREPTOMYCES EXFOLIATUS*
PRODUISANT UN SYSTÈME D'ENZYMES LYTIQUES PARTIELLEMENT
ACTIF SUR *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS*, UNE BACTÉRIE
MÉTHYLOTROPHE PRODUCTRICE DE PHB

MARS 1993

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
SOMMAIRE	xiv
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	4
1. Les plastiques et l'environnement	5
2. Les solutions actuelles	6
3. Une autre solution: les plastiques dégradables	9
3.1. Les plastiques photodégradables	9
3.2. Les plastiques biodégradables	13
4 Les polyhydroxyalcanoates (PHA)	18
4.1. Historique des polyhydroxyalcanoates	18
4.2. Rôles des polyhydroxyalcanoates	23
4.3. Synthèse chimique des polyhydroxyalcanoates	24
4.4. Biosynthèse des polyhydroxyalcanoates	24
4.5. Biologie moléculaire de la production des PHA	30
4.6. Biodégradation intracellulaire des PHA	32
4.7. Biodégradation extracellulaire des PHA	33
4.8. Propriétés des PHA	33
4.9. Production industrielle des PHA	36
4.10. Extraction des PHA	38
4.10.1. Extraction chimique	38
4.10.2. Extraction mécanique	40
4.10.3. Extraction enzymatique	41
OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	51

MATÉRIEL ET MÉTHODES	52
1. Microorganismes utilisés et leur conservation	53
1.1. Microorganismes utilisés	53
1.2. Conservation de ces microorganismes	53
2. Production de cellules (biomasse) de <i>Methylobacterium extorquens</i>	54
2.1. Production de cellules de <i>Methylobacterium extorquens</i> contenant peu ou pas de PHB	54
2.2. Production de cellules de <i>Methylobacterium extorquens</i> contenant du PHB	55
2.2.1. Cellules requises pour l'isolement des souches lytiques	55
2.2.2. Cellules requises pour certains tests de lyse	56
2.3. Évaluation de la quantité de cellules (biomasse) de <i>Methylobacterium extorquens</i>	56
3. Milieux de culture utilisés	57
3.1. Milieu Choi #2	57
3.2. Milieu Mex	57
3.3. Milieu CASO	59
3.4. Bouillon Nutritif	59
4. Isolement de souches lytiques actives sur des cellules tuées (chauffées) de <i>Methylobacterium extorquens</i>	59
4.1. Enrichissement en microorganismes lytiques	60
4.2. Isolement de microorganismes lytiques	60
4.3. Criblage des souches lytiques les plus actives	63
5. Production d'enzymes lytiques et détermination de l'activité lytique	63
5.1. Production d'enzymes lytiques	63
5.2. Détermination de l'activité lytique	64
5.3. Optimisation partielle des conditions réactionnelles.	65

6.	Détermination des divers activités enzymatiques du système lytique	66
6.1.	Activité protéolytique.	66
6.2.	Activité N-acétyl-glucosaminidase	67
6.3.	Activité lysozyme	68
6.4.	Activité estérase	68
7.	Identification de la souche lytique retenue	69
7.1.	Coloration de Gram	69
7.2.	Identification de l'isomère d'acide diaminopimélique (DAP)	69
7.3.	Identification de l'espèce: études morphologiques et physiologiques	70
8.	Observations au microscopie électronique à transmission (MET)	74
9.	Ajout d'agents chimiques pour l'amélioration de la lyse de cellules de <i>M. extorquens</i> avec PHB 75	75
10.	Détermination de la quantité de protéines dans les surnageants de culture	76
	RÉSULTATS	78
1.	Isolement d'une souche lytique contre <i>Methylobacterium extorquens</i>	79
1.1.	Premier essai d'isolement d'une souche lytique contre <i>M. extorquens</i>	79
1.2.	Deuxième essai d'isolement d'une souche lytique contre <i>M. extorquens</i>	85
1.3.	Criblage des souches pour la production d'enzymes en milieu liquide	85
2.	Identification de la souche No. 10	91
2.1.	Observations visuelles et microscopiques de la souche No. 10.	91
2.2.	Détermination de l'isomère de DAP dans la paroi de la souche No. 10	93

2.3.	Détermination de l'espèce	93
3.	Optimisation des conditions de lyse	98
3.1.	Détermination du pH optimal	103
3.2.	Détermination de la température optimale	103
3.3.	Effets de divers ions sur l'efficacité de la lyse	105
3.4.	Cinétique de la production des enzymes lytiques (système lytique)	108
3.5.	Effet de la concentration en enzyme sur l'efficacité de la lyse	112
3.6.	Détermination du profil enzymatique du système lytique brut dérivé de <i>S. exfoliatus</i>	113
4.	Essais de lyse de cellules de <i>M. extorquens</i> contenant des granules de PHB	113
4.1.	Effet du prétraitement à la chaleur sur l'efficacité de la lyse	117
4.2.	Evaluation par microscopie électronique à transmission de l'efficacité du traitement aux enzymes lytiques	119
4.3.	Digestions répétées de cellules contenant des granules de PHB	125
4.4.	Influence de l'ajout de divers détergents sur la lyse des cellules	126
	DISCUSSION.	130
	CONCLUSIONS	144
	REMERCIEMENTS	148
	BIBLIOGRAPHIE	149

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1: Variété des bactéries productrices de poly- β -hydroxyalcanoates (D'après Brandl <i>et al.</i> , 1990)	19
Tableau 2: Propriétés physiques et chimiques du polypropylène (PP) et du poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (D'après Brandl <i>et al.</i> , 1990)	35
Tableau 3: Quelques systèmes d'enzymes bactériolytiques (D'après Andrews et Asenjo (1987))	49

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 4: Composition du milieu Choi #2	58
Tableau 5: Description des échantillons de sol utilisés lors de l'isolement de la souche lytique	62

RÉSULTATS

Tableau 6: Description des souches retenues lors du deuxième isolement	86
Tableau 7: Résultats d'analyses physiologiques et biochimiques faites sur la souche No. 10	101
Tableau 8: Effets de divers ions (sels) sur l'activité du système enzymatique lytique présent dans le surnageant brut de <i>S. exfoliatus</i> . Les tests de lyse étaient effectués à 50°C, pH 8,0 dans du tampon phosphate à 50 mM	107
Tableau 9: Profil enzymatique partiel du système lytique brut de <i>S. exfoliatus</i> produit dans le bouillon CASO.	116

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

- Figure 1: Photodégradation des plastiques par photo-oxydation (D'après Klemchuk, 1990). 10
- Figure 2: Photodégradation des plastiques par photolyse (D'après Klemchuk, 1990) 12
- Figure 3: Décomposition enzymatique des acides gras (D'après Klemchuk, 1990) 15
- Figure 4: Oxydation du cyclohexanone par l'acide peracétique lors de la synthèse industrielle du ϵ -caprolactone (D'après Pitt, 1990) 17
- Figure 5: Micrographies électroniques de cellules de *M. extorquens* avec peu ou pas de PHB, en phase exponentielle (A) et avec des quantités appréciables de PHB, en phase stationnaire (B). La barre représente 0,5 μ m 20
- Figure 6: Voie métabolique générale de la biosynthèse et de la biodégradation du PHB (D'après Lafferty et al., 1988). (1) 3-cétothiolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, (3) PHB synthétase, (4) PHB dépolymérase, (5) dimère hydrolase, (6) déshydrogénase NAD⁺-spécifique, (7) acétoacétate: succinate-CoA transférase 25
- Figure 7: Voie métabolique de la biosynthèse des PHA chez *P. oleoverans* (D'après Doi, 1990). (1) 3-cétothiolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, NADPH dépendante, (3) acétoacétyl-CoA réductase, NADH dépendante, (4) PHA synthétase 27
- Figure 8: Régulation de la biosynthèse et de la biodégradation du PHB par divers intermédiaires du métabolisme de *Alcaligenes eutrophus* H16 (D'après Lafferty et al., 1988) 29
- Figure 9: Organisation de l'opéron *phb* chez *Alcaligenes eutrophus* permettant la production de PHB (D'après Steinbüchel et Schlegel, 1991) 31

- Figure 10: Structure chimique du peptidoglycan. (G): N-acétyl-glucosamine, (M): acide N-acétyl-muramique, (X): pont (D'après Sleyter et al., 1988) 44
- Figure 11: Structure de la paroi des bactéries Gram-positives. P: protéine, PL: phospholipide (D'après Sleyter et al., 1988) 45
- Figure 12: Structure de la paroi des bactéries Gram-négatives. P: protéine, PL: phospholipide, LP: lipoprotéine, LPS: lipopolysaccharides (D'après Sleyter et al., 1988) 47

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Figure 13: Schéma décrivant la procédure d'isolement de la souche lytique sélectionnée 61

RÉSULTATS

- Figure 14: Zones d'éclaircissement sur gélose Mex, indiquant la digestion au moins partielle de cellules chauffées de *M. extorquens* causées par divers micro-organismes provenant d'un échantillon de sol de Ville Lasalle 80
- Figure 15: Zones d'éclaircissement entre une souche isolée supposément "lytique" (a) et une culture contaminante (b) sur gélose Mex 83
- Figure 16: Souche No. 10 sur gélose Mex. (a) gélose inoculée; (b) gélose non-inoculée (contrôle); (c) gélose inoculée en (a) à plus fort grossissement montrant les petits mycéliums aériens 87
- Figure 17: Diminution de la densité optique à 600 nm d'une suspension de cellules de *Methylobacterium extorquens* traitée à la chaleur (121°C, 20 minutes) et incubée avec le surnageant de la souche No.10 (●) ou dans du tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7,0 (○). Les cellules étaient resuspendues dans le tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7,0, et la réaction avait lieu à 37°C. Le rapport suspension/surnageant était 1:1 90

- Figure 18: Inactivation thermique de l'activité "lytique" présente dans le surnageant de culture de la souche No. 10 après des traitements de 0 (●), 5 (◆), 10 (▲) et 15 minutes (+) à 100°C. Le contrôle est représenté par le symbole (■) . 92
- Figure 19: Chromatographie en couche mince de l'hydrolysât de la souche No. 10. (1,3) = standard de DL-DAP (ou méso-DAP) contenant des traces de LL-DAP; (2,4) = hydrolysât de la souche No. 10. 94
- Figure 20: Souche No. 10 sur gélose gruau (a) et à plus fort grossissement (b) 96
- Figure 21: Chaîne de spores *rectiflexibles* de la souche No. 10 et filaments (a). Même chaîne à plus fort grossissement (b) (Grossissement à 1000 X) 99
- Figure 22: Détermination du pH optimal pour la lyse de cellules de *M. extorquens* par le surnageant dérivé de *S. exfoliatus* (souche No. 10). Les cellules de *M. extorquens* avec peu ou pas de PHB avaient d'abord été traitées à la chaleur (121°C, 15 min.). Le mélange était incubé pendant 2 heures. (●,○): tampon citrate de sodium; (■,□): tampon phosphate de sodium; (◆,◇): tampon Tris-HCl; (▲,Δ): tampon carbonate de sodium. Symboles pleins = avec surnageant; symboles vides = avec tampon (contrôle) 104
- Figure 23: Détermination de la température optimale pour la lyse de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur (121°C, 15 min.) par le surnageant dérivé de *S. exfoliatus* (souche No.10). Les cellules de *M. extorquens* ne contenaient pas ou peu de PHB. Le mélange était incubé pendant 0,5 h (●), 1 h (■) et 2 h (▲) à un pH final de 7,67. Seuls les résultats à 2 h sont présentés (Δ) pour les contrôles, les résultats étant similaires pour les autres temps 106

- Figure 24: Cinétique de croissance et de production du système d'enzymes lytiques par *S. exfoliatus*. Le milieu employé était le bouillon Mex additionné de 1% (p/v) d'extrait de levure. La culture avait lieu dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu, à 30°C, avec une agitation de 300 rpm 109
- Figure 25: Cinétique de croissance et de production du système d'enzymes lytiques par *S. exfoliatus* sur milieu CASO (sans cellules de *M. extorquens*). La culture a eu lieu dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu, à 30°C, et avec une agitation de 300 rpm . . . 111
- Figure 26: Influence de la concentration d'enzymes lytiques sur le degré de lyse d'une suspension de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur (121°C, 15 minutes). Les cellules contenaient peu ou pas de PHB. La préparation d'enzymes lytiques provenait d'un surnageant de *S. exfoliatus* cultivé dans le milieu CASO. La réaction avait lieu à pH 8,0, 50°C, avec une agitation de 250 rpm dans du tampon phosphate de sodium (50 mM) 114
- Figure 27: Évidence de la présence d'une activité protéolytique dans le système d'enzymes lytiques brut dérivé de *S. exfoliatus*. La réaction avait lieu à 37°C, dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), avec une agitation de 200 rpm. (●, avec enzymes; ○, contrôle avec le tampon) 115
- Figure 28: Influence du prétraitement thermique des cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB sur le degré de lyse de ces cellules par le système lytique brut de *S. exfoliatus*. La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8,0) avec une agitation de 200 rpm. (●,○)121°C, (◆,◇)100°C, (▲,Δ) 85°C et (■,□) 25°C. Symbole plein: cellules+enzymes; symbole vide: cellules+tampon (contrôle) 118

- Figure 29: Micrographies électroniques à divers temps d'incubation de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur puis avec le système lytique de *Streptomyces exfoliatus* : (a) à temps zéro (45 000 X); (b) à 5 heures (60 000 X); (c) à 5 heures (contrôle) (51 000 X); (d) à 24 heures (45 000 X); (e) à 24 heures (contrôle) (45 000 X); (f) à 24 heures (90 000 X). 120
- Figure 30: Influence de l'ajout de divers détergents sur la lyse (baisse de densité optique à 600 nm) de cellules de *M. extorquens* traitées par le système lytique de *S. exfoliatus* (2 UL/mL) La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8,0) à une agitation de 250 rpm 127
- Figure 31: Effet de diverses concentrations du détergent Brij 78 sur la baisse de densité optique à 600 nm en présence (●) ou en absence (○) du système lytique. La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8,0), avec 2 UL/mL du système lytique, et à une agitation de 250 rpm 129

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	:	acide aminé
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ala	:	alanine
ARN	:	acide ribonucléique
Btu	:	British thermal units
C/N	:	carbone/azote
cmc	:	critical micelle concentration
Da	:	dalton
DAP	:	acide diaminopimélique
EDTA	:	éthylènediaminetétraacétate
EPA	:	"Environmental Protection Agency"
glu	:	acide glutamique
HB	:	hydroxybutyrate
HDPE	:	polyéthylène de haute densité
HV	:	hydroxyvalérate
LP	:	lipoprotéine
LPS	:	lipopolysaccharides
MJ	:	mégajoule
4-MUADG	:	4-méthylumbelliféryl-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside
4-MUTC	:	4-méthylumbelliféryl-N,N',N''-triacétyl- β -chitotrioside
NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
P	:	protéine
PET	:	téraphtalate de polyéthylène
PHA	:	poly- β -hydroxyalcanoate(s)
PHB	:	poly- β -hydroxybutyrate
P(HB/HV)	:	poly- β -hydroxybutyrate/ β -hydroxyvalérate
PL	:	phospholipide
PNPA	:	p-nitrophénylacétate
PP	:	polypropylène
PRF	:	"Plastics Recycling Foundation"
p/v	:	poids/volume
PVC	:	chlorure de polyvinyle

rpm	:	rotations par minute
SDS	:	sodium dodécyle sulfate
SPI	:	"Society of the Plastic Industry, Inc."
<i>Stp</i>	:	<i>Streptomyces</i>
Tris	:	tri(hydroxyméthyl)aminoéthane
UL	:	unités lytiques
U.-V.	:	ultra-violet
v/v	:	volume/volume

SOMMAIRE

Les poly- β -hydroxyalcanoates (ou PHA) sont des biopolymères biodégradables retrouvés chez de nombreuses bactéries sous forme de granules intracellulaires. Ces polyesters naturels, de par leurs propriétés physico-chimiques, possèdent un intérêt industriel important. Plusieurs facteurs détermineront le coût final des PHA: équipements, substrat de fermentation, traitement des effluents et extraction. L'extraction des PHA joue un rôle majeur dans leur coût final; l'utilisation de solvants pour les extraire est coûteuse, polluante et potentiellement dangereuse. Il serait donc intéressant d'avoir une alternative "verte" à l'extraction par les solvants; une approche possible est l'utilisation d'un système lytique spécifique à la bactérie productrice afin de digérer le matériel cellulaire non-PHA et ainsi extraire et purifier les granules de PHA.

L'objectif général de ce projet était d'isoler un microorganisme produisant des enzymes lytiques actives sur *Methylobacterium extorquens*, la bactérie utilisée dans ce projet pour la production d'un type de PHA, le poly- β -hydroxybutyrate (ou PHB), à partir du méthanol comme substrat. On envisageait ainsi d'identifier ce nouveau microorganisme lytique, d'effectuer des tests d'extraction des granules de PHB avec les enzymes lytiques produites par ce microorganisme et, s'il y a lieu, améliorer les conditions d'extraction des granules.

À partir de divers échantillons de sols pris dans la région de Montréal, 10 isolats se sont montrés capables de causer des zones de lyse dans des géloses contenant des cellules de *M. extorquens* traitées à la

chaleur. Une seule de ces souches, la souche No. 10, était capable de produire une quantité appréciable d'enzymes lytiques en milieu liquide. Grâce à l'utilisation de techniques chemotaxonomiques, cette souche a été identifiée comme étant *Streptomyces exfoliatus*. La lyse des cellules était optimale à un pH de 8,0 et à une température de 50°C. Aucun des sels (ions) étudiés n'avait d'effet positif sur la lyse à des concentrations de 1 mM ou 10 mM; les ions Hg^{++} , Ni^{++} et Cr^{++} étaient inhibiteurs à la concentration 1 mM. Le système lytique possédait les activités enzymatiques suivantes: N-acétylmuramidase (lysozyme), protéase, estérase et N-acétyl-glucosaminidase. Les essais de lyse sur des cellules contenant une quantité importante de PHB ont démontré que le système lytique brut de *S. exfoliatus* avait un effet certain sur la paroi de *M. extorquens* mais ne permettait pas la libération complète des granules de PHB. Des études en microscopie électronique à transmission ont été effectuées afin de confirmer l'effet du système lytique sur la paroi des cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur et contenant du PHB. Après cinq heures d'incubation avec le système lytique brut, des structures étaient bien visibles sur la paroi, correspondant peut-être à des filaments de peptidoglycane se détachant de la surface bactérienne. Après 24 heures, la paroi était devenu floue. L'ajout de détergents et d'EDTA n'a pas permis une amélioration de la digestion du matériel non-PHB.

Le système lytique de *S. exfoliatus* avait donc un effet sur la paroi de cellules tuées de *M. extorquens* mais ne réussissait pas toutefois à extraire complètement les granules de PHB. Des études plus poussées, soit avec le système lytique seul soit après la combinaison de ce système avec d'autres techniques d'extraction (mécaniques, chimiques, etc.) permettront peut-

être de réaliser une extraction plus complète des granules de PHB. De plus, la souche isolée pourrait produire d'autres produits d'intérêt industriel retrouvés chez divers actinomycètes (antibiotiques, enzymes autres que lytiques, etc.); il pourrait donc être intéressant d'examiner plus à fond cette nouvelle souche de *S. exfoliatus*.

INTRODUCTION

Les plastiques existants posent de nombreux problèmes du point de vue environnemental car ils sont, pour ainsi dire, réfractaires au processus de dégradation naturelle. Ceux-ci tendent donc à s'accumuler dans les dépotoirs et dans le milieu en général. Pour remédier à cette situation, plusieurs types de plastiques dégradables ont été développés. Les plastiques photodégradables, par exemple, sont dégradés par l'action des rayons ultra-violets de la lumière tandis que les plastiques biodégradables sont dégradés par les enzymes provenant des microorganismes de l'environnement.

Les polyhydroxyalcanoates (ou PHA) sont des polymères biodégradables retrouvés chez divers procaryotes sous forme de granules intracellulaires, lesquels servent de matériel de réserve pour la cellule. De par leurs propriétés physiques, ces polyesters naturels sont très proches des thermoplastiques tel le polypropylène et possèdent donc un intérêt commercial important. Ces polyesters naturels et biodégradables sont cependant encore très dispendieux et de sérieux efforts sont présentement faits afin d'en réduire le coût.

Plusieurs facteurs affectent le coût final des PHA, tels le substrat, les équipements utilisés, le traitement des effluents provenant de la fabrication des PHA, et l'extraction des PHA. Ce dernier point est important puisqu'il peut représenter le tiers des coûts du produit (Page, 1992). L'utilisation de solvants pour extraire les PHA peut s'avérer coûteuse de par les volumes utilisés et pourrait même être sérieusement nuisible pour

l'environnement en cas de déversement. Une alternative intéressante est l'utilisation d'enzymes diverses pour digérer le matériel cellulaire non-PHA entourant les granules. Le poly- β -hydroxybutyrate (PHB) appartient à la classe des PHA et est produit par de nombreuses bactéries. Afin d'extraire et purifier le PHB, un traitement aux enzymes peut être avantageux lorsque le PHB (ou d'autres PHA) n'a pas à être absolument pur (ou presque). Jusqu'ici, cependant, on a semblé se contenter d'utiliser des enzymes non-spécifiques, produites pour d'autres fins que celles de l'extraction des PHA. Un tel procédé a été breveté par la firme ICI de Grande-Bretagne (Holmes et Lim, 1988).

Afin d'extraire et de purifier partiellement le PHB (ou les PHA), une autre approche serait l'utilisation d'un système enzymatique lytique spécifique à la bactérie productrice de PHB (ou de PHA). De tels systèmes "lytiques" existent déjà pour divers microorganismes (bactéries et levures) et permettent l'extraction de plusieurs produits intracellulaires (enzymes, pigment, etc) tel que rapporté par Andrews et Asenjo (1987).

Si disponible, un tel système lytique spécifique pourrait être plus efficace que les enzymes non-spécifiques présentement utilisées, et pourrait même être produit sur place en utilisant comme milieu de base, du moins en partie, le matériel cellulaire résiduel suite à l'extraction du biopolymère désiré. Dépendamment de son activité, le système lytique spécifique pourra être utilisé seul ou combiné à d'autres méthodes d'extraction et de purification (agent chimique, mécanique, etc.). Aussi, de tels systèmes lytiques pourraient être utilisés avec d'autres bactéries productrices de PHA (ex.: *Alcaligenes eutrophus*) ou avec diverses

bactéries productrices de produits intracellulaires d'intérêt industriel (corps d'inclusion chez les bactéries recombinantes, pigment, etc.). Les systèmes lytiques possèdent donc un certain attrait pour l'extraction de divers produits retrouvés dans la cellule.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Les plastiques et l'environnement

L'élimination des déchets solides, tant industriels que domestiques, est maintenant devenue un problème de grande actualité, surtout depuis les 10 dernières années. Par exemple, les États-Unis ont généré 320 millions de tonnes de déchets en 1988, soit une tonne et demie de déchets pour chaque Américain (Thayer, 1989). La "Environmental Protection Agency" (EPA) a estimé que ce chiffre atteindra 380 millions de tonnes d'ici l'an 2000. On a calculé que 85% de ces rebuts solides sont éliminés dans des sites d'enfouissement et que seulement 10% sont recyclés et 5% sont incinérés; la situation, de plus, se complique dû au fait que le nombre de ces sites diminue continuellement. Par exemple, en 1979, on comptait plus de 18 000 sites aux États-Unis; en 1985, ce chiffre est passé à 9000 pour aboutir, en 1990, à moins de 4500 sites (Wood, 1990). Aussi, le coût du transport et de l'entreposage de ces déchets a considérablement augmenté, atteignant les 150\$ (É.-U.) par tonne dans certaines régions des États-Unis (Voss, 1989).

Les déchets plastiques comptent pour environ 7% du poids des déchets solides mais pour 30% du volume (Thayer, 1989), un fait important à noter. Les plastiques sont donc en partie responsables du problème actuel de gestion des déchets. De par leur nature essentiellement non-biodégradable, les plastiques se dégradent très peu dans les sites d'enfouissement actuels et dans l'environnement en général. Ces déchets polluent ainsi plusieurs écosystèmes, de façon persistante, et causent de nombreux problèmes pour la faune. Pour 1987 uniquement, on estime à 1 million le nombre d'oiseaux et à 100 000 le nombre de mammifères

marins qui sont morts après l'ingestion d'objets en plastique ou par étranglement dû aux anneaux de retention (6-pack) (Anon, 1987). Les problèmes reliés aux déchets plastiques nuisent présentement à l'image de l'industrie et celle-ci ne peut se permettre d'ignorer ces faits.

2. Les solutions actuelles

De par leur grande visibilité, les déchets plastiques sont un des points de mire de la problématique de la gestion des rebuts solides. Depuis un certain nombre d'années, les gouvernements et l'industrie ont développé un ensemble de solutions diverses permettant une certaine amélioration dans la gestion des rebuts solides.

Selon la Société des Industries du Plastique du Canada (la S.P.I., en anglais), qui regroupe 20% des entreprises de ce secteur (Lestage, 1990), il existe une approche simple qui peut mener à l'allégement du problème: la solution des 3 "R". Cette philosophie se résume en 3 mots: Réduire, Réutiliser et Recycler.

Une des façons les plus évidentes d'alléger le problème des déchets solides, y compris les déchets plastiques, est la réduction à la source, que la EPA définit comme étant la conception et la production de produits et d'emballages permettant une quantité minimale de substances toxiques, un volume moindre et/ou une plus longue durée d'utilisation (Limbach, 1990). Plusieurs grandes corporations étudient présentement divers moyens pouvant conduire à la réduction de la quantité de résines plastiques nécessaire pour l'emballage de différents produits sans toutefois

compromettre leur qualité. Par exemple, une cruche de lait en polyéthylène de haute densité (HDPE), qui pesait 95 g dans les années 1970, pèse maintenant 60 g (Limbach, 1990). D'autres compagnies vont jusqu'à éliminer certains types d'emballages pour les remplacer par des alternatives plus populaires. Par exemple, en décembre 1990, la chaîne de restaurant McDonald a décidé de retirer ses contenants en polystyrène pour les remplacer par des produits en papier (Reisch, 1990; Anon, 1990a)

La réutilisation est un des 3 "R" que nous pratiquons le plus. En effet, qui n'a pas déjà réutilisé un vieux contenant de margarine pour ses repas au travail ou pour conserver des restes de nourriture au réfrigérateur? Les industries des boissons (boissons gazeuses, bières) émettent des consignes sur leurs bouteilles en verre pour que celles-ci soient retournées et réutilisées.

Une solution de plus en plus populaire est le recyclage des matières plastiques. Le recyclage des déchets plastiques d'origine industrielle au sein même des usines se fait depuis longtemps et la technologie permettant ce recyclage existe déjà (Cheremismoff et Cheremismoff, 1989). Dans ce cas, les rebuts plastiques sont tous de même origine et sont présents sur les lieux mêmes de production, facilitant ainsi leur recyclage. Mais que faire des déchets plastiques disparates provenant de millions de résidences ?

En 1985, la "SPI" américaine a mis sur pied la "Plastics Recycling Foundation" (PRF) pour étudier ce problème. Un centre de recherche a été créé afin d'étudier les aspects pratiques, scientifiques, technologiques,

économiques et environnementaux impliqués dans le développement de l'infrastructure nécessaire au recyclage des plastiques; la cueillette, le triage et la réutilisation des déchets plastiques étaient tous à l'étude (Thayer, 1989). Au Québec, plusieurs municipalités ont déjà des programmes de cueillette sélective de matières recyclables. Selon Cheremismoff et Cheremismoff (1989) cependant, le recyclage des matières plastiques peut poser certaines difficultés. En effet, après plusieurs cycles de recyclage, le plastique peut perdre une partie de ses propriétés mécaniques et chimiques. D'autres problèmes sont aussi rencontrés tels la contamination d'un type de plastique recyclé par un autre (ex.: du PVC entrant dans le circuit du HDPE), et la manutention des déchets de faible volume et faible densité, c'est à dire, les films et les mousses, qui sont plutôt difficiles à transporter sur des tapis roulants, de par leur légèreté. Finalement, il n'est pas évident de trouver des débouchés commerciaux pour les plastiques recyclés, compte tenu de la demande limitée.

L'incinération des déchets en général apparaît à première vue intéressante car elle permet de réduire considérablement le volume des déchets tout en produisant de l'énergie. Par exemple, une livre (0,45 kg) de polyéthylène représente environ 20 000 Btu d'énergie thermique (21 mégajoule, soit 46,7 MJ/kg) (Voss, 1989). L'incinération des déchets n'est pas une solution parfaite car il existe un danger certain de pollution atmosphérique lors de la combustion des déchets et la réduction de cette pollution pourrait demander l'installation d'équipements dispendieux. De plus, les cendres générées par les incinérateurs pourraient contenir des métaux lourds, des dioxines et des furannes, bien que ces allégations soient

contestées (Rankin, 1987). Finalement, il existe une réticence de la part du public à voir s'installer dans leur voisinage des incinérateurs (le syndrome "NIMBY-Not In My BackYard").

3. Une autre solution: les plastiques dégradables

Plusieurs revues ont été publiées sur les plastiques dégradables en général (Johnson, 1988; Robey *et al.*, 1989; Scott, 1989; Evans et Sikdar, 1990; Huang *et al.*, 1990; Klemchuk, 1990). On distingue deux classes de plastiques dégradables: les photodégradables et les biodégradables. Les photodégradables sont dégradés en partie par l'action des rayons ultra-violetes alors que les biodégradables le sont par l'action combinée de microorganismes et de facteurs physico-chimiques.

3.1. Les plastiques photodégradables

Dans l'environnement, la plupart des plastiques peuvent être dégradés par l'action des rayons ultra-violetes. Deux mécanismes sont à l'origine de ce phénomène, soit la photo-oxydation et la photolyse des cétones (Klemchuk, 1990). La photo-oxydation (Figure 1) implique une étape d'initiation où les U.-V. ($h\nu$) créent des radicaux libres ($R\cdot$) à partir du polymère. Ces radicaux libres interagissent avec l'oxygène atmosphérique pour former de nouveaux radicaux libres, donnant lieu à une réaction en chaîne (ou propagation). La réaction peut se terminer lorsque ces radicaux réagissent entre eux pour donner une molécule ne réagissant pas avec l'oxygène. Bien sûr, les U.-V. sont toujours présents et vont

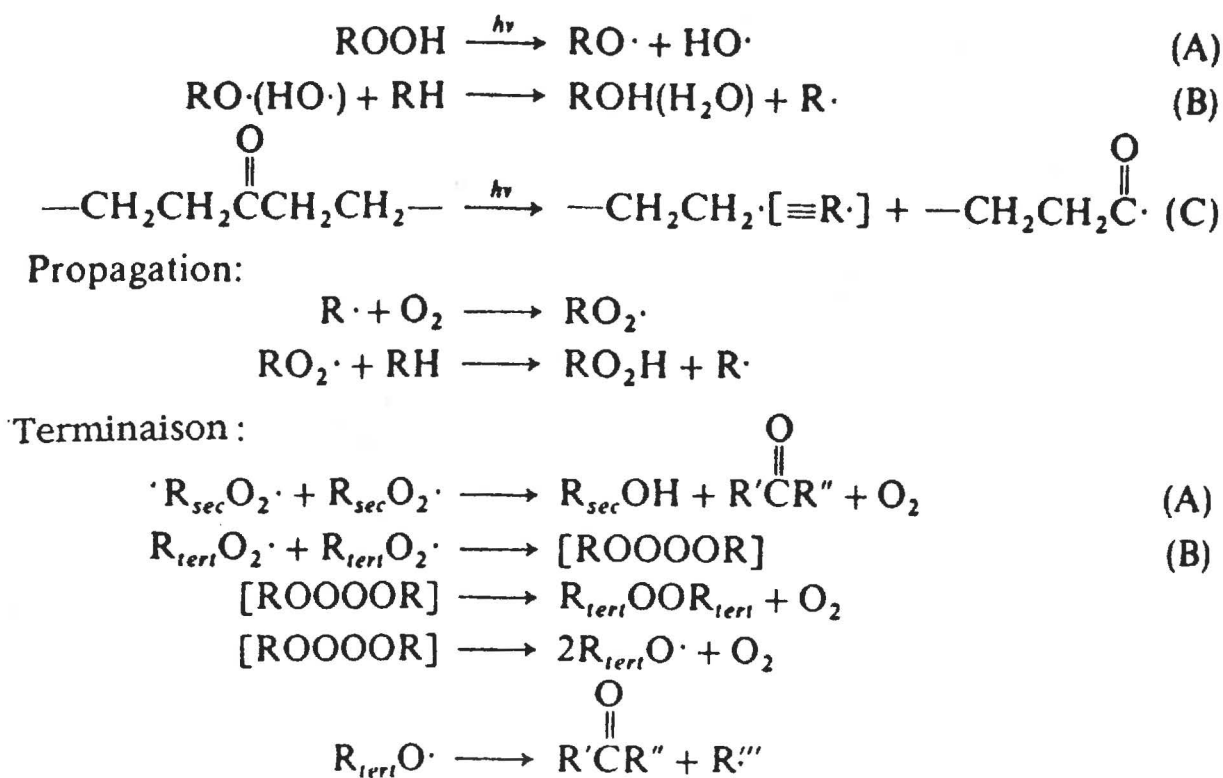


Figure 1: Photodégradation des plastiques par photo-oxydation (D'après Klemchuk, 1990)

réinitier la réaction de photo-oxydation, endommageant de plus en plus le polymère. La manipulation industrielle des matières plastiques conduit souvent à des altérations moléculaires au niveau des polymères. Johnson (1988) cite l'exemple du polyéthylène: sous l'action de la chaleur, des groupements cétones sont créés le long des chaînes du polymères. Ces groupes absorbent les U.-V. de longueur d'onde de 270 à 360 nm, ce qui mène au clivage des chaînes selon des réactions de type Norrish I (où le clivage se fait en α et des radicaux libres sont formés) et II (où le clivage se fait en β) (Figure 2). Ce type de réaction peut être aussi délibérément désiré et provoqué afin de produire des plastiques dont la photodégradation sera accélérée. L'incorporation de fonctions cétones dans un polymère permet aussi l'obtention de plastiques photodégradables. La lumière provenant de sources artificielles ou ayant été filtrée par une vitre possède rarement la longueur d'onde 330 nm, longueur d'onde absorbée par les groupements cétone. Ces plastiques seront donc peu affectés par les conditions lumineuses existant dans un magasin, par exemple. La compagnie canadienne EcoPlastics Ltd a mis sur le marché un tel polymère, le Ecolyte, où l'éthylène a été copolymérisé avec du méthylvinylcétone (Robey *et al.*, 1989). D'autres plastiques (polypropylène (PP), polystyrène, chlorure de polyvinyle (PVC), téraphtalate de polyéthylène (PET) et Nylon) ont aussi été modifiés de la sorte afin d'accroître la gamme des produits de type Ecolyte. La copolymérisation de l'éthylène avec du monoxyde de carbone en faible quantité (2%) permet aussi l'obtention d'un polyéthylène photodégradable, le E-CO.

L'utilisation d'additifs photosensibilisateurs permet aussi d'accroître la sensibilité du plastique aux U.-V.. Les antioxydants présents dans les

Norrish Type I:



Norrish Type II:

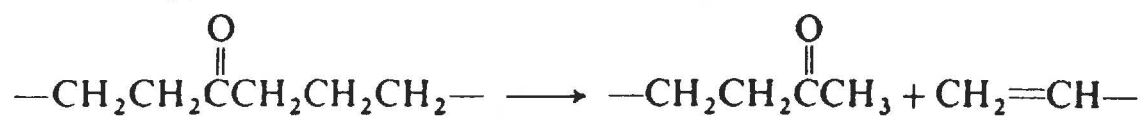


Figure 2: Photodégradation des plastiques par photolyse (D'après Klemchuk, 1990)

plastiques conventionnels empêchent les hydroperoxydes de dégrader le plastique en accaparant l'oxygène libre présent, ces hydroperoxydes étant formés durant les traitements calorifiques du plastique. Certains de ces antioxydants peuvent catalyser la photodégradation dans certaines conditions car ils contiennent des complexes de métaux qui, lors d'une exposition aux U.-V., libèrent des ions métalliques catalysant la dégradation de la chaîne polymérique. Ideamasters, Inc., de Miami aux États-Unis, vend présentement un plastique de ce type, le Plastigone (Johnson, 1988).

Après une exposition à la lumière du soleil, le poids moléculaire des plastiques photodégradables diminuera jusqu'au point où les polymères résiduels pourront être dégradés plus ou moins efficacement par les microorganismes de l'environnement (Robey *et al.*, 1989). Mais que faire si ces plastiques n'ont pas été suffisamment exposés aux U.-V., si par exemple, ils ont été enfouis dans le sol ou dans l'eau?

3.2. Les plastiques biodégradables

La biodégradation peut être définie comme étant le processus par lequel les bactéries, champignons, levures et leurs enzymes consomment une substance comme source de nutriments jusqu'à la disparition de celle-ci (Klemchuk, 1990). La plupart des thermoplastiques conventionnels sont insensibles aux enzymes des microorganismes de l'environnement, à l'exception des polyesters et des polyuréthanes aliphatiques dérivés d'esterdiols aliphatiques. Il faut mentionner que ceux-ci sont de moins en moins dégradables lorsque leur poids moléculaire dépasse 500. De plus, la

présence de chaînes aliphatiques ou de cycles sur la chaîne principale empêche toute attaque enzymatique du plastique (Potts, 1984). Grâce à nos connaissances sur la biodégradation des acides gras et des polyesters, on peut comprendre maintenant pourquoi les polystyrènes et les autres polymères de ce genre sont peu susceptibles aux attaques microbiennes. Lorsqu'un acide gras est dégradé, il y a oxydation du carbone β non-substitué de l'acide gras (ou du polyester) en groupement carbonyle par une série de réactions enzymatiques décrite à la Figure 3. Il y a ensuite un clivage en β et une libération d'un acétyl-CoA. La présence d'un substituant sur le carbone β (méthyle pour le polypropylène, phényle pour le polystyrène, chlore pour le PVC) empêche la machinerie enzymatique d'assimiler ce substrat (Klemchuk, 1990). De plus, la rigidité des polymères de hauts poids moléculaires peut empêcher les sites actifs des enzymes d'interagir avec le polymère (Huang *et al.*, 1990).

Divers méthodes peuvent rendre les plastiques plus susceptibles aux attaques biologiques. L'ajout de substances facilement biodégradables, telles les amidons, la poudre de bois, les cires, les caséines, etc, est une des approches souvent retrouvée en industrie. Mais dans ce cas, seul l'additif est dégradé, laissant derrière des fragments de plastique poreux et affaiblis; si le poids moléculaire du plastique est encore trop élevé, la digestion enzymatique sera limitée. On ne peut ici parler de biodégradation mais plutôt de biodésintégration (Robey *et al.*, 1989).

Une autre approche à la biodégradation des plastiques est la synthèse chimique d'un polymère complètement biodégradable. Le poly- ϵ -caprolactone en est un exemple. Son monomère, le ϵ -caprolactone, est

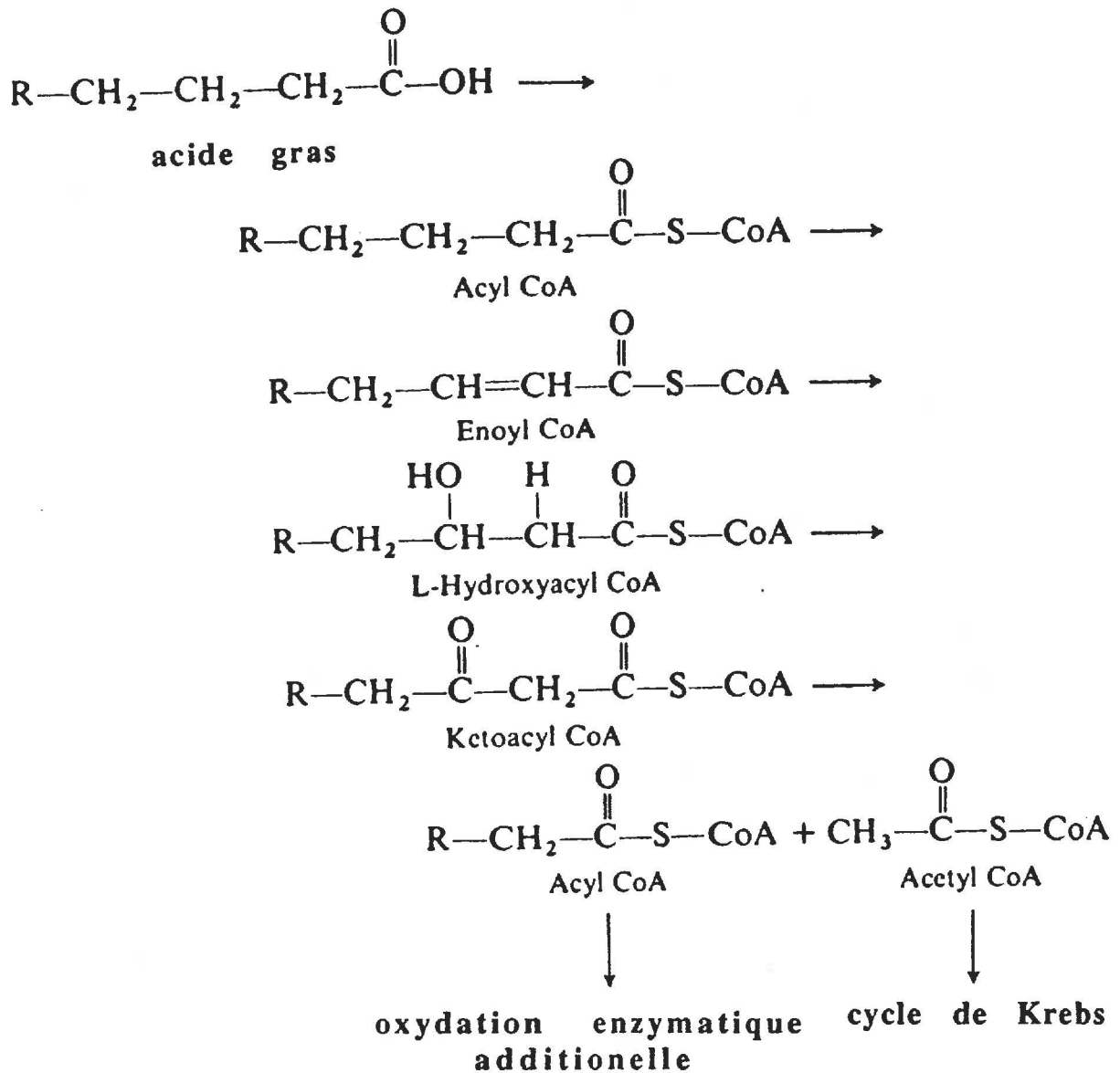


Figure 3: Décomposition enzymatique des acides gras (D'après Klemchuk, 1990)

obtenu par oxydation du cyclohexanone avec de l'acide peracétique (Figure 4). Les différents procédés permettant la polymérisation du monomère en poly- ϵ -caprolactone ont été décrits par Pitt (1990). Un autre candidat est le polylactate, qui possède un certain intérêt du point de vue microbiologique. Des chercheurs du Argonne National Laboratory (Illinois, É.-U.) ont mis au point un procédé permettant l'obtention de ce plastique à partir de déchets de pomme de terre riche en amidon (Coleman, 1990). Un procédé enzymatique permet la conversion de l'amidon en glucose; l'utilisation d'une α -amylase thermostable permet d'hydrolyser les longues chaînes d'amidon en chaînes plus petites et une glucoamylase hydrolyse ces petites chaînes pour donner du glucose. Le glucose ainsi formé est ensuite fermenté en acide lactique par des bactéries lactiques. Finalement, l'acide lactique obtenu est chimiquement polymérisé en polylactate. Comme il existe deux isomères naturels de l'acide lactique (L- et D-), la composition du polylactate en isomère(s) de l'acide lactique déterminera la vitesse à laquelle le polylactate se dégradera. Par exemple, une composition 50-50 des isomères D- et L- de l'acide lactique donnera le polymère le plus rapidement biodégradable. Le coût actuel de production du polylactate a été estimé à 0,54\$ américain la livre et une optimisation du procédé pourrait permettre l'obtention de ce polymère à un coût estimé de 0,40\$ américain la livre. Bien que le polylactate soit un matériau résistant, celui-ci est plutôt sensible à l'humidité et aux attaques hydrolytiques (Evans et Sikdar, 1990).

Les polymères de la classe des polyhydroxyalcanoates constituent un autre groupe de plastiques biodégradables prometteurs. Il en sera question dans la prochaine section.

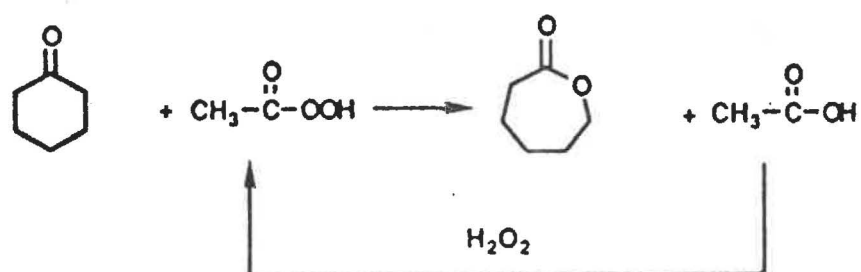
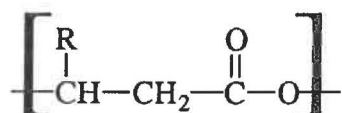


Figure 4: Oxydation du cyclohexanone par l'acide peracétique lors de la synthèse industrielle du ϵ -caprolactone (D'après Pitt, 1990)

4. Les polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polyesters naturels retrouvés chez plusieurs procaryotes (Tableau 1). La structure chimique générale de ces polymères est la suivante:



le radical R peut aller d'un groupement méthyle (on a alors le β -hydroxybutyrate) jusqu'à au moins un groupement n-nonyle (pour le β -hydroxydodécanoate). Ces polymères sont retrouvés sous forme de granules intracellulaires dans les bactéries et leur accumulation serait causée par une carence nutritionnelle ou un stress quelconque en présence d'un excès de carbone. À la Figure 5, on voit une cellule de *Methylobacterium extorquens*, une bactérie utilisant le méthanol comme source de carbone et d'énergie, engorgée de granules qui apparaissent en blanc. Ces granules sont recouverts d'une membrane contenant l'enzyme PHB synthétase, enzyme impliquée dans la biosynthèse du poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Les propriétés physiques de cette classe de polymères, plus spécialement le poly- β -hydroxybutyrate (PHB) et son copolymère, le poly- β -hydroxybutyrate/ β -hydroxyvalérate (P(HB/HV)), font que ceux-ci possèdent un certain intérêt commercial.

4.1. Historique des PHA.

L'historique des PHA, plus particulièrement du PHB a été bien décrit

Tableau 1: Variété des bactéries productrices de poly- β -hydroxyalcanoates(D'après Brandl *et al.*, 1990).

Genre	Classification selon le manuel PHA ^c Bergey's		Substrat utilisé	Référence
<i>Acinetobacter</i>	10	<1	Glucose	[105]
<i>Alcaligenes</i>	7	96	Fructose	[9]
<i>Aphanotoce</i>	Cyanobactera	<1	NS	[10]
<i>Aquaspirillum</i>	6	ND	NS	[106]
<i>Azospirillum</i>	6	75	Malate	[23]
<i>Azotobacter</i>	7	73	Glucose	[107]
<i>Bacillus</i>	15	25	Glucose	[28]
<i>Beggiatoa</i>	2	57	Acetate	[108]
<i>Beyerinckia</i>	7	38	Glucose	[109]
<i>Caulobacter</i>	4	36	Glucose glutamate	[110]
<i>Chloroflexus</i>	1	<1	Yeast extract glycylglycine	
<i>Chlorogloea</i>	Cyanobactera	10	Acetate, CO ₂	[111]
<i>Chromatium</i>	1	20	Acetate	[112]
<i>Chromobacterium</i>	8	37	Glucose; peptone	[113]
<i>Clostridium</i>	15	13	Tryptone; peptone; glucose	[114]
<i>Derxia</i>	7	26	Glucose	[109]
<i>Ectothiorhodospira</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Escherichia^a</i>	8	ND	Tryptone; yeast extract; glucose	[13]
<i>Gamphosphaeria</i>	Cyanobactera	ND	ND	[115]
<i>Haemophilus^b</i>	8	ND	Brain-heart-infusion	[13]
<i>Halobacterium</i>	13	38	Glucose	[20]
<i>Hyphomicrobium</i>	4	ND	Methanol, glucose	[27]
<i>Lamprocystis</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Lampropedia</i>	10	ND	NS	[63]
<i>Lepiothrix</i>	3	67	Pyruvate	[116]
<i>Methylobacterium</i>	7	47	Methanol	[117]
<i>Methylocystis</i>	ND	70	Methane	[118]
<i>Methylosinus</i>	7	25	Methane	[119]
<i>Micrococcus</i>	14	28	Peptone tryptone	[120]
<i>Microcoleus</i>	Cyanobactera	<1	NS	[10]
<i>Microcystis</i>	Cyanobactera	ND	ND	[121]
<i>Moraxella</i>	10	ND	NS	[106]
<i>Mycoplana</i>	17	ND	Methanol	[122]
<i>Nitrobacter</i>	12	ND	NS	[106]
<i>Nitrococcus</i>	12	ND	NS	[106]
<i>Nocardia</i>	17	14	Butane	[65]
<i>Oceanospirillum</i>	6	ND	NS	[106]
<i>Paracoccus</i>	10	ND	NS	[106]
<i>Photobacterium</i>	8	ND	NS	[106]
<i>Pseudomonas</i>	7	67	Methanol	[27]
<i>Rhizobium</i>	7	57	Mannitol	[113]
<i>Rhodobacter</i>	1	80	Acetate	
<i>Rhodospirillum</i>	1	47	Acetate	[58]
<i>Sphaerotilus</i>	3	45	Glucose peptone	[123]
<i>Spirillum</i>	6	40	Lactate	[21]
<i>Spirulina</i>	Cyanobactera	6	CO ₂	[124]
<i>Streptomyces</i>	17	4	Glucose	[125]
<i>Syntrophomonas</i>	9	30	Crotonate	[18]
<i>Thiobacillus</i>	12	ND	Glucose	[126]
<i>Thiocapsa</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Thiocystis</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Thiodictyon</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Thiopedia</i>	1	ND	NS	[106]
<i>Thiosphaera</i>	1	ND	Acetone, CO ₂	[127]
<i>Vibrio</i>	8	ND	NS	[106]
<i>Xanthobacter</i>	7	ND	NS	[106]
<i>Zoogloea</i>	7	ND	Yeast extract casamino acids	[128]

^a d'après Buchanan et Gibbons (1974)

- groupe 1: bactéries phototrophiques
- groupe 2: bactéries glissantes
- groupe 3: bactéries enveloppées
- groupe 4: bactéries bourgeonnantes et à tige
- groupe 6: bactéries spiralées et incurvées
- groupe 7: bacilles et coques Gram-négatifs aérobies
- groupe 8: bacilles Gram-négatifs anaérobies facultatifs
- groupe 9: bactéries Gram-négatives anaérobies
- groupe 10: coccobacilles et coques Gram-négatives
- groupe 12: bactéries Gram-négatives chémoautotrophes
- groupe 13: archéobactéries
- groupe 14: coques Gram-positifs
- groupe 15: bacilles et coques à endospores
- groupe 17: actinomycètes

^b PHB dans la membrane cellulaire: pas de granules intracellulaires^c contenu maximal en PHA (% poids sec)

ND= contenu non-déterminé

NS= substrat non-spécifié

Figure 5: Micrographies électroniques de cellules de *M. extorquens* avec peu ou pas de PHB, en phase exponentielle (A) et avec des quantités appréciables de PHB, en phase stationnaire (B). La barre représente 0,5 μm :

A



B



par Lafferty et al. (1988). Depuis l'arrivée du microscope, on avait souvent constaté la présence de "gouttes de gras" à l'intérieur de certaines bactéries. Toujours selon Lafferty et al. (1988), ce n'est que dans les années 1920 que Lemoigne a déterminé la structure chimique de ces granules lipophiles. En effet, lors de l'autolyse de *Bacillus subtilis* dans de l'eau distillée, Lemoigne a remarqué une baisse de pH due à la libération de β -hydroxybutyrate provenant du PHB. Plus tard, Lemoigne a confirmé que les granules lipophiles étaient la source de β -hydroxybutyrate chez *Bacillus megaterium* (Lafferty et al., 1988). En 1958, Forsythe détermina que plusieurs bactéries Gram-négatives produisaient du PHB et que ce fait pouvait être utilisé en taxonomie (Lafferty et al., 1988). Le rôle du PHB comme réserve de carbone en conditions adverses a été mis de l'avant par Stanier en 1959 (Lafferty et al., 1988). En 1974, Wallen et Rohwedder ont démontré l'existence de polyhydroxyalcanoates (PHA) autres que le PHB (Lafferty et al., 1988). Ces deux chercheurs ont noté la présence d'hétéropolymères contenant du 3-hydroxyvalérate (C_5), du 3-hydroxycaproate (C_6) et du 3-hydroxyheptanoate (C_7) en plus du β -hydroxybutyrate, dans des échantillons de boues activées. C'est dans les années 1960 qu'on a reconnu les propriétés du PHB comme thermoplastique biodégradable. Par exemple, des demandes de brevets ont été déposées en 1962 par J.N. Baptist, lorsque celui-ci a proposé d'utiliser le PHB comme suture biodégradable (Baptist, 1962). Cependant, ce n'est qu'en 1982 que la compagnie ICI, en Grande-Bretagne, a produit le PHB et le P(HB/HV) de manière semi-industrielle, sous le nom commercial de Biopol. Puis, en avril 1990, la compagnie Wella (Allemagne) a mis sur le marché une gamme de shampoings biodégradables, la ligne Sanara, distribuée dans des bouteilles de Biopol. C'est la première utilisation

commerciale connue du copolymère P(HB/HV) (Anderson et Dawes, 1990).

4.2. Rôles des polyhydroxyalcanoates

Comme on l'a déjà dit, les PHA servent de réserve de carbone et d'énergie en conditions adverses. En effet, l'accumulation de ces polymères dans la bactérie permet d'amasser une grande quantité de carbone réduit sans affecter la pression osmotique interne de la cellule. De plus, l'accumulation de PHB ou d'autres PHA chez certaines bactéries retarde la dégradation de macromolécules importantes (ARN, protéines) lors de carences nutritionnelles. Le PHB peut servir comme source de carbone durant la sporulation chez certaines espèces de *Bacillus*, ou lors de l'enkystement chez diverses espèces de *Azotobacter* (Anderson et Dawes, 1990). Chez les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, le PHB sert de source d'énergie pour la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au sein des plantes légumineuses. Celui-ci peut représenter jusqu'à 50% du poids des bactéroïdes retrouvés dans les nodules des racines. Le PHB se retrouve aussi dans les membranes de divers procaryotes et eucaryotes. Celui-ci est, en général, associé à des polyphosphates inorganiques en une sorte de canal et pourrait jouer un rôle dans la régulation de la concentration intracellulaire des ions calcium et dans la transmission des signaux impliquant les ions calcium. Finalement chez divers bactériés, la présence de ces canaux permettrait aussi le transport d'ADN exogène dans la cellule et serait donc lié au phénomène de compétence (Anderson et Dawes, 1990).

4.3. Synthèse chimique des polyhydroxyalkanoates

La plupart des poly(3-hydroxyalkanoates) peuvent être synthétisés par voies chimiques à partir des propiolactones (des esters cycliques) appropriés en utilisant des catalyseurs tels les alkyles de zinc ou d'aluminium (Holmes, 1988). Par exemple, le PHB peut être synthétisé par l'ouverture du cycle et la polymérisation du β -butyrolactone en présence des catalyseurs cités plus haut (Tanahashi et Doi, 1991). Bien que ce procédé soit intéressant du point de vue académique, le polymère produit ainsi ne pourrait pas être compétitif avec celui obtenu par fermentation. En effet, les monomères des lactones utilisés au début de la synthèse sont très coûteux, toxiques et de manutention difficile. De plus, les rendements tendent à être faibles. Tanahashi et Doi (1991) ont synthétisé du PHB à partir de divers mélanges de (R)- et de (S)- β -butyrolactones polymérisés en présence de $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ pendant 5 jours à 60°C dans du toluène. Ceux-ci ont obtenus du PHB dont le poids moléculaire maximum était de 50 000, par comparaison avec des valeurs de l'ordre d'au moins 300 000 pour du PHB produit par *Methylobacterium extorquens* (Bourque *et al.*, 1992a).

4.4. Biosynthèse des polyhydroxyalkanoates

Les voies métaboliques de biosynthèse du PHB sont bien connues chez plusieurs microorganismes. Cette synthèse débute avec la conversion des substrats carbonés en acétate (Figure 6) selon diverses voies. Par exemple, *Alcaligenes eutrophus* peut convertir le glucose en acétyl-CoA selon les voies de glycolyse (voie Embden-Meyerhoff-Parnas, voie des

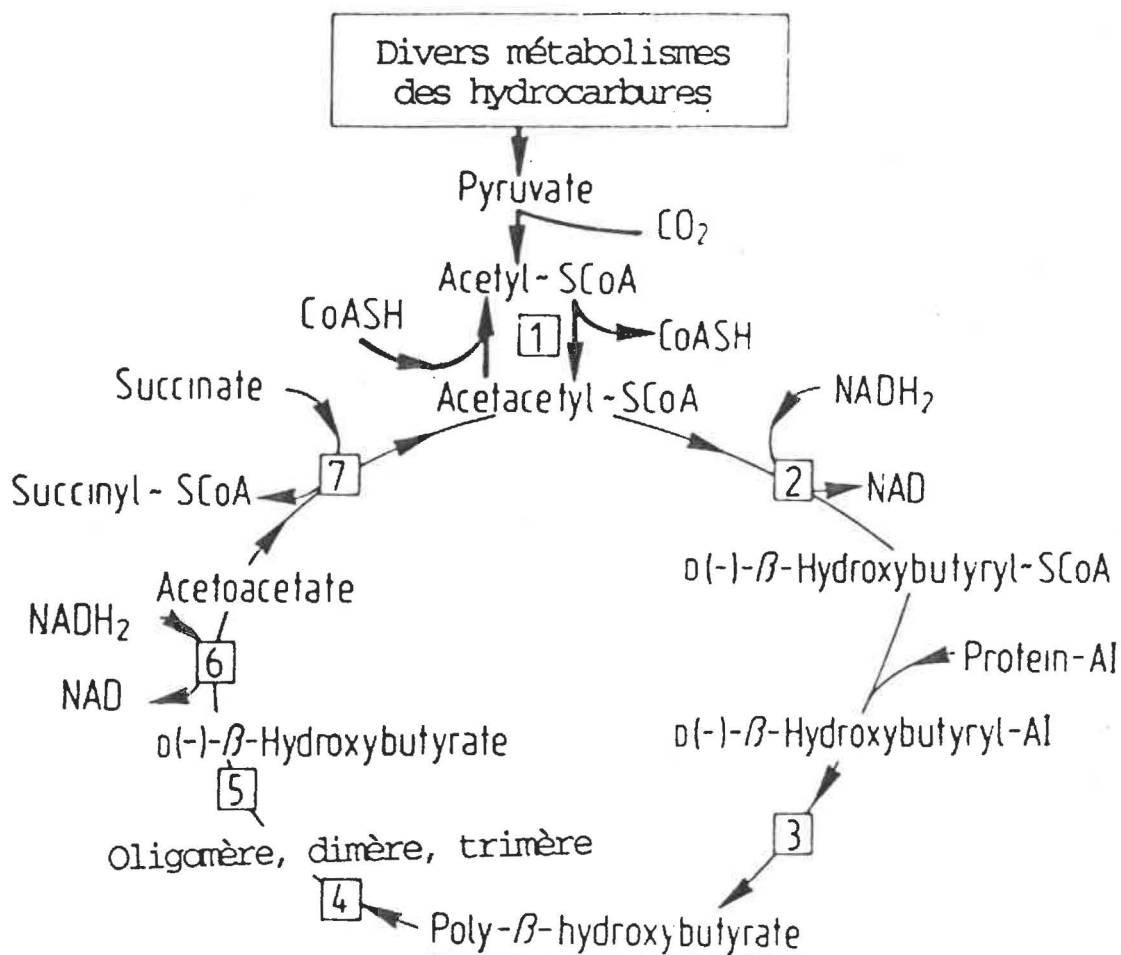


Figure 6: Voie métabolique générale de la biosynthèse et de la biodégradation du PHB (D'après Lafferty *et al.*, 1988). (1) 3-cétothiolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, (3) PHB synthétase, (4) PHB dépolymérase, (5) dimère hydrolase, (6) déshydrogénase NAD⁺-spécifique, (7) acétoacétate: succinate-CoA transférase.

hexoses monophosphates ou voie Entner-Doudoroff). Chez *M. extorquens*, une bactérie méthylo-trophe, l'acétyl-CoA provient de la transformation du méthanol selon la voie de la sérine (Anthony, 1991). Chez *A. eutrophus* (Ishizaki et Tanaka, 1991), l'acétate est dérivé du gaz carbonique et de l'hydrogène. Le choix du substrat est important puisqu'il déterminera en partie le coût final du produit.

Deux unités d'acétyl-CoA sont ensuite condensées par une 3-cétothiolase (acétyl-CoA acétyl transférase, EC 2.3.1.9) pour donner de l'acétoacétyl-CoA et du coenzyme A libre. Cette étape est suivie d'une réduction de ce composé en 3-hydroxybutyryl-CoA par une acétoacétyl-CoA réductase (hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase, EC 1.1.1.36). Finalement, la PHB synthétase associée à la membrane des granules permet la polymérisation de ces monomères en poly- β -hydroxybutyrate. *Alcaligenes eutrophus* peut aussi former du PHB à partir d'acide gras sans utiliser l'enzyme 3-cétothiolase (Doi, 1990).

Pour ce qui est de PHA autres que le PHB, leur synthèse est liée à la β -oxydation et au clivage thiolique des acides gras (Figure 7). Chez *Pseudomonas oleovorans*, les unités 3-L-hydroxyacyl-CoA générées lors de la β -oxydation sont réduites en unités 3-D-hydroxyalcanoates-CoA par deux acétoacétyl-CoA réductase, NADPH et NADH dépendantes. Ces monomères sont alors polymérisés par une PHA synthétase. La diversité des PHA chez *P. oleovorans* pourrait s'expliquer par une faible spécificité de la synthétase pour ces substrats. Huisman et al. (1989) ont observé ici la présence de copolymères dont la substitution allait de C₆ à C₁₂. Selon Lafferty et al. (1988), la formation de divers PHA serait plutôt due à la

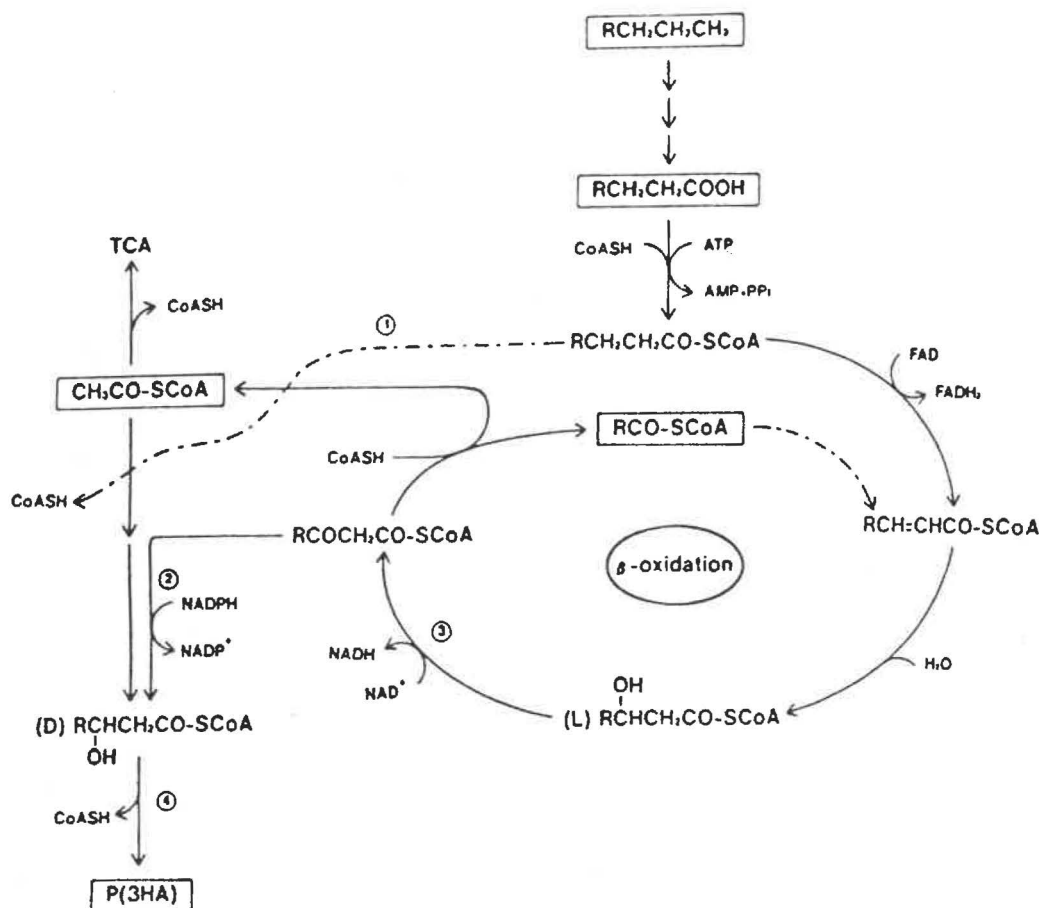


Figure 7: Voie métabolique de la biosynthèse des PHA chez *P. oleovorans* (D'après Doi, 1990). (1) 3-cétothiolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, NADPH dépendante, (3) acétoacétyl-CoA réductase, NADH dépendante, (4) PHA synthétase.

faible spécificité des enzymes 3-cétothiolasés pour les substrats présents dans le milieu. Par exemple, chez *A. eutrophus*, l'utilisation de propionate comme seule source de carbone permet la formation du copolymère P(HB/HV). Deux unités propionate sont dégradées pour donner 2 molécules d'acétate et de CO₂ et les 2 acétates sont condensés pour donner une unité (D)-3-hydroxybutyrate. D'un autre côté, la fusion d'un acétate à un propionate permet la formation d'unités hydroxyvalérate. Les monomères ainsi formés sont polymérisés aléatoirement pour former le P(HB/HV).

La synthèse des PHA est sous le contrôle de la 3-cétothiolasé laquelle est inhibée par une forte teneur en coenzyme A libre durant des conditions favorables à la croissance. Dans ces conditions, l'acétyl-CoA est oxydé selon le cycle de Krebs pour générer de l'énergie et permettre la synthèse d'acides aminés. Il y a donc libération du coenzyme A qui inhibe la synthèse du PHB ou d'autres PHA. Dans des conditions limitant la croissance (carence en O₂, en azote, etc...) et avec un excès de carbone, la citrate synthétase du cycle de Krebs est inhibée par une hausse de la concentration en NADH. Ceci mène alors à une accumulation d'acétyl-CoA et, donc, à une diminution en coenzyme A libre. La 3-cétothiolasé n'est plus alors inhibée et la synthèse du PHB est initiée (Doi, 1990). D'autres intermédiaires du cycle de Krebs (pyruvate, oxaloacétate) peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de la synthèse des PHA (Figure 8). Ce type de régulation s'applique pour des substrats comme le glucose, qui passe par un intermédiaire acétyl-CoA avant d'aboutir comme un PHA. Cependant, avec les substrats carbonés qui sont assimilés différemment, la régulation de la synthèse des PHA est différente. Avec des substrats autres

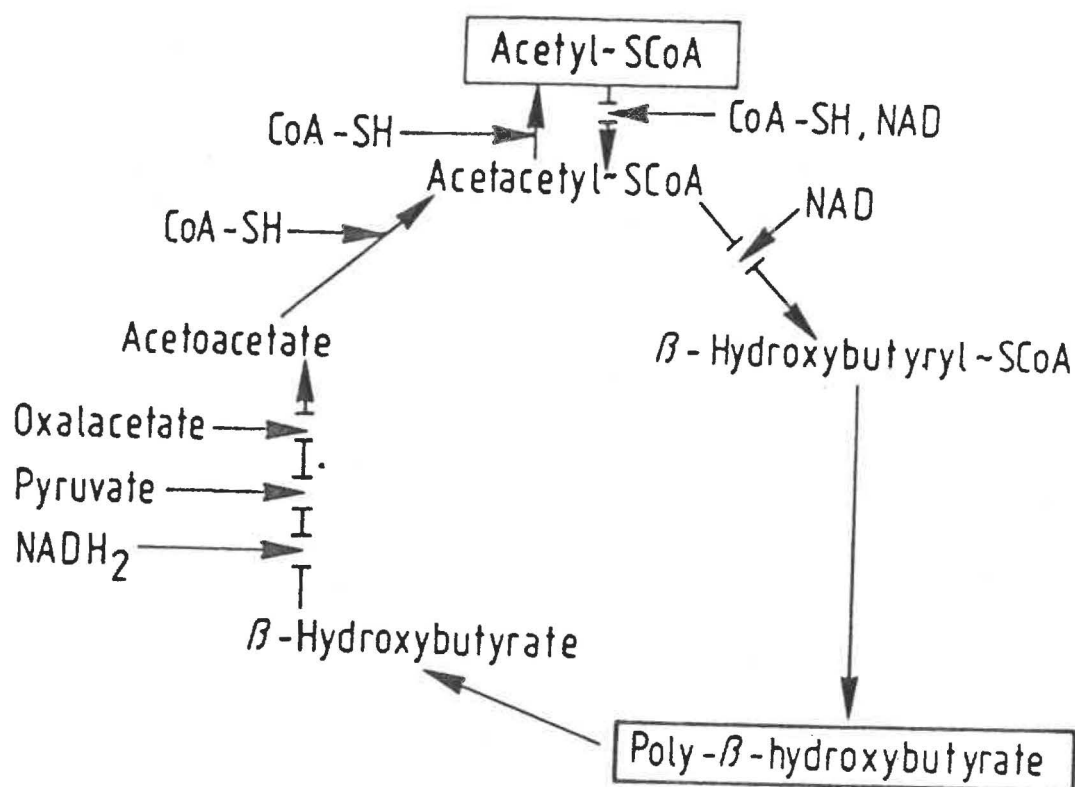


Figure 8: Régulation de la biosynthèse et de la biodégradation du PHB par divers intermédiaires du métabolisme de *Alcaligenes eutrophus* H16 (D'après Lafferty *et al.*, 1988).

que les hydrates de carbone, comme le méthanol, la synthèse des PHA pourrait être dépendante du résultat de la compétition pour certains métabolites (*i.e.* les intermédiaires des PHA peuvent être utilisés à d'autres fins). Chez *Methylosinus trichosporium* OB3b, un méthylotrophe obligatoire, la synthèse et la dégradation du PHB sont régulées par les intermédiaires du PHB et par le potentiel d'oxydoréduction de la cellule (Anderson et Dawes, 1990).

4.5. Biologie moléculaire de la production des PHA

La génétique de la production des PHA chez *A. eutrophus* a été décrite par Steinbüchel et Schlegel (1991). Les gènes impliqués dans la synthèse des PHA sont organisés en opéron sur le chromosome bactérien. Cet opéron *phb* CAB est composé de 3 gènes (Figure 9) : *phb* C codant pour la PHB synthétase, *phb* A codant pour la 3-cétothiolase et *phb* B codant pour l'acétoacétyl-CoA réductase, NADPH dépendante. L'opéron est sous le contrôle d'un seul promoteur, en amont de *phb* C, qui présente une homologie avec le promoteur $\sigma 70$ de *E. coli*. À ce jour, la génétique de la production des PHA chez *M. extorquens* n'a pas été étudiée.

L'opéron *phb* a déjà été cloné chez *E. coli* (Slater *et al.*, 1988) et chez des bactéries du genre *Pseudomonas* (Timm *et al.*, 1990). Ces diverses souches recombinantes expriment efficacement ces gènes et accumulent le PHB de manière importante lorsque les cellules sont cultivées en excès de carbone et en carence d'azote. L'utilisation de telles souches pourrait s'avérer intéressante car elle permet des manipulations facilitant

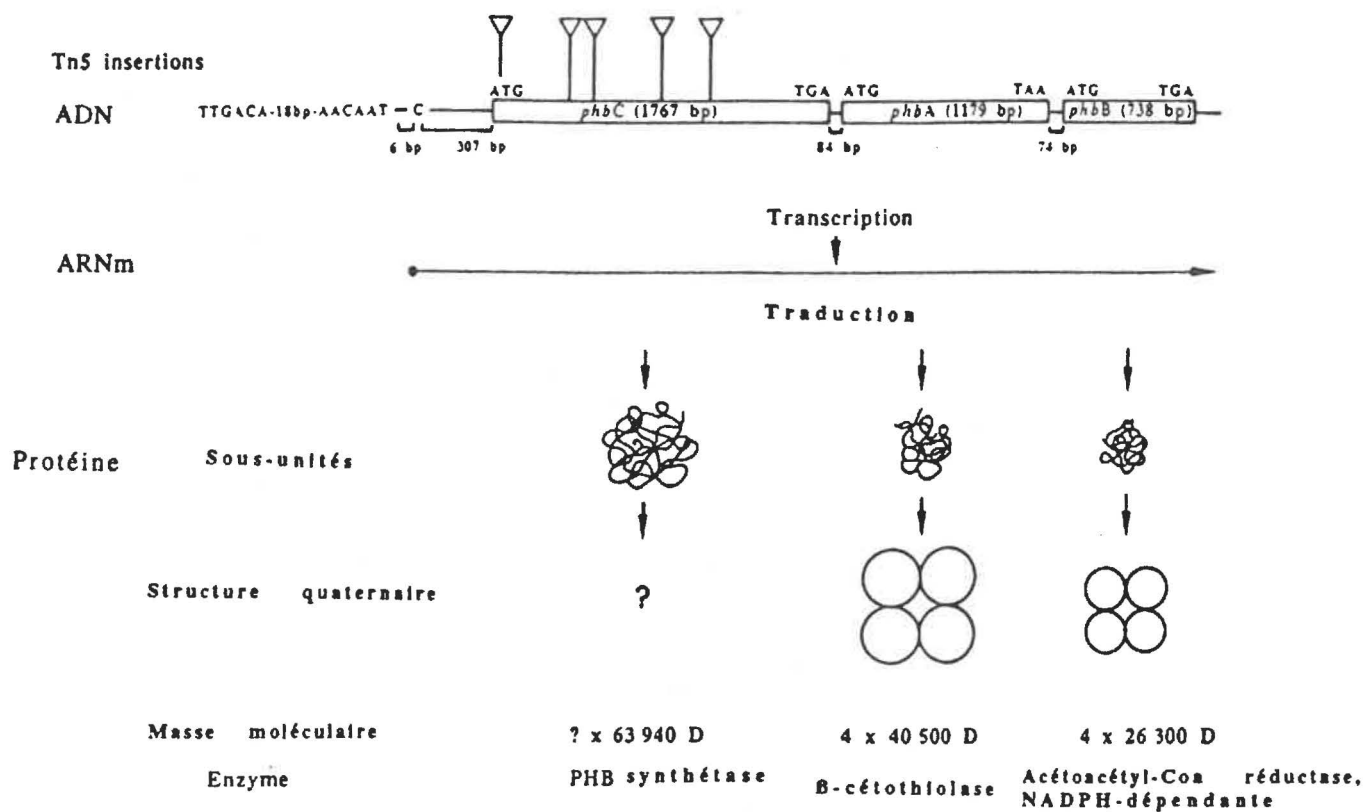


Figure 9: Organisation de l'opéron *phb* chez *Alcaligenes eutrophus* permettant la production de PHB (D'après Steinbüchel et Schlegel, 1991).

l'extraction des PHA (voir section 4.10.3)

4.6. Biodégradation intracellulaire des PHA

La cellule peut réutiliser le PHB et les autres PHA accumulés, s'il y a lieu, durant la période de carence lorsqu'un manque de carbone ou d'énergie se manifeste. Chez *Azotobacter beijerinckii*, une PHB dépolymérase (Figure 6), associée à la membrane du granule, hydrolyse les chaînes de PHB pour donner du (D)-3-hydroxybutyrate libre bien qu'il se peut que des intermédiaires soient formés et dégradés par une dimère hydrolase (Lafferty *et al.*, 1988). Le (D)-3-hydroxybutyrate est ensuite oxydé en acétoacétate par une déshydrogénase NAD⁺-spécifique. Cette dernière enzyme peut-être inhibée par le NADH, le pyruvate et le 2-oxoglutarate. L'acétoacétate est ensuite couplé à une unité de coenzyme A par une acétoacétate:succinate-CoA transférase. De l'acétoacétyl-CoA est ainsi formé, fermant le cycle de la synthèse du PHB (Dawes, 1988). À ce jour, on connaît assez peu de choses sur la réutilisation des autres PHA connus.

De plus, on connaît encore peu de choses sur le contrôle de la dépolymérase lors de la dégradation du PHB par la cellule. Pour ce qui est de la déshydrogénase, celle-ci est inhibée par un excès de NADH, lors d'une carence en oxygène par exemple. La dégradation sera arrêtée lorsque la cellule a besoin de refaire des réserves de carbone et d'énergie. Enfin, lors d'un retour en conditions balancées, l'accroissement de la concentration intracellulaire en pyruvate et en 2-oxoglutarate inhibe aussi la déshydrogénase. Donc, le PHB ne sera pas utilisé en présence d'une source

de carbone exogène.

4.7. Biodégradation extracellulaire des PHA

Ce qui rend les PHA si intéressants, c'est leur susceptibilité aux attaques par les diverses enzymes que l'on retrouve dans l'environnement. La vitesse à laquelle les PHA sont dégradés dans l'environnement dépend de plusieurs facteurs tels le pH, la température, la qualité et la quantité des nutriments disponibles, etc. Par exemple, un film de PHB d'une épaisseur de 1 mm prend 6 semaines pour se dégrader complètement dans des boues en condition anaérobie, mais prend 350 semaines dans de l'eau de mer à 15°C (Lafferty et al., 1988). La composition du polymère (rapport HB/HV), son poids moléculaire, son degré de cristallinité et sa surface de contact peuvent aussi jouer un rôle (Lafferty et al., 1988).

Bien que plusieurs enzymes soient impliquées dans la biodégradation des PHA, la PHB dépolymérase extracellulaire a été la plus étudiée. La dépolymérase de *Alcaligenes faecalis*, par exemple, est une hydrolase de type endo, coupant à l'intérieur de la chaîne du PHB. Ce type d'enzyme est aussi actif sur certains autres PHA. De plus, les PHA se dégradent spontanément dans l'eau, mais de manière lente (Lafferty et al., 1988).

4.8. Propriétés des PHA

Les propriétés physiques du PHB et des autres PHA les rendent intéressants du point de vue industriel. En effet, certains de ces polymères

ressemblent beaucoup au polypropylène (Tableau 2) sauf en ce qui a trait à l'extensibilité, qui est faible dans le cas du PHB; la perméabilité à l'oxygène est faible aussi, ce qui rend le PHB intéressant pour l'emballage des denrées (Lafferty et al., 1988) . Tout comme le polypropylène, les PHA peuvent être moulés en différentes formes, pour divers usages (ex.: bouteilles de shampoing, emballages divers, produits sanitaires jetables, sacs à paillage). Les propriétés du PHB peuvent être améliorées par l'incorporation d'acide gras dans la chaîne du polymère. Le cas le mieux étudié est l'ajout d'hydroxyvalérate (HV). Marchessault et al. (1988) ont étudié l'influence du pourcentage de HV présent dans le polymère sur le coefficient de Young (mesure de la raideur d'un solide), l'extensibilité et la résistance à la tension. Plus le polymère contenait du HV, moins celui-ci était raide et plus il était élastique. On peut donc obtenir une gamme de produits biodégradables avec les propriétés voulues en modifiant le ratio HB/HV.

Comme plusieurs autres polymères d'origine biologique, les PHA possèdent aussi des propriétés piézo-électriques (Lafferty et al., 1988); lorsqu'un film de PHB est soumis à une pression externe, un champ électrique est créé. Ces propriétés dépendent du degré de cristallinité du polymère. Il a été démontré que ces types de polymères, de par leurs propriétés piézo-électriques, accroissent la vitesse de croissance du tissu osseux (Lafferty et al., 1988). Des films de PHB ou de PHA pourraient être ainsi placés autour d'un os fracturé afin d'accélérer sa guérison.

Un autre intérêt des PHA est leur pureté énantiomérique. Par exemple, le PHB est uniquement composé de (D)-3-hydroxybutyrate. Par

Tableau 2: Propriétés physiques et chimiques du polypropylène (PP) et du poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (D'après Brandl *et al.*, 1990).

Paramètre	PP	PHB
Point de fusion T_m [°C]	171-186	171-182
Température de transition à l'état amorphe [°C]	- 15	5-10
Cristallinité [%]	65-70	65-80
Densité [$g \cdot cm^{-3}$]	0,905-0,94	1,23-1,25
Masse moléculaire M_w [$\times 10^5$]	2,2-7	1-8
Distribution de la masse moléculaire	5-12	2,2-3
Module de flexion [GPa]	1,7	3,5-4
Résistance à la traction [MPa]	39	40
Extensibilité [%]	400	6-8
Résistance aux ultra-violets	pauvre	bonne
Résistance aux solvants	bonne	pauvre
Perméabilité à l'oxygène [$cm^3 \cdot m^{-2} \cdot atm^{-1} \cdot d^{-1}$]	1700	45
Biodégradabilité	-	+
Production É.-U. annuelle approx. en tonne métrique [$\times 10^6$]	1,8	N.D. ^a

^a Non-déterminée

dépolymérisation du PHB ou du P(HB/HV), on peut alors obtenir des monomères chiraux optiquement purs qui pourront servir dans la synthèse de divers produits chiraux en chimie fine. Les monomères, après avoir été estérifiés avec les alkyles appropriés, peuvent être alors transformés en hormones sexuelles d'insectes pouvant être utilisées comme biopesticides, en grahamimycine A₁ (l'unité macrocyclique de l'antibiotique élaiophyline), en divers fongicides (norpyrénophorine, pyrénophorine, vermiculine) ou, encore, en S-citronellol, un composé utilisé dans la fabrication des parfums (Ramsay *et al.*, 1991; Holmes, 1988). La dépolymérisation peut se faire de différentes manières. Par exemple, une transestérification catalysée par le titanate permet l'obtention d'énantiomères purs à 75-90% (Lafferty *et al.*, 1988). L'utilisation de dépolymérases extracellulaires ou de mutants d'*Alcaligenes eutrophus* déficients en polymérase permettrait aussi d'obtenir ces isomères (Lafferty *et al.*, 1988). Finalement, l'activité optique des PHA fait qu'on peut utiliser ceux-ci comme phase stationnaire pour la séparation chromatographique d'isomères optiques (Uttley, 1985).

4.9. Production industrielle des PHA

Le PHB est produit par fermentation en mode semi-continu et en deux phases. Dans un premier temps, l'inoculum est ajouté à un milieu synthétique contenant les nutriments essentiels et une source de carbone appropriée pour la souche bactérienne utilisée. Cette phase déterminera en partie la biomasse totale. Il est donc important d'optimiser la quantité de carbone utilisée à ce stade afin d'obtenir un grand nombre de cellules. Des valeurs de biomasse cellulaire (poids sec) supérieures à 100 g/L (incluant

le PHB) ont été obtenues par Bourque et al. (1992b) avec *M. extorquens*. Lorsqu'un des nutriments essentiels (ex.: azote, phosphore ou oxygène) est épuisé, la phase d'accumulation du PHB débute; le carbone est alors converti en PHB (Holmes, 1988). C'est en gros le procédé que la compagnie ICI utilise avec *A. eutrophus*. Ce dernier procédé utilise un milieu contenant du glucose et des sels minéraux. Le signal d'accumulation de PHB est déclenché par une limitation délibérée en phosphore. À la fin de la deuxième phase, le PHB peut constituer jusqu'à 75% du poids sec de la biomasse cellulaire (Doi, 1990).

La firme Chemie Linz (Autriche) produit du PHB par fermentation en utilisant la souche *Alcaligenes latus* DSM 1124 (Byrom, 1991). Cette souche utilise le sucrose comme substrat. Il est intéressant de noter que l'accumulation de PHB se fait parallèlement à la croissance, comme pour un produit primaire. Une carence en nutriment n'est peut-être donc pas nécessaire pour initier la biosynthèse du PHB bien que Ramsay (1993), lui, a noté que *A. latus* produisait des quantités plus importantes de PHA en carence en azote.

Dans le cas où la source de carbone pourrait devenir toxique pour les cellules, il est alors préférable d'ajouter ce substrat de façon semi-continue, en mode "fed-batch". Par exemple, le méthanol est généralement toxique à des concentrations supérieures à 1,0 % (p/v) pour *M. extorquens* (Bourque et al., 1992a). Les chercheurs ont donc utilisé un système de contrôle informatisé qui permettait de maintenir la concentration finale de méthanol à environ 0.14 % (p/v) grâce à l'utilisation d'une sonde à méthanol et d'un ordinateur. Notons que dans le cas de *M. extorquens*,

l'azote (sous forme de NH_4Cl) constituait le nutriment limitant. Suzuki *et al.* (1986a et 1986b) ont pu obtenir des concentrations cellulaires de l'ordre de 200 g/L (poids sec) contenant environ 66 % (p/p) de PHB avec *Protomonas extorquens* en utilisant un système de conception différente contrôlant la concentration en méthanol.

L'obtention d'autres PHA se fait de façon similaire. Lors de la phase 2, il suffit en quelque sorte d'ajouter un mélange donné de sources de carbone à la culture. Par exemple, pour la production du copolymère P(HB/HV) par *A. eutrophus*, la compagnie ICI utilise un mélange d'acide propionique et de glucose. La composition du polymère est contrôlée par le rapport acide propionique/glucose du mélange. Ce copolymère peut aussi être obtenu en utilisant un mélange d'acide acétique et d'acide propionique (Doi, 1990).

4.10. Extraction des PHA

Les PHA étant des produits intracellulaires, il est donc nécessaire d'éliminer les substances "non-PHA" (protéines, acides nucléiques, peptidoglycane) entourant les granules de PHA. Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'éliminer ces substances contaminantes et ainsi purifier les PHA. Celles-ci seront examinées plus en détails dans cette section.

4.10.1. Extraction chimique

Les PHA sont solubles dans divers solvants tels le chloroforme, le

chlorure de méthylène, le 1,2-dichloroéthane ou le carbonate de propylène. Sur ce principe, on peut donc solubiliser les PHA directement de la biomasse cellulaire (Doi, 1990). Suite à la fermentation, la biomasse cellulaire est recueillie par centrifugation et est séchée par divers méthodes. Les PHA présents dans la biomasse sèche sont ensuite extraits en les solubilisant dans du chloroforme chaud; ce procédé solubilise aussi les lipides qui sont alors mélangés avec les PHA solubilisés. Les PHA sont alors séparés des lipides en les précipitant avec un agent dans lequel les PHA sont peu solubles (éthanol, méthanol, hexane ou diéthyl éther). Les PHA, maintenant sous forme solide, sont resolubilisés dans du chloroforme pour une purification plus poussée et finalement reprécipités dans de l'hexane.

Le désavantage de cette méthode, à grande échelle, est le besoin d'utiliser d'immenses volumes de solvants, ce qui rend cette technique coûteuse et polluante. En effet, lorsque la concentration en PHA dans un solvant donné dépasse 5%, la solution devient tellement visqueuse qu'il est difficile de récolter le polymère par filtration ou par centrifugation. Aussi, pour chaque kilogramme de PHA extrait, un kilogramme de solvant est perdu et ne peut être réutilisé (Holmes et Lim, 1988) mais le reste des solvants peut être recyclé; ceci pourrait être dû à l'évaporation, à l'adsorption du solvant sur le filtre, à la centrifugation, etc. De telles quantités de solvants, potentiellement nuisibles pour l'environnement, semblent contre-indiquées pour l'obtention de produits "verts" tels les plastiques biodégradables.

Une autre technique d'extraction consiste à traiter les cellules avec

une solution d'hypochlorure de sodium pendant 30 à 60 minutes pour digérer les substances "non-PHA" de la cellule et ainsi obtenir des granules de PHA purifié. Ce procédé peut cependant avoir un effet négatif sur le poids moléculaire final des PHA. Par exemple, Berger *et al.* (1989) ont réussi à atteindre un niveau de purification des PHA de 95% avec cette méthode mais la masse moléculaire des PHA purifiés avait baissé de moitié (600,000 Da versus 1,200,000 Da). Un prétraitement avec le détergent non-ionique Triton X-100 pendant 15 minutes, suivi du traitement à l'hypochlorure de sodium, a permis d'obtenir des PHA à 98% purs montrant un masse moléculaire de 790,000 (Ramsay *et al.*, 1990). La digestion à l'hypochlorure de sodium permet aussi d'obtenir des granules de PHA dont la morphologie est préservée; ce type de granules permet des applications plus diverses que celles offertes par les préparations de PHA obtenues après extraction aux solvants (Ramsay *et al.*, 1990). Après ces traitements à l'hypochlorure de sodium, les granules sont récoltés par centrifugation puis lavés à l'eau, recentrifugés et séchés pour une utilisation ultérieure.

4.10.2. Extraction mécanique

L'utilisation d'homogénéisateurs à haute pression de type Manton-Gaulin à été proposée par Korsatko (Lafferty *et al.*, 1988) afin d'extraire les PHA; avec cette approche, la biomasse cellulaire est soumise à de hautes pressions de telle sorte que les cellules sont détruites suite à leur collision avec un anneau d'impact. Les PHA peuvent être alors séparés du reste de la biomasse par centrifugation, par extraction au solvants, ou par filtration tangentielle ("cross-flow"). D'autres appareils, tels les meules à billes

("bead-mill") et les presses de French, peuvent être aussi utilisés pour libérer les granules de leur enveloppe mais l'utilisation de ces techniques présente certains désavantages. En plus d'être énergivores et coûteuse, ces techniques exigent des investissements en capital élevés. Une alternative intéressante à ce type de méthode serait l'utilisation d'enzymes pour extraire des produits intracellulaires comme les PHA.

4.10.3. Extraction enzymatique

On trouve assez peu d'informations dans la littérature sur l'utilisation d'enzymes lytiques pour l'extraction des PHA. La firme ICI a breveté une technique utilisant des "cocktails" d'enzymes capables de dégrader les diverses constituantes de la cellule bactérienne tout en laissant intact les PHA (Holmes et Lim, 1988). Avec ce procédé, des cellules sont d'abord traitées à la chaleur pour dénaturer et dégrader les acides nucléiques de la cellule. Ces cellules sont ensuite soumises à l'action de protéases diverses (pepsine, trypsine, bromélaïne, etc) afin d'hydrolyser la fraction "protéines" de la biomasse; ces enzymes sont couramment utilisées dans les détergents pour la lessive. Des phospholipases, telle la Lécitase de la firme Novo Nordisk (Danemark), peuvent être aussi utilisées pour dissoudre les phospholipides membranaires. Des surfactants, tel le SDS (sodium dodécyle sulfate), peuvent être ajoutés comme étape finale avant la récolte des PHA par centrifugation. Avec cette technique, Holmes et Lim (1988) ont obtenu du PHB à 94% pur.

La firme PCD Polymere G.m.b.H. (Allemagne) a breveté une technique d'extraction faisant appel à la biologie moléculaire (Lubitz, 1991). Une

souche recombinante de *E. coli* contenant l'opéron *phb*, permettant la production de PHB par cette souche, contient un plasmide pBluescript pSK(-) possédant le gène E du phage ϕ X174. Ce gène est impliqué dans la phase lytique du cycle infectieux du phage et est sous le contrôle d'un promoteur thermosensible. En soumettant la culture à une température de 42°C pendant 10 minutes, les cellules sont lysées et les granules sont récoltés par centrifugation sur gradient de glucose.

Une autre approche potentiellement efficace serait l'utilisation d'enzymes lytiques spécifiques à la bactérie productrice de PHA. Ces enzymes pourraient être beaucoup plus efficaces que les préparations d'enzymes commerciales non-spécifiques utilisées jusqu'à présent. Une telle approche a déjà été sérieusement envisagée pour la récupération de divers produits (protéines recombinantes, antibiotiques, pigments, enzymes, PHA) chez certaines bactéries et levures (Andrews et Asenjo, 1987).

L'utilisation d'enzymes lytiques dans la libération de produits intracellulaires demande une bonne connaissance de la paroi bactérienne. La paroi bactérienne, barrière de la cellule contre son environnement, joue plusieurs rôles. De par ses propriétés physiques, la paroi est assez forte pour protéger la membrane cytoplasmique contre diverses forces (conditions physiques, osmotiques, etc). Cependant, la paroi doit aussi être assez souple pour permettre la croissance de la cellule (Thwaites et Surana, 1991). Chez les bactéries, ainsi que chez les rickettsies et les cyanobactéries, la paroi contient principalement une macromolécule appelée peptidoglycane (anciennement, muréine ou mucopeptide). Comme

on peut le voir à la Figure 10, le peptidoglycane est constitué d'une chaîne de disaccharides, consistant de N-acétylglucosamine attaché par un lien $\beta(1\rightarrow4)$ glucane à son dérivé 3-O-D-lactyle éther, l'acide N-acétylmuramique. Ces chaînes sont reliées entre elles par des peptides, lesquelles sont liés à la chaîne par les groupes carboxyles de l'acide N-acétylmuramique. Ces peptides sont constitués de deux sections, l'une toujours présente, le térapeptide, relié à l'acide N-acétylmuramique, puis le pont (représenté par X à la figure 10), qui permet le lien entre les térapeptides, fermant ainsi la structure du peptidoglycane. Cette dernière structure n'est pas toujours présente. La composition en acides aminés de ces peptides varie d'une espèce à l'autre et peut être utilisée pour classifier taxonomiquement les procaryotes, selon la composition chimique (chénotype) de la paroi (Rogers et al., 1980). La structure du térapeptide tend à être conservée et possède la séquence suivante: L-ala-D-glu-AA(3)-D-ala où AA(3) est un acide diaminé spécifique à l'espèce tels la L-lysine, les divers isomères de l'acide diaminopimélique (DAP) ou l'ornithine (Sleyter et al., 1988). Notons que chez les bactéries Gram-négatives, la structure du peptidoglycane ne varie pas d'une espèce à l'autre. Le AA(3) est toujours le *méso*-DAP et il n'y a jamais de ponts liant les térapeptides. Ces derniers sont liés entre eux par l'acide aminé 3 d'une chaîne et par l'acide aminé 4 de l'autre chaîne, le D-alanine. *Methylobacterium extorquens* possèdent une paroi de ce type.

Il existe deux types majeurs d'organisation du peptidoglycane et des autres composantes chez les procaryotes, qui deviennent différenciés lors de la coloration Gram. Les bactéries Gram-positives (Figure 11) retiennent le complexe violet après extraction de ce dernier par l'alcool, donnant ainsi

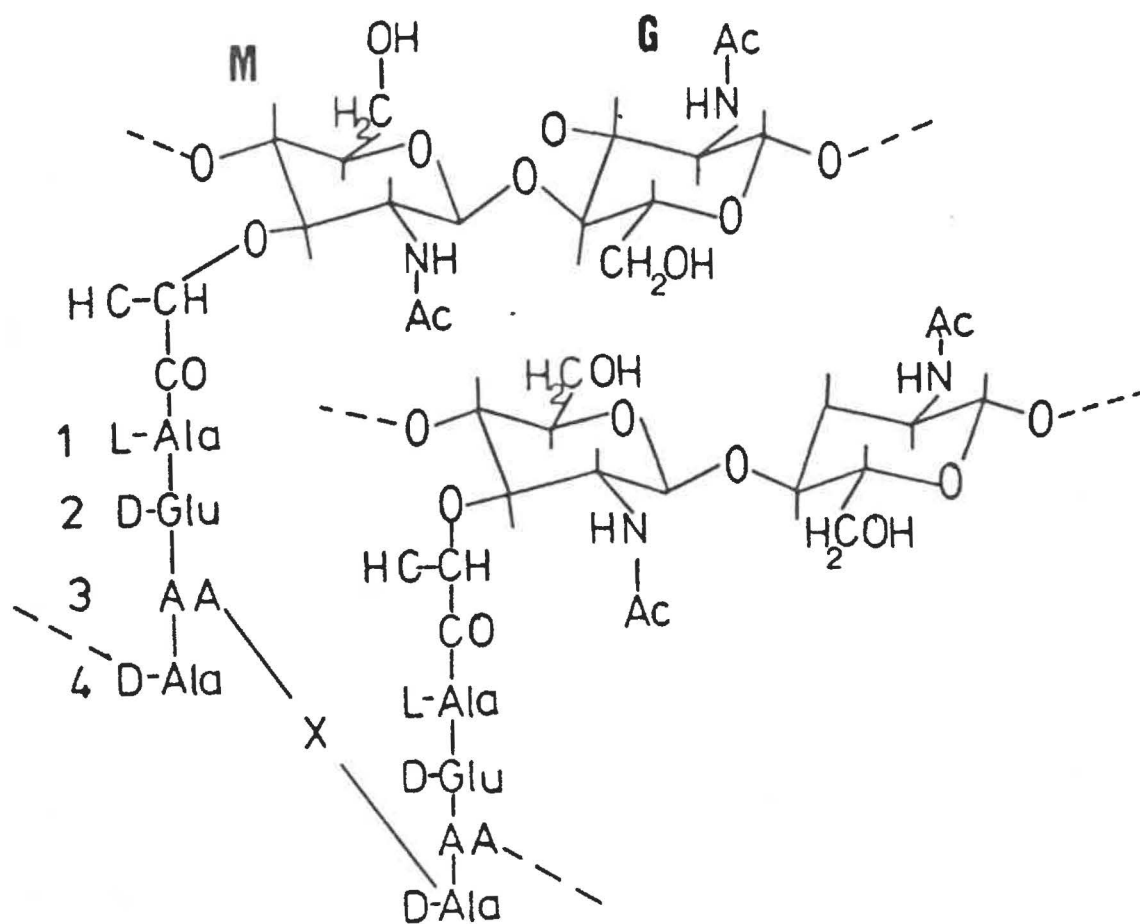


Figure 10: Structure chimique du peptidoglycane. (G): N-acétylglucosamine, (M): acide N-acétyl-muramique, (X): pont (D'après Sleyter *et al.*, 1988)

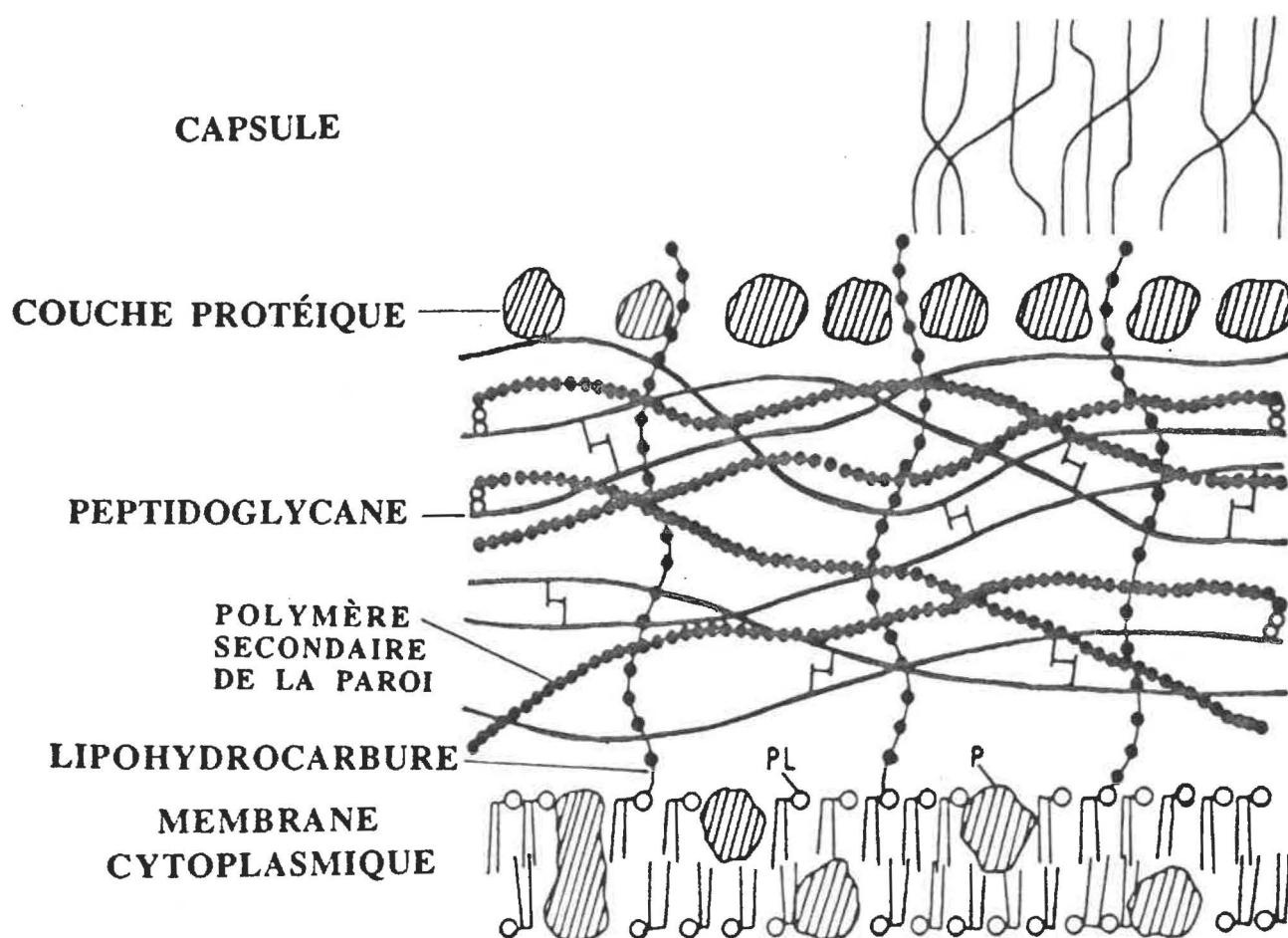


Figure 11: Structure de la paroi des bactéries Gram-positives. P: protéine, PL: phospholipide (D'après Sleyter *et al.*, 1988).

une couleur violacée au frottis bactérien. Chez ces bactéries, la paroi est plutôt simple, consistant en une épaisse couche de peptidoglycane recouvrant la membrane cytoplasmique interne. En effet, le peptidoglycane représente 50 à 80% du poids sec de la paroi, le reste étant composé de polymères accessoires (acides teichoïques, polysaccharides et protéines) liés par covalence au peptidoglycane (Sleyter et al., 1988). Les bactéries Gram-négatives (Figure 12), elles, possèdent une paroi plus complexe formée d'une mince couche de peptidoglycane (5-10% du poids sec de la paroi) recouverte d'une membrane externe et de lipopolysaccharides (LPS). Le peptidoglycane n'est pas lié à des polymères accessoires comme chez les bactéries Gram-positives, bien qu'on retrouve souvent des lipoprotéines de faibles poids moléculaires liées covalamment à l'acide diaminopimélique des ponts peptidiques (Sleyter et al., 1988). Ces lipoprotéines servent de liens entre le peptidoglycane et la membrane externe. Comme la membrane interne, la membrane externe est constituée d'une couche lipidique double mais, chez *E. coli* par exemple, son contenu en phospholipide est 50% moins élevé que celui de la membrane cytoplasmique externe. La couche extérieure de la membrane externe est constituée surtout de LPS (Sleyter et al., 1988).

Plusieurs types d'enzymes sont retrouvés dans les mélanges enzymatiques capables de lyser les bactéries. On y retrouve des glycosidases, par exemple le lysozyme, coupant les liens $\beta(1\rightarrow4)$ du peptidoglycane, des amidases hydrolysant le lien amide entre l'alanine et l'acide N-acétylmuramique, et des endopeptidases clivant les peptides présents entre les chaînes de polysaccharides. La majorité de ces enzymes montrent une activité maximale à des valeurs de pH de 6 à 7 et à des

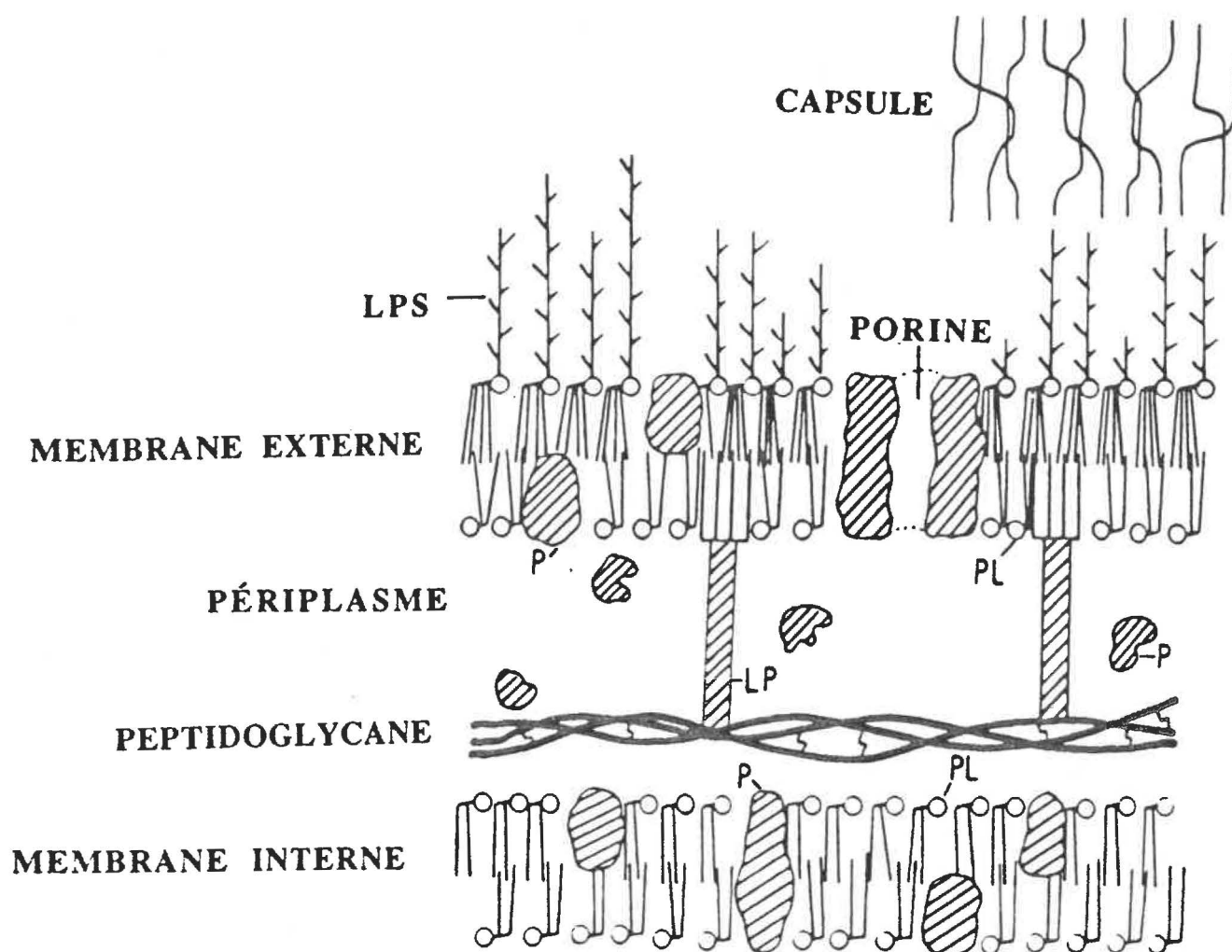


Figure 12: Structure de la paroi des bactéries Gram-négatives. P: protéine, PL: phospholipide, LP: lipoprotéine, LPS: lipopolysaccharides (D'après Sleyter *et al.*, 1988).

températures de 30 à 60°C. Ces enzymes sont surtout actives sur des cellules ayant été lyophilisées ou tuées à la chaleur, ou encore, sur des parois isolées (Andrews et Asenjo, 1987).

Le Tableau 3 présente une variété d'organismes producteurs d'enzymes lytiques actives sur des bactéries (enzymes bactériolytiques). Ceux-ci ont été isolés à partir de substances en décomposition, de boues activées, d'effluents de brasserie, du sol et même de la bouche (Andrews et Asenjo, 1987). Tel que rapporté plus tôt, il existe peu de littérature sur l'utilisation d'enzymes lytiques pour l'extraction des PHA. À ce jour, il n'y a pas eu de cas où des enzymes lytiques spécifiques ont été utilisées pour libérer les granules de PHA. Il existe cependant des précédents: certaines bactéries produisant des enzymes bactériolytiques spécifiques contre diverses bactéries ont déjà été obtenues (Andrews et Asenjo, 1987).

L'utilisation d'enzymes lytiques spécifiques pourrait permettre d'autres usages intéressants des restes de la biomasse cellulaire traitée. Lam et GrootWassink (1990) ont utilisé une souche d'*Arthrobacter* produisant des enzymes lytiques actives sur *Kluyveromyces fragilis*, une levure produisant de l'inulase. Après la récupération de l'inulase, les débris de ces levures peuvent servir ensuite de source d'azote, de vitamines et de minéraux pour la croissance et la production d'inulase par *K. fragilis*. Ces hydrolysats de cellules pourraient aussi servir pour des usages divers, comme des aliments pour animaux, par exemple. De plus, les effluents provenant d'un tel procédé enzymatique seraient beaucoup moins dangereux pour l'environnement, étant eux-même biodégradables. *Methylobacterium extorquens* possède un pigment rose dans sa paroi; il

Tableau 3: Quelques systèmes d'enzymes bactériolytiques (D'après Andrews et Asenjo (1987))

Microorganismes ou autres sources:	Actif sur:	pH optimal	Température optimale, °C
<i>Cytophaga</i> NCIB 9497	<i>Bacillus</i> Corynébactéries <i>E. coli</i>	9,0	45-55
Lysozyme ¹	<i>E. coli</i> <i>M. lysodeikticus</i>	6,0-7,0	35
<i>Cytophaga</i> B-30	<i>Staphylococcus</i>	9,5	50
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>M. luteus</i>	6,0-7,0	37
<i>Stp globisporus</i> ²	<i>M. lysodeikticus</i> <i>Streptococcus</i>	6,5	50
<i>Micromonospora</i> sp.	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i>	11	60
<i>Bacillus subtilis</i> 797	<i>E. coli</i>	7,8-8,5	30

¹Lysozyme de blanc d'oeuf de poule,

²*Stp*= *Streptomyces*

pourrait donc être intéressant de l'extraire pour l'industrie des colorants naturels, toujours à la recherche de nouveaux produits. Par exemple, Johnson et al. (1978) ont déjà étudié l'extraction de l'asthaxanthine de la levure *Phaffia rhodomiza* en utilisant les enzymes lytiques de *Bacillus circulans* WL-12, qui sont actives sur la paroi de cette levure; ce pigment rose aurait des applications comme supplément à l'alimentation des saumons, ce qui rendrait leur chair plus rose et plus attrayante pour le consommateur.

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Les objectifs de cette recherche étaient les suivants:

- Isoler des microorganismes produisant des zones d'éclaircissement sur des géloses contenant des cellules tuées de *M. extorquens* (géloses Mex) et suggérant la production d'enzymes lytiques;
 - Sélectionner la souche lytique la plus prometteuse pour la libération des granules de PHB;
 - Identifier, par diverses techniques, la souche sélectionnée;
 - Optimiser divers paramètres affectant la réaction de lyse tels le pH, la température, la concentration d'enzymes et la concentration de divers sels (ions);
 - Effectuer des essais de digestion sur des cellules tuées de *M. extorquens* contenant une quantité appréciable de PHB en utilisant le système lytique brut dérivé de la souche sélectionnée;
 - Améliorer, si possible, la digestion des cellules et la libération des granules de PHB par l'utilisation combinée des enzymes et de divers agents chimiques tels les détergents et des agents chélateurs.
-

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Microorganismes utilisés et leur conservation

1.1. Microorganismes utilisés

Methylobacterium extorquens, une bactérie méthylo-trophe productrice de PHB, a été isolée par Denis Groleau (IRB) à partir d'un échantillon de sol contaminé par des huiles usées (Bourque et al., 1992a).

Streptomyces exfoliatus, une bactérie (actinomycète) produisant un système d'enzymes lytiques capable de lyser partiellement des cellules de *M. extorquens*, a été isolée par l'auteur à partir d'un échantillon de sol, de la façon décrite à la section 4.

Bacillus thuringiensis (souche sauvage) a été fournie par Rolland Brousseau (IRB) et *Escherichia coli* DL 39 a été obtenue de Irena Ekiel (IRB). Ces deux souches servaient de contrôle positif et négatif, respectivement, pour la coloration de Gram.

1.2. Conservation de ces microorganismes

Methylobacterium extorquens était conservée sur des géloses inclinées de milieu Choi #2 (composition donnée à la section 3), à 4°C. Pour la préparation des milieux gélosés, 15 g d'agar-agar étaient ajoutés par litre de bouillon de base, le mélange était chauffé jusqu'à dissolution de l'agar-agar, puis était autoclavé (121°C, 15 minutes). Par la suite, du méthanol stérile était ajouté au milieu partiellement refroidi pour donner une concentration finale en méthanol de 1% (v/v). Pour la préparation des géloses inclinées, un volume d'environ 7 mL du milieu complet était ajouté

à des tubes Kimax stériles de 10 mL à bouchon vissable; les tubes étaient refroidis avec une légère inclinaison. Lorsque requis, un certain nombre de ces géloses inclinées étaientensemencées avec une culture de *M. extorquens* puis incubées à 30°C jusqu'à l'obtention d'une biomasse suffisante. Ces géloses étaient finalement conservées à 4°C.

Streptomyces exfoliatus était conservé sur des géloses inclinées de milieu Mex à 4°C. La préparation du milieu Mex sera expliquée à la section 3. Les géloses inclinées du milieu Mex étaient préparées, ensemencées, et incubées tel que décrit plus tôt pour *M. extorquens*.

Bacillus thuringiensis et *Escherichia coli* DL 39 étaient conservés sur des géloses nutritives ("Nutrient Agar", DIFCO, Détroit, MI, É.-U.) à 4°C.

2. Production de cellules (biomasse) de *Methylobacterium extorquens*

2.1. Production de cellules de *Methylobacterium extorquens* contenant peu ou pas de PHB

La production de ces cellules était faite en flacons en employant un bouillon de milieu Choi #2 (composition à la section 3). Ce bouillon fut modifié comme suit: la concentration de sulfate d'ammonium fut haussée à 2,5 g/L et la concentration en méthanol réduite à 0,2 % (v/v); ceci retardait l'apparition de PHB en réduisant le ratio C/N utilisé. Ce bouillon était employé à la fois pour la préparation des inocula et pour la production des cellules de *M. extorquens*.

Pour la préparation des inocula, des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de bouillon Choi #2 modifié étaient d'abordensemencées à partir des géloses inclinées de *M. extorquens* et incubées dans un incubateur-agitateur New Brunswick (modèle G25, Edison, N.J., É.-U.) à 30°C avec une agitation orbitale de 200 rpm. Après 2 jours, des volumes de 12,5 mL de ces cultures étaient alors transférés dans des fioles de 1 L contenant 250 ml de milieu Choi #2 modifié et les fioles étaient incubées comme précédemment pendant 3 jours. Les cultures étaient alors centrifugées (centrifugeuse Beckmann J2-21M (Fullerton, CA, É.-U.), 10 000 rpm (soit 15 300 X g) avec un rotor JA-14, 15 minutes, 4°C) et les cellules étaient resuspendues dans le tampon désiré. Les cellules de *M. extorquens* sans PHB subissaient alors un traitement thermique de 15 minutes à 121°C à l'autoclave afin de les tuer et les "attendrir" avant leur utilisation comme substrat pour les tests de lyse. Ces cellules étaient conservées de manière stérile pendant un mois à 4°C.

2.2. Production de cellules de *Methylobacterium extorquens* contenant du PHB

2.2.1. Cellules requises pour l'isolement des souches lytiques

Ces cellules étaient produites en fermenteur CHEMAP 2000 (Volketswil, Suisse) de 14 L en mode semi-contenu en utilisant le bouillon Choi #2 régulier (Tableau 4). Ces cellules servaient de substrat dans le milieu Mex. Un inoculum de 4 jours était d'abord produit dans des fioles Erlenmeyer de 1 L contenant 250 mL de milieu, à 30°C, avec une agitation de 200 rpm. Un volume de 400 mL de cette culture était ensuite transféré

dans le fermenteur contenant 5 L de milieu Choi #2 régulier. Le pH était contrôlé à 7,0 par l'ajout automatique de KOH (5 N). L'agitation était maintenue à 450 rpm. Initialement, l'ajout du substrat (méthanol) était sous le contrôle du profil de respiration de la culture. Plus tard, un système de contrôle informatisé décrit par Bourque *et al.* (1992b) a été utilisé pour contrôler l'ajout du méthanol et du sulfate d'ammonium (ou de l'hydroxyde de potassium en deuxième phase de la fermentation). La fermentation durait environ 5 jours. Les cellules étaient ensuite centrifugées (centrifugeuse Beckmann J2-21M (É.-U.), 10 000 rpm (soit 17 700 X g) avec un rotor JA-10, 45 minutes, 4°C) et les culots étaient finalement congelés à -20°C pour usage ultérieur.

2.2.2. Cellules requises pour certains tests de lyse

Les cellules de *M. extorquens* avec PHB destinées à certains essais de lyse enzymatique étaient produites en fioles tel que décrit dans la section 2.1 pour les cellules avec peu ou pas de PHB. Ici toutefois, le milieu Choi #2 régulier était employé. Après récolte des cellules, celles-ci subissaient un traitement thermique de 15 minutes à 121°C, dans un autoclave, ou encore dans un bain-marie à 85 ou 100°C. Dans certaines expériences, les cellules n'étaient pas traitées à la chaleur.

2.3. Évaluation de la quantité de cellules (biomasse) de *Methylobacterium extorquens*

Le poids sec a été utilisé comme mesure de la quantité de cellules (biomasse) dans nos travaux de production de cellules. Un volume de 100

mL d'eau bidistillée était d'abord filtré sur une membrane Millipore HA (Bedford, MA, É.-U.) de 0,2 μm pour nettoyer celle-ci. Un volume connu de culture était ensuite prélevé de la fiole ou du fermenteur et filtré sur cette membrane. Un même volume d'eau bidistillée était aussi filtré en parallèle sur une autre membrane. Les 2 séries de membranes étaient pesées, puis séchées à 105 °C pendant 48 heures; elles étaient ensuite placées dans un dessiccateur pour 15 minutes, le temps de refroidir, puis repesées de nouveau le plus rapidement possible afin de minimiser l'erreur apportée par la présence d'humidité. La différence de poids entre l'échantillon avant et après le séchage était notée et corrigée pour la perte de poids normale de la membrane seule (contrôle avec l'eau bidistillée). Le poids corrigé était ensuite converti en unités g/L de poids sec.

3. Milieux de culture utilisés

3.1. Milieu Choi #2

Le milieu synthétique Choi #2 (Bourque, 1992) a été utilisé pour la croissance de *M. extorquens*. La composition de ce milieu est donnée au Tableau 4.

3.2. Milieu Mex

Le milieu Mex a été utilisé pour isoler un certain nombre de souches produisant des enzymes lytiques partiellement actives sur des cellules tuées de *M. extorquens*. Le même milieu Mex, avec ou sans modification, a

Tableau 4: Composition du milieu Choi #2

Ingrédients	Quantité (g/L)¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	1,305
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,45
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,0049
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0026
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0008
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0008
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0008
H ₃ BO ₃	0,0006
Méthanol (99.8 %, redistillée)	0,5 ²

¹ en gramme par litre d'eau bidistillée

² donnée en % (v/v)

Note: le pH initial du milieu était d'environ 6,8 mais était ensuite maintenu à 7.

aussi été employé pour la production d'enzymes lytiques brutes dans certaines expériences. Ce milieu consistait en une suspension à 2 g/L de cellules de *M. extorquens* dans du tampon phosphate de sodium (50 mM) à pH 7,0. Pour le milieu Mex solide, 1,5 % (p/v) d'agar-agar était ajouté à cette solution. Le tout était stérilisé à l'autoclave (121°C, 15 minutes).

3.3. Milieu CASO

Ce milieu, produit par la firme E. Merck (Darmstadt, Allemagne), est à base de peptone de caséine et de farine de soya; il a été utilisé pour la production de cellules (biomasse) de *Streptomyces exfoliatus* durant les travaux d'identification de cette souche. Il a été aussi utilisé pour la production du système d'enzymes lytiques dans certaines expériences. Le milieu a été préparé selon les recommandations du manufacturier.

3.4. Bouillon nutritif

Le Bouillon nutritif de DIFCO (Détroit, MI, É.-U.) a été utilisé lors de certaines étapes de la purification des souches lytiques et aussi pour la conservation des souches utilisées comme contrôles lors de la coloration Gram. Il a été préparé selon les recommandations du manufacturier.

4. Isolement de souches lytiques actives sur des cellules tuées (chauffées) de *Methylobacterium extorquens*

La procédure générale pour l'isolement de souches produisant des enzymes lytiques contre des cellules tuées de *M. extorquens* est donnée à

la Figure 13.

4.1. Enrichissement en microorganismes lytiques

Des échantillons de sols ont été prélevés dans la région de Montréal et de Laval (Tableau 5). Environ 5 g de sol était ajouté à 100 mL d'une solution saline (0,85 % NaCl, p/v) stérile contenant 1 g (poids humide) de cellules de *M. extorquens* tuées à la chaleur (121°C, 15 min.) comme seule source de nutriments. Ces mélanges étaient par la suite incubés pendant environ 10 jours à 30°C avec une agitation à 200 rpm. L'évolution microbiologique de ces mélanges était régulièrement suivie par microscopie en contraste de phase.

4.2. Isolement de microorganismes lytiques

Utilisant les cultures "enrichies" préparées précédemment, des dilutions en série de ces cultures ont été faites dans de la saline stérile (comme ci-haut). Seules les dilutions 10^{-3} à 10^{-6} étaient par la suite échantillonnées; pour ce faire, un volume de 0,5 mL de chacune de ces dilutions était réparti sur des géloses Mex (en duplicata) en employant un manche de verre incurvé. Les géloses étaient ensuite incubées à 30°C jusqu'à ce que des zones de lyse puissent être notées. Les colonies correspondant à ces zones étaient ensuite repiquées sur des géloses Mex fraîches et les cultures purifiées selon les besoins par striation par épuisement ou par dilution. Dans un cas, la purification fut réalisée en

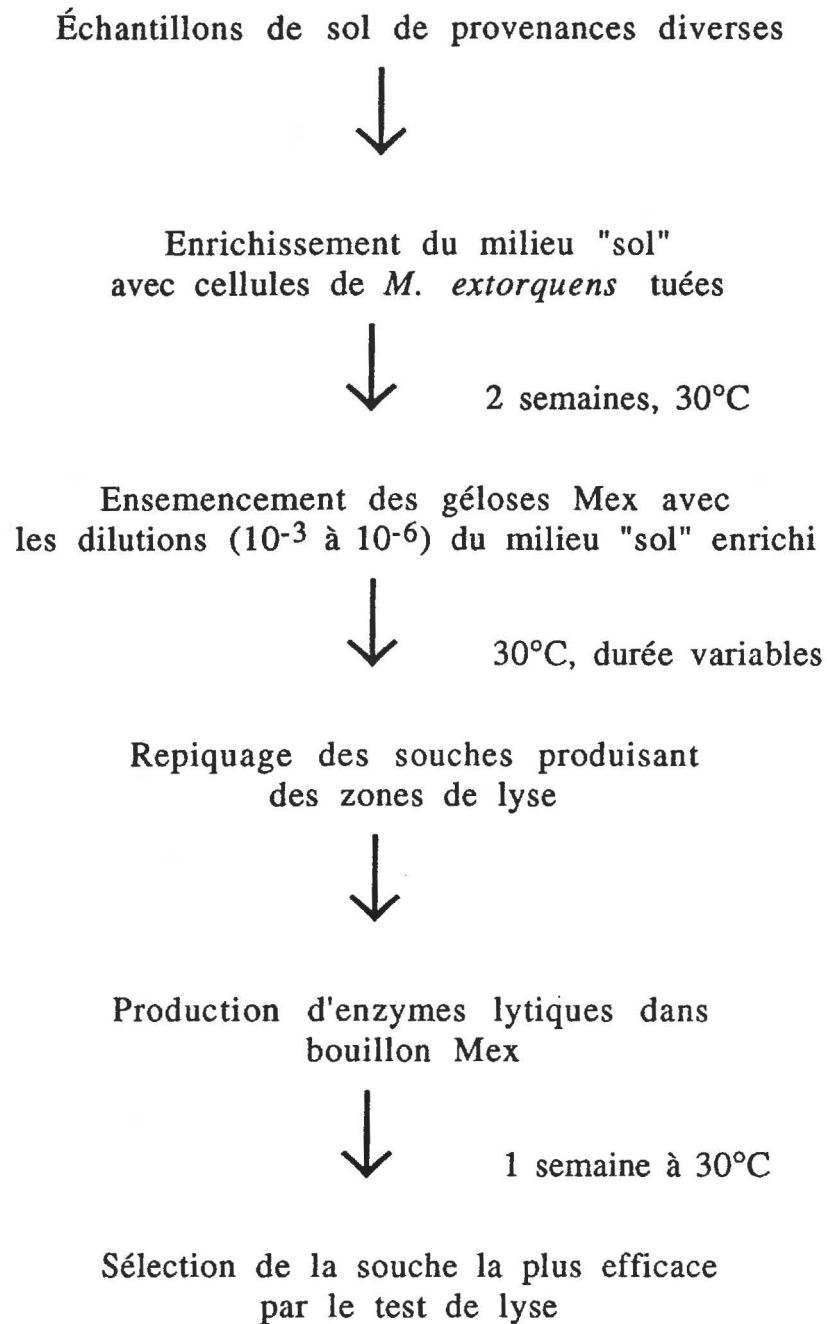


Figure 13: Schéma décrivant la procédure d'isolement de la souche lytique sélectionnée.

Tableau 5: Description des échantillons de sol utilisés lors de l'isolement de la souche lytique

Essai d'isolement	Provenance	Description
1	Ville Lasalle	sol de jardin de fleurs, exposé à la lumière
2	Ville St-Laurent	sol exposé à l'air libre
	Montréal	sol provenant d'une plate-bande de jonquilles
	Laval	sol provenant d'une rocaille de bégonias, enrichi de fumier de mouton l'année précédente
	Ville Lasalle	sol provenant du dessous d'un conifère, sous un amas d'aiguilles
	Parc Angrignon #1 (Montréal)	boues près d'un ruisseau et recouvertes de feuilles mortes très humides
Parc Angrignon #2 (Montréal)	sol provenant d'une zone gazonneuse humide	

employant des géloses nutritives ("Nutrient Agar" de DIFCO) afin d'accélérer le processus d'isolement. Les souches ainsi obtenues étaient conservées sur des géloses inclinées Mex à 4°C.

4.3. Criblage des souches lytiques les plus actives

Suite à l'obtention de souches pures causant des zones de lyse sur les géloses Mex, on a fait croître chacune de ces souches dans 50 mL de milieu Mex liquide contenu dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL. Les fioles étaient incubées à 30°C dans un agitateur New Brunswick (modèle G25), à une agitation de 200 rpm, pendant une semaine, et l'évolution des cultures suivie régulièrement par des examens microscopiques en contraste de phase. À la fin de l'incubation, le contenu des fioles était centrifugé (centrifugeuse Beckmann J2-21M (É.-U.), 10 000 rpm (soit 15 300 X g) avec un rotor JA-14, 15 minutes, 4°C) et les surnageants conservés à 4°C pour détermination ultérieure de leur activité lytique. La souche la plus prometteuse fut sélectionnée suite à ces travaux tel que décrit dans la prochaine section.

5. Production d'enzymes lytiques et détermination de l'activité lytique

5.1. Production d'enzymes lytiques

Les enzymes lytiques de *S. exfoliatus* étaient produites et récoltées tel que décrit dans la section 4.3 à l'exception de l'agitation qui avait été augmentée à 300 rpm pour mieux oxygéner la culture. Certaines fois, les

cultures étaient faites dans de plus grosses fioles Erlenmeyer en gardant la même proportion volume de milieu/volume de la fiole.

5.2. Détermination de l'activité lytique

Le test suivant a permis de déterminer l'activité lytique présente dans les surnageants obtenus tel que décrit dans la section 4.3 ci-haut. Le même test a aussi été utilisé lors de l'optimisation partielle des conditions de lyse et lors des essais avec divers agents chimiques.

Une certaine quantité de cellules traitées à la chaleur (121°C, 15 minutes) de *M. extorquens*, contenant peu ou pas de PHB, était resuspendue dans un tampon approprié afin d'obtenir une densité optique initiale non-correctée de 0,600 à 0,900 à 600 nm dans un tube Kimax de 13 mm de diamètre externe par 100 mm de longueur. À un volume de 2,5 mL de cette suspension, on ajoutait alors un volume égal de surnageant de culture contenant des enzymes lytiques brutes (volume total de 5 mL). La réaction lytique se faisait dans des fioles Erlenmeyer de 25 mL placées dans un incubateur-agitateur New Brunswick (modèle G24) à une agitation de 250 rpm et à la température appropriée. Les tests de lyse initiaux étaient effectués à 37°C dans du tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7,0. Les conditions pour l'optimisation partielle du test de lyse sont données à la section suivante. La densité optique de la suspension était déterminée à des temps réguliers. La densité optique était ensuite corrigée selon la table de Toennies et Gallant (1949) et la baisse de densité optique obtenue était utilisée dans le calcul suivant:

$$\frac{(D.O.T_x \text{ corr.} - D.O.T_0 \text{ corr.}) \times 1000}{\text{Temps Tx (minutes)}} = y \text{ Unité lytique (UL)}$$

Une unité lytique a donc été définie comme correspondant à une baisse de 0,001 unité de densité optique corrigée (à 600 nm) par minute dans les conditions utilisées. La valeur d'activité lytique mesurée était ensuite convertie en unités lytiques par millilitre de volume final (UL/mL).

Pour les expériences d'optimisation de la lyse, la diminution de la densité optique était exprimée en pourcentage de baisse comme suit (avec les valeurs de D.O. corrigée):

$$100 - (D.O.T_x \text{ corr.} / D.O.T_0 \text{ corr.}) \times 100 = \% \text{ baisse D.O.}_{600\text{nm}}$$

En général, les tests de lyse enzymatique étaient suivis par des observations au microscope en contraste de phase afin d'évaluer visuellement le degré de solubilisation du matériel cellulaire autre que le PHB, dans le cas où les cellules contenaient une grande quantité de PHB.

5.3. Optimisation partielle des conditions réactionnelles

La détermination du pH optimal fut faite à 37°C avec les tampons suivants: le tampon citrate de sodium pour les pH de 3,0 à 6,2, le tampon phosphate de sodium pour les pH de 5,8 à 8,0, le tampon Tris-HCl pour les pH de 7,6 à 9,0 et le tampon carbonate de sodium pour les pH de 9,7 à 10,3. Tous ces tampons étaient à une concentration finale de 50 mM. La méthode décrite à la section 5.2 fut utilisée. Les contrôles négatifs étaient effectués en ajoutant les tampons appropriés aux suspensions cellulaires,

pour observer l'"autolyse" des cellules..

La détermination de la température optimale fut faite à des températures allant de 30 à 60°C dans le tampon approprié au pH optimal (déterminé plus tôt). La méthode décrite à la section 5.2 fut utilisée. Pour les contrôles négatifs, le tampon approprié était ajouté aux suspensions cellulaires.

Les tests effectués avec divers sels (ions) ont été faits dans les conditions "optimales" identifiées plus tôt en ajoutant à la suspension cellulaire (avant l'ajout du système lytique) l'un ou l'autre des sels suivants: SnCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , CuCl , CrCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , KCl , NaCl , FeCl_3 , CsCl , HgCl_2 . Ces sels étaient ajoutés à des concentrations finales de 1 ou 10 mM. La méthode décrite à la section 5.2 fut utilisée. Le pourcentage de lyse obtenu pour les contrôles négatifs (avec tampon) était soustrait du pourcentage de lyse obtenu pour les échantillons traités. Un contrôle sans sel ajouté a été effectué pour comparaison et celui-ci était considéré comme ayant 100 % d'activité relative.

6. Détermination des divers activités enzymatiques du système lytique

6.1. Activité protéolytique

L'activité protéolytique du système lytique a été évaluée en utilisant un substrat chromophore, l'AZOCOLL (CALBIOCHEM, San Diego, CA, É.-U.). Ce substrat, à base de cuir de vache, contient un pigment rouge qui est libéré

lorsque le collagène du cuir est attaqué par des protéases.

La libération du pigment rouge était évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 520 nm après centrifugation du mélange réactionnel (minicentrifugeuse Eppendorf 5414, (Brinkmann, Rexdale, ONT, Canada), 2 minutes, vitesse maximale, 4°C). À 5 mL de surnageant contenant le système d'enzymes lytiques, 50 mg d'AZOCOLL étaient ajoutés et le mélange agité à 200 rpm, à 37°C. Parallèlement, un contrôle avec du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0) était aussi incubé dans les mêmes conditions.

6.2. Activité N-acétyl-glucosaminidase

La N-acétyl-glucosaminidase est une enzyme qu'on retrouve souvent dans des systèmes bactériolytiques. Lorsqu'un substrat chromophore, tel le 4-méthylumbelliféryl-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside, ou 4-MUADG (ICN, Mississauga, Ont., Canada), est en présence de cette enzyme, le chromophore 4-méthylumbelliférone est libéré dans le milieu réactionnel. Celui-ci émet de la fluorescence lorsqu'il est excité par des rayons ultra-violets.

Une solution mère de 4-MUADG à 0,1 mg/mL a été préparée. À un volume de cette solution, un volume égal de surnageant de culture (contenant le système lytique) était ajouté et le mélange incubé à la température désirée. Un contrôle négatif était fait avec du tampon phosphate de sodium (50 mM), au pH désiré. Après 5 minutes d'incubation, le mélange était placé dans une chambre à rayons ultra-violets (UVP Inc.,

É.-U.) utilisant une lampe à hautes longueurs d'onde ("long waves") et la présence ou l'absence de fluorescence notée, indiquant la présence ou l'absence de libération de 4-méthylumbelliférone.

6.3. Activité lysozyme

Un dérivé du 4-méthylumbelliférone existe aussi pour détecter la présence d'activité lysozyme. Une solution-mère de 4-méthylumbelliféryl-N,N',N"-triacétyl- β -chitotrioside, ou 4-MUTC (Boehringer Mannheim, Laval, PQ, Canada) à 0,01 mg/mL était d'abord préparée et utilisée tel que décrit à la section 6.2 pour mesurer l'activité N-acétyl-glucosaminidase. Deux tests de contrôle ont été faits: un contrôle négatif avec le tampon approprié et un contrôle positif avec du lysozyme commercial (SIGMA, St-Louis, MO, É.-U.) à 0,1% (p/v) dans du tampon phosphate de sodium (66 mM), pH 6,24.

6.4. Activité estérase

Les estérases, telles les phospholipases, pourraient aussi être impliquées dans la lyse bactérienne. De plus, de telles enzymes pourraient dégrader une partie du PHB (un polyester) si les granules de PHB devenaient accessibles à ces estérases durant l'extraction du matériel cellulaire. Il était donc intéressant d'examiner la présence possible de ce type d'enzyme dans le système lytique brut de *S. exfoliatus*. Le p-nitrophénylacétate (SIGMA), ou PNPA, est un substrat chromophore pour les estérases en général. En présence d'activité estérase, il y a libération de p-nitrophénol, lequel donne une couleur jaune au mélange.

La procédure utilisée est la suivante: 40 μ L d'une solution de PNPA à 0,15 M dans de l'acétonitrile étaient ajoutés à 16 μ L de tampon Tris-HCl 1,25 M, pH 7,5, et à 1640 μ L d'eau bidistillée. Ensuite, 5 μ L du système lytique brut de *S. exfoliatus* étaient ajoutés au mélange et le tout était laissé à la température de la pièce pour 20 minutes. La formation d'une coloration jaune indiquait la présence d'activité estérase. Comme contrôle, le surnageant était remplacé par le tampon Tris-HCl.

7. Identification de la souche lytique retenue

7.1. Coloration de Gram

Celle-ci a été effectuée tel que décrit par la compagnie E. Merck (Darmstadt, Allemagne), fabricant de l'ensemble de coloration. Le contrôle positif était *B. thuringiensis* et le contrôle négatif était *E. coli* DL 39.

7.2. Identification de l'isomère d'acide diaminopimélique (DAP)

Afin de déterminer le genre auquel appartient la souche d'actinomycète sélectionnée, le type d'acide diaminopimélique présent dans la paroi a été identifié par chromatographie en couche mince selon la technique décrite par Schaal (1985). Ce texte décrit les divers tests à effectuer pour déterminer le genre des actinomycètes.

On a d'abord produit de la biomasse (cellules) de l'actinomycète en le cultivant en fioles dans du milieu CASO pendant 2 jours à 30°C avec une agitation de 300 rpm. La biomasse était récoltée par filtration sur des

membranes Millipore HA (0,45 μm) et lavée deux fois avec de l'eau bidistillée. La pâte obtenue était séchée sous vide à 70°C pendant 3 jours puis le solide obtenu broyé en poudre. Cinq milligrammes de cette poudre étaient ensuite hydrolysés dans 1 mL de HCl 6 N à 105°C pendant 18 heures dans un tube Kimax à bouchon vissable (16 X 100 mm). L'hydrolysate était passé sur un filtre en fibre de verre et le filtrat était évaporé à 40°C dans un évaporateur à pression réduite (Büchi, Flawil/Schweiz, Suisse). Le résidu était alors resuspendu dans 0,3 mL d'eau bidistillée. Des volumes de 5 μL de ce mélange étaient ensuite appliqués sur une couche mince de cellulose (E. Merck 5574-7) à support en aluminium. Les échantillons appliqués étaient séchés avec un séchoir à air tempéré (température de la pièce). Comme contrôle, on a utilisé de l'acide méso-diaminopimélique (SIGMA) contenant les isomères *meso*-DAP et des traces de LL-DAP. Le développement de la plaque se faisait avec la phase mobile suivante: méthanol/ pyridine/ HCl 10 N/ eau dans le rapport 80:10:2,5:17,5. Une fois séchée, la plaque était soumise à un deuxième développement. Comme méthode de révélation, une solution de ninhydrine (SIGMA, 0,1% (p/v) dans de l'acétone) était vaporisée directement sur la plaque qui était ensuite chauffée à 105°C pendant 2 minutes. Les isomères de DAP apparaissent comme des taches vert-olives dans l'ordre suivant, de bas en haut: hydroxy-DAP, méso-DAP et LL-DAP.

7.3. Identification de l'espèce: études morphologiques et physiologiques

L'identification de la souche d'actinomycète retenue a été effectuée grâce à des études morphologiques et physiologiques selon les techniques

recommandées dans le manuel de bactériologie Bergey's (Locci, 1989). La morphologie des colonies (couleur du mycélium aérien et végétatif) de la souche retenue a été étudiée en utilisant les milieux suivants: milieu amidon/sels inorganiques (Shirling et Gottlieb, 1966), milieu gruau (Shirling et Gottlieb, 1966) et milieu de Bennett modifié (Tremblay, 1991). La morphologie microscopique de la souche (chaîne de spores et forme) a été déterminée par l'utilisation d'un microscope à contraste de phase Bausch & Lomb (Rochester, N.Y., É.-U.) aux grossissements 400X et 1000X.

Certaines études physiologiques ont été faites tel que suggéré aux Tableaux 29.4 et 29.9 du manuel Bergey's (Locci, 1989). La production de mélanine a été observée après repiquage de la souche isolée sur des géloses peptone/ fer/ extrait de levure (Shirling et Gottlieb, 1966) et sur milieu tyrosine (Shirling et Gottlieb, 1966), après une incubation de 4 jours à 30°C. La détermination des activités lécithinase et lipolyse a été effectuée en repiquant la souche isolée sur des géloses jaune d'oeuf (Quélab, Laval, PQ, Canada); les activités lécithinase et lipolytique étaient notées après 2, 4 et 6 jours. La production de H₂S a été étudiée en insérant stérilement des bandes imbibées d'acétate de plomb ("H₂S test strip" de DIFCO) dans des tubes vissables contenant une culture de la souche isolée dans du bouillon nutritif, sans que cette bande touche le milieu (celle-ci devrait être à 1 cm de la surface liquide); après une et deux semaines, le noircissement de ces bandes était noté indiquant la production de H₂S.

La dégradation de l'élastine, de la xanthine et de l'arbutine (SIGMA) a été examinée de la manière suivante: on ensemait avec la souche isolée des géloses Bennett (Jones, 1949) dans lesquelles le glucose avait été

remplacé par du glycérol, et auquel on ajoutait l'un ou l'autre de ces 3 produits. La digestion de ces substrats insolubles (donnant ainsi des zones d'éclaircissement) était notée après 1, 2 et 3 semaines à 30°C.

La résistance à l'antibiotique oléandomycine (SIGMA) était étudiée de la façon suivante: on trempait des petites pastilles stériles de papier filtre dans une solution de cet antibiotique (100µg/mL) qui étaient alors séchées; par après, ces pastilles étaient déposées sur des géloses nutritives ensemencées préalablement avec une suspension pure de la souche isolée. L'inhibition de la croissance autour des pastilles était notée après une semaine à 30°C.

La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques de la croissance a été étudiée en faisant croître la souche isolée sur des géloses nutritives (DIFCO) contenant l'un ou l'autre des produits suivants: NaCl (7 %, p/v), azoture de sodium (0,01 %, p/v), phénol (0,1 %, p/v), "tellurite" de potassium (0,001 %, p/v) et acétate de thallium (0,001 %, p/v). La croissance sur ces milieux était notée après 1 et 2 semaines à 30°C.

Finalement, l'utilisation de diverses sources d'azote et de carbone a été étudiée comme suit. Pour les sources de carbone, le milieu sans carbone décrit par Sherling et Gottlieb (1966) a été utilisé; on y ajoutait l'une ou l'autre des sources carbonées suivantes, à une concentration finale de 1 % (p/v): sucrose, *méso*-inositol, mannitol, L-rhamnose, raffinose, D-mélèzitose, adonitol, D-mélibiose, dextrane et xylitol. Un contrôle positif avec glucose et négatif (sans source de carbone) était aussi effectué. Pour ce qui est des sources d'azote, on ajoutait, au milieu "sans azote" décrit par

Locci (1989), l'une ou l'autre des sources d'azote suivantes: acide DL- α -amino-n-butyrique, L-cystéine, L-valine, L-phénylalanine, L-histidine et L-hydroxyproline. Un contrôle positif avec la L-proline et un contrôle négatif "sans azote" furent aussi faits. Dans tous les cas, la croissance sur ces milieux était notée après 1, 2 et 3 semaines à 30°C.

Des tests autres que ceux décrits par Locci (1989) ont été effectués pour certains paramètres métaboliques. Par exemple, la réduction du nitrate a été réalisée selon la technique décrite par Harrigan et McCance (1976). De l'eau peptonée (DIFCO) contenant 0,2% (p/v) de nitrate de potassium fut distribuée dans des tubes de culture à bouchon vissable (environ 7 mL par tube). Des tubes de Durham inversés ont aussi été insérés dans les tubes de culture. Ceux-ci furent stérilisés (121°C, 15 minutes) puis, après refroidissement, inoculés avec la souche isolée. Après une incubation de 1 semaine à 30°C, la réduction des nitrates fut évaluée comme suit: on ajoutait 1 mL de chacun des 2 réactifs Griess-Ilosvay¹; la présence de nitrite dans le bouillon était alors visualisée par l'apparition d'une coloration rouge après quelques minutes. Aucune coloration ne devrait apparaître dans les contrôles négatifs (non-inoculés). Du même coup, la production de d'azote gazeux (N₂) pouvait être observée par l'apparition de bulles de gaz dans les tubes de Durham.

L'hydrolyse de l'hippurate a été étudiée en utilisant des disques d'hippurate (Bactodisques, DIFCO). Ces disques ont été ajoutés stérilement à une suspension de la souche à identifier resuspendue dans du tampon PBS

¹Le réactif 1 est une solution 1 % (p/v) d'acide sulfanilique dans de l'acide acétique 5 N; le réactif 2 est une solution 1 % (p/v) de α -naphtol dans de l'éthanol à 95 %.

(10 mM, pH 7,6). Après une incubation de 2 heures à 30°C, 0,2 mL d'une solution de ninhydrine (3,5 % dans un mélange acétone/méthanol (1:1), p/v) était ajouté et le tout incubé pendant 15 minutes. L'apparition d'une couleur mauve-foncée était notée indiquant une dégradation de l'hippurate.

La résistance à certains antibiotiques mentionnés au Tableau 29.9 du manuel Bergey's (Locci, 1989) a été déterminée comme suit: une suspension de la souche inconnue était appliquée sur une gélose CASO puis les disques antibiotiques suivants (BBL, Mississauga, Ont., Canada) ont été déposés stérilement sur la gélose: néomycine (30 µg), rifampicine (15 µg) et péniciline G (10 unités). La résistance ou la sensibilité à ces antibiotiques a été observée pendant une semaine.

8. Observations au microscopie électronique à transmission (MET)

Des cellules de *M. extorquens* avec PHB, ayant été préalablement traitées avec le système d'enzymes lytiques, ont été examinées par microscopie électronique à transmission (appareil Hitachi 7100, Japon) afin d'évaluer le degré de solubilisation du matériel cellulaire non-PHB. Les cellules étaient examinées suite à un traitement aux enzymes lytiques de durée 0, 5 et 24 heures. Des contrôles ont été réalisés avec le tampon approprié.

Au temps d'échantillonnage désiré, la réaction enzymatique de lyse était arrêtée comme suit: un volume du mélange réactionnel était ajouté à

un volume de tampon cacodylate-HCl (SIGMA) à 67 mM, pH 6,4, contenant 5 % (v/v) de glutaraldéhyde (Fluka, Buchs, Suisse). Après deux heures d'incubation à 23°C, ce mélange était centrifugé (centrifugeuse Beckmann J2-21M (É.-U.), 19 500 rpm (soit 46 000 X g) avec un rotor JA-20, 15 minutes, 4°C) et les cellules ensuite lavées 3 fois avec ce même tampon ne contenant pas de glutaraldéhyde. Par après, les cellules étaient resuspendues dans le même tampon contenant cette fois 1,33 % (p/v) de tétroxyde d'osmium (OsO₄) (SIGMA). La suspension était laissée à la température de la pièce pendant 3 heures puis centrifugée (centrifugeuse Beckmann J2-21M (É.-U.), 19 500 rpm (soit 46 000 X g) avec un rotor JA-20, 15 minutes, 4°C) et les cellules lavées 3 fois avec le tampon cacodylate-HCl à 67 mM, pH 6,4. Les cellules étaient ensuite déshydratées par passage successif dans des bains d'éthanol à 25, 50, 75, 95 et 100% (v/v) à température de la pièce; chaque bain durait 15 minutes. Les cellules suspendues dans l'alcool absolu (100 %) ont ensuite été amenées à l'Institut Armand-Frappier (M. Robert Alain) pour l'encapsulation des échantillons et des contrôles dans de la résine de type Spurr, la préparation des coupes à l'ultramicrotome et la coloration de ces coupes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les coupes ont alors été examinées au microscope électronique à transmission.

9. Ajout d'agents chimiques pour l'amélioration de la lyse de cellules de *M. extorquens* avec PHB.

Divers détergents ainsi que l'EDTA ont été évalués dans le but d'améliorer la digestion du matériel non-PHB. Ces produits étaient ajoutés

à une concentration de 1 % aux suspensions de cellules de *M. extorquens* contenant des quantités appréciables de PHB et le tout était incubé à 50°C pour 15 minutes. Le surnageant contenant le système lytique était alors ajouté et la méthode décrite à la section 5.2 fut utilisée, comme pour la détermination de l'activité lytique. La concentration finale de ces produits était donc de 0,5 %. L'un ou l'autre des produits suivants a été utilisé: parmi les détergents, le Triton X-100 (SIGMA), le Brij 35 et le Brij 78 (SIGMA), le Tween 40, le Tween 80 et le Tween 85 (SIGMA) ainsi que le Hamposyl L-95 (GRACE, Nashua, NH, É.-U.) ont été étudiés. On a aussi examiné l'effet de l'EDTA (SIGMA). Des contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant le système lytique par le tampon approprié. Un suivi microscopique (contraste de phase) était aussi effectué.

10. Détermination de la quantité de protéines dans les surnageants de culture

La mesure de la concentration en protéines des surnageants de culture a été faite en utilisant la technique de microtitrage de la firme Bio-Rad (Mississauga, Ont., Canada). Celle-ci est basée sur la méthode de Bradford (Bradford, 1976). La procédure de microtitrage était la suivante: à 40 μ L de réactif concentré, on ajoutait 160 μ L du surnageant de culture (dilué ou non) dans des cupules de plaques à 96 puits. Un même volume d'une série de solutions d'albumine de sérum bovin (Bio-Rad) allant de 0 à 100 μ g/mL (dans du tampon phosphate de sodium, 50 mM) était aussi ajouté à d'autres cupules pour établir une courbe standard. Une série de cupules avec le tampon et le réactif seulement servait de blanc. Après une incubation de 2 minutes à 25°C, la densité optique à 595 nm des mélanges

contenus dans les cupules était lue à l'aide d'un appareil Titertek Multiskan MCC/340 (ICN-Flow, Mississauga, Ont., Canada) permettant ainsi d'évaluer la quantité de protéines dans les surnageants.

RÉSULTATS

1. Isolement d'une souche lytique contre *Methylobacterium extorquens*

L'utilisation du milieu Mex, un milieu à base de sels et de cellules de *M. extorquens*, a permis d'obtenir plusieurs souches microbiennes capables d'utiliser les cellules traitées à la chaleur de *M. extorquens* comme seule source de nutriments, tout en causant des zones d'éclaircissement autour des colonies isolées. La Figure 13 montre la procédure pour obtenir de telles souches. Ces souches ont toutes été obtenues de divers échantillons de sol décrits au Tableau 5, après enrichissement avec des cellules tuées de *M. extorquens*.

1.1. Premier essai d'isolement d'une souche lytique contre *M. extorquens*

Après une incubation de 6 jours à 30°C, les milieux d'enrichissement contenant le sol décrit à l'essai 1 du Tableau 5 montraient déjà la présence de divers microorganismes autres que *M. extorquens*. En effet, des observations au microscope en contraste de phase indiquaient la présence de coques, de bacilles et même de protozoaires. Après 2 semaines d'enrichissement, les cultures étaient assez avancées pour passer à l'étape d'isolement de souches.

Une observation à 9 jours des géloses Mex indiquait la présence de zones d'éclaircissement autour de certaines colonies (Figure 14). Ces cultures étaient ensuite repiquées sur des géloses nutritives afin d'accélérer la purification. Les souches ainsi purifiées ont ensuite été

Figure 14: Zones d'éclaircissement sur gélose Mex, indiquant la digestion au moins partielle de cellules chauffées de *M. extorquens* causées par divers microorganismes provenant d'un échantillon de sol de Ville Lasalle.

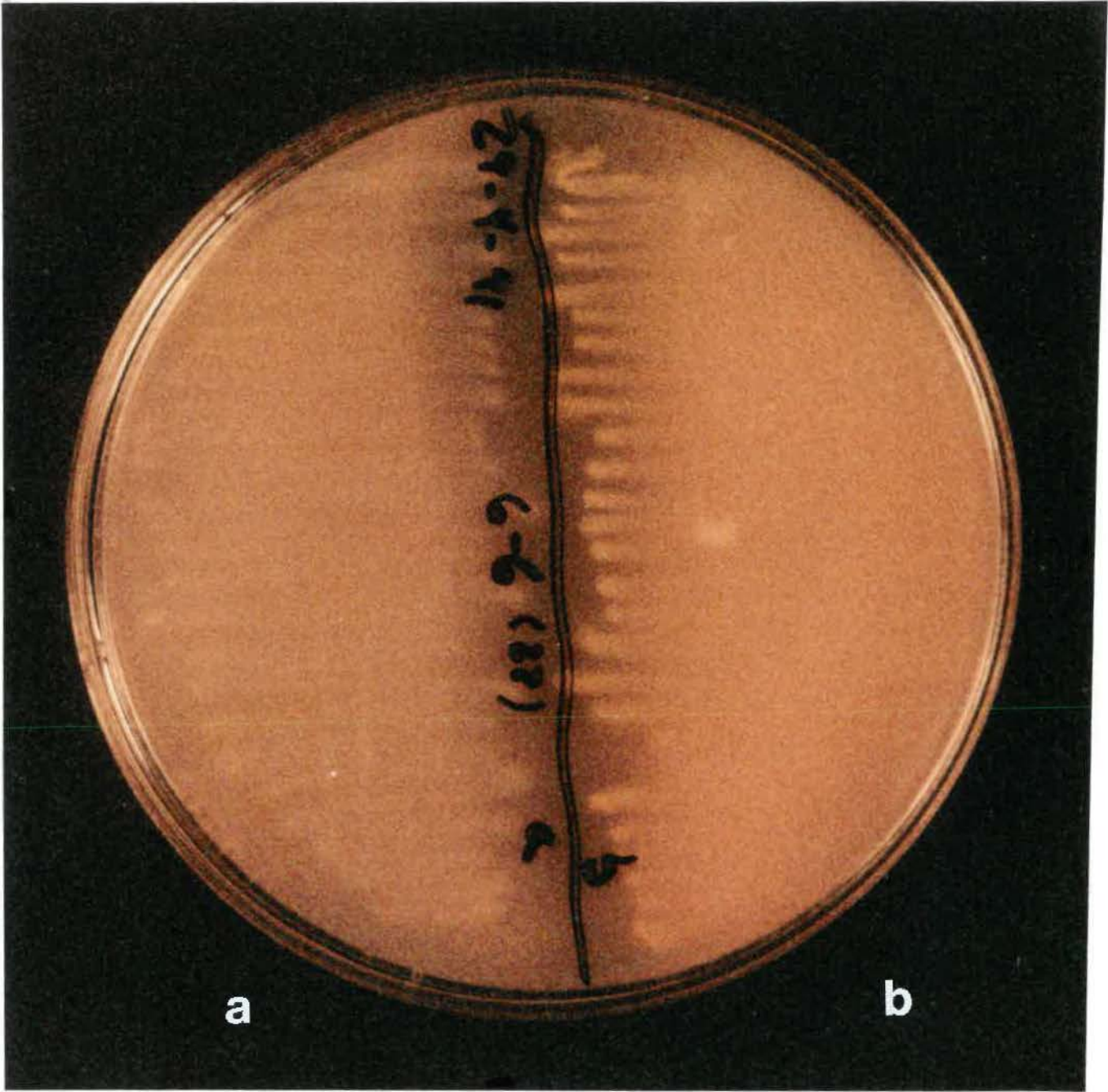


repiquées sur des géloses Mex afin de sélectionner les souches les plus actives, selon le diamètre des zones de lyse (à l'oeil). Malheureusement cette fois-ci, après 8 jours d'incubation, aucune des souches purifiées n'a donné de zones de lyse sur le milieu Mex. Les cultures initialement positives avaient donc perdu, selon toute probabilité, leur capacité de provoquer des zones de lyse lors de leur transfert sur des géloses nutritives. Nous sommes donc revenus à l'utilisation de géloses Mex pour la purification des souches.

Plus tard, une fois la pureté des cultures atteinte, on observa que les souches pures obtenues ne produisaient plus de zones de lyse. Une observation des plus intéressantes fut faite par la suite. Lors d'une expérience, la moitié d'une gélose Mex a étéensemencée avec une souche purifiée qu'on croyait lytique (mais ne donnant pas de zone de lyse à elle seule) pendant que l'autre moitié étaitensemencée avec une culture "contaminée" obtenue à l'étape précédente de la purification. On observa alors une zone de lyse entre les 2 cultures microbiennes (Figure 15) suggérant que dans ce cas précis, des enzymes provenant de 2 cultures différentes étaient nécessaires pour obtenir une lyse efficace des cellules de *M. extorquens*.

Dans ce premier essai, seules les cultures mixtes nous permettaient d'obtenir des zones de lyse. Pour obtenir des souches pures capable à elles seules de provoquer la lyse de cellules de *M. extorquens*, on a donc décidé de procéder à un deuxième essai d'isolement.

Figure 15: Zones d'éclaircissement entre une souche isolée supposément "lytique" (a) et une culture contaminée (b) sur gélose Mex.



a

b

1.2. Deuxième essai d'isolement d'une souche lytique contre *M. extorquens*

Pour ce deuxième essai d'isolement, la provenance des échantillons de sols était plus variée, comme on peut le voir au Tableau 5. Pour l'isolement des souches, on a procédé tel que décrit à la Figure 13. Suite à ces travaux, 10 souches ont été retenues pour l'étape suivante de détermination de leur capacité de production d'enzymes lytiques en milieu liquide. Ces souches sont décrites au Tableau 6. La souche No. 2 produisait les plus grandes zones de lyse sur le milieu Mex, décolorant ainsi la quasi totalité de la gélose. Cette souche était donc une bonne candidate pour la production d'enzymes lytiques. La souche No. 10, quant à elle, ne produisait qu'une faible décoloration de la gélose bien qu'une incubation prolongée (un mois) causait une digestion quasi-totale de la biomasse du milieu Mex (Figure 16a et 16c), à comparer au contrôle (Figure 16b). La souche No. 10 a aussi été sélectionnée pour les travaux ultérieurs car celle-ci nous faisait grandement penser à un actinomycète, appartenant ainsi à une classe de bactéries reconnue pour sa grande capacité à produire diverses enzymes hydrolytiques.

1.3. Criblage des souches pour la production d'enzymes lytiques en milieu liquide

La croissance des 10 souches obtenues précédemment a d'abord été étudiée en bouillon Mex. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la plupart des souches avaient altéré le milieu initial qui était rose pâle au début. La plupart des milieux avaient en effet pris une teinte brun-foncée.

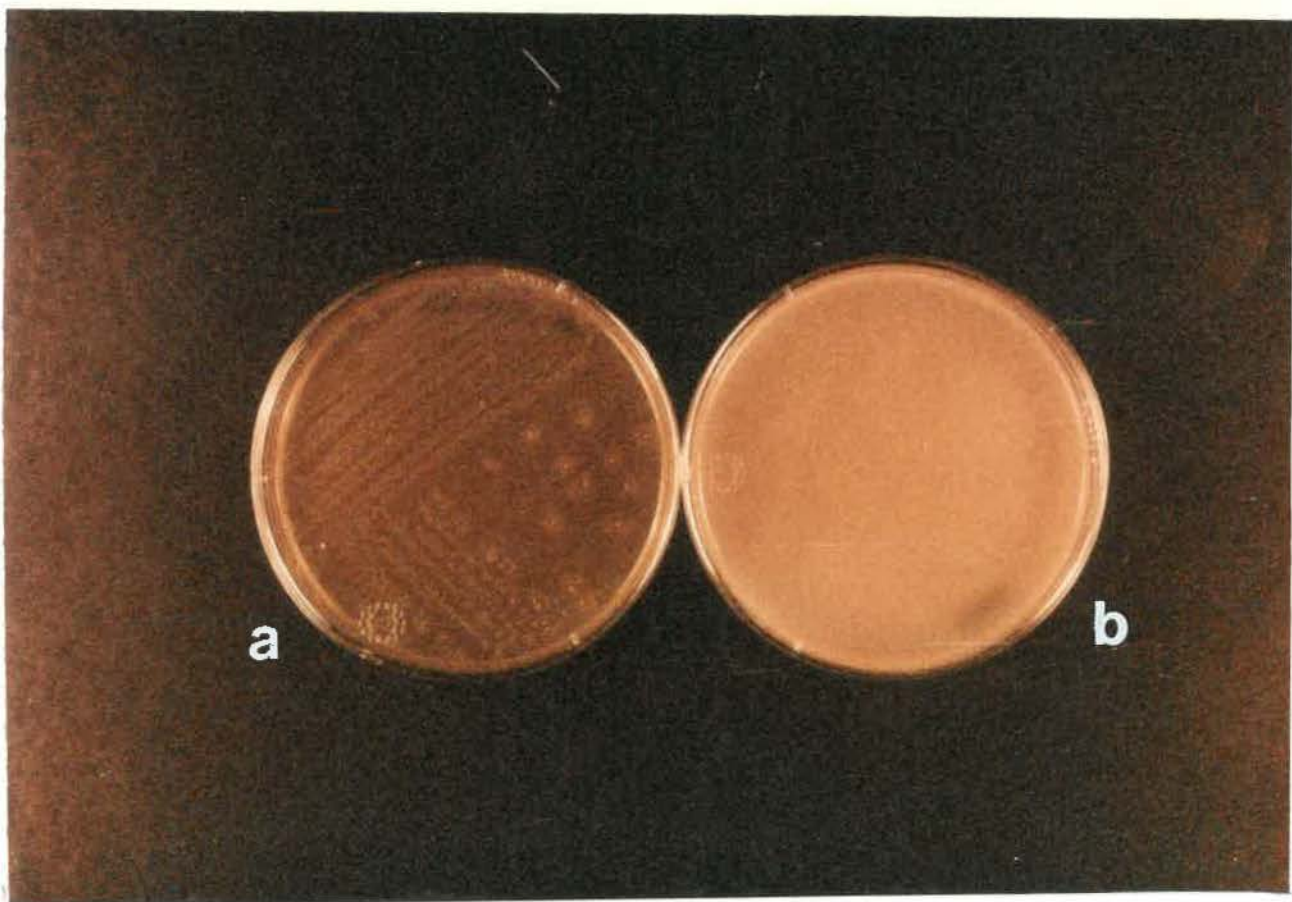
Tableau 6 : Description des souches retenues lors du deuxième isolement

Souche	Description des colonies ⁽¹⁾	Morphologie (au microscope) ⁽²⁾
1	colonies beiges, rondes, dentelées, convexes	bacilles incurvés
2	colonies blanchâtres, très étendues, translucides, irrégulières	bacilles à extrémités arrondies
3	colonies beiges, rondes, régulières, convexes	bacilles flagellés et mobiles
4	colonies jaunes, dentelées, convexes, ramifiées	semblables à la souche 3
5	colonies jaunes, concaves, irrégulières, translucides, dépression au centre	semblables à la souche 3
6	colonies jaunes, dentelées, plates	semblables à la souche 3 mais bacilles plus longs
7	colonies jaunes, dentelées, dépression au centre	semblables à la souche 6
8	colonies jaunes, rondes, dépression au centre	bacilles courts, mobiles
9	petites colonies jaunes, rondes, convexes	semblables à la souche 8
10	colonies brunes, mycélium aérien blanc-gris (ressemble à un actinomycète)	bactéries filamenteuses, formant un pigment noir dans le bouillon nutritif

(1) Milieu Mex utilisé

(2) Microscopie optique en contraste de phase (X1000)

Figure 16: Souche No. 10 sur gélose Mex. (a) gélose inoculée; (b) gélose non-inoculée (contrôle); (c) gélose inoculée en (a) à plus fort grossissement montrant les petits mycéliums aériens.



La souche No. 2 amenait une flocculation importante des cellules de *M. extorquens* servant de substrat. La souche No. 10, quant à elle, provoquait un brunissement important du milieu. L'observation microscopique de cette culture montrait des "filaments" biologiques étroitement liés à la biomasse de *M. extorquens*.

L'activité lytique des diverses souches obtenues fut évaluée après croissance pendant sept jours à 30°C et 250 rpm. Les surnageants ainsi obtenus furent testés pour leur activité lytique en ajoutant des volumes égaux de surnageant et de suspension cellulaire de *M. extorquens* (cellules tuées sans PHB), puis en notant la baisse de densité optique résultante. Sur les 10 souches testées, seule la souche No. 10 provoquait une baisse significative de densité optique de la suspension bactérienne (Figure 17). Comme on peut le voir, la densité optique à 600 nm de la suspension cellulaire de *M. extorquens* baissait d'environ 30 % lorsque les cellules étaient incubées à 37°C en présence du surnageant de la souche No. 10 pendant 2 heures. La densité optique de la suspension contrôle restait stable durant l'incubation. La baisse de densité optique obtenue avec le surnageant testé pouvait être due soit à la présence d'enzymes "lytiques" dans le surnageant de la souche No. 10, soit à la présence de facteurs "lytiques" non-protéiques dans ce même surnageant; comme on travaillait avec des cellules mortes, il y avait peu de chance qu'un autre type de molécule aurait pu causer la lyse de ces cellules (ex.: pour que la pénicilline soit efficace, elle doit utiliser le métabolisme de la cellule). Afin de différencier entre ces deux possibilités, le surnageant de la souche No. 10 a été chauffé à 100°C pendant une période allant de 5 à 15 minutes afin de déterminer si l'activité "lytique" obtenue précédemment était d'origine

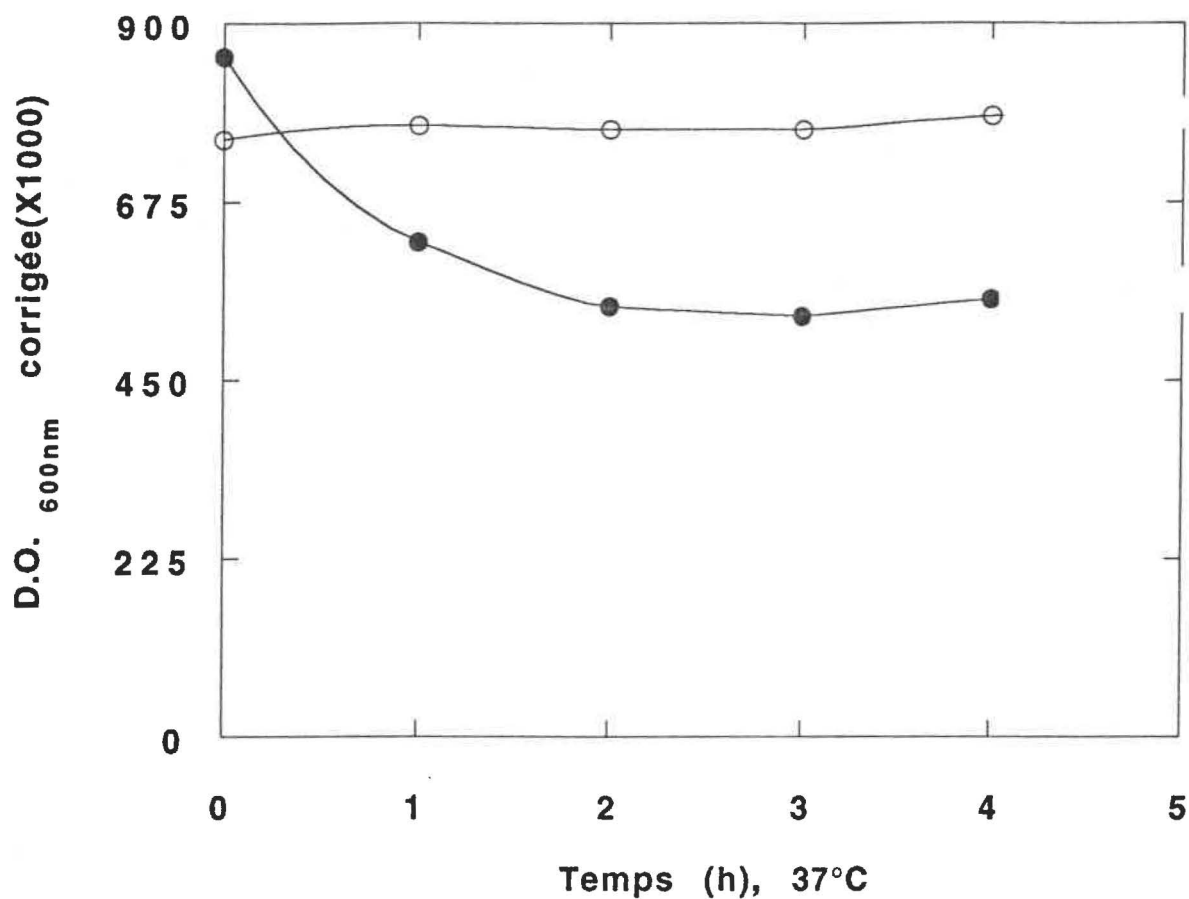


Figure 17: Diminution de la densité optique à 600 nm d'une suspension de cellules de *Methylobacterium extorquens* traitée à la chaleur (121°C, 20 minutes) et incubée avec le surnageant de la souche No. 10 (●) ou dans du tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7,0 (○). Les cellules étaient resuspendues dans le tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7,0, et la réaction avait lieu à 37°C. Le rapport suspension/surnageant était 1:1.

enzymatique (protéique), donc facilement dénaturée par la chaleur, ou si plutôt elle était associée à de petites molécules moins thermosensibles. Les résultats (Figure 18) démontraient que l'activité "lytique" du surnageant était complètement détruite par un chauffage à 100°C pendant 5 minutes, indiquant donc que des protéines, probablement des enzymes, étaient fortement impliquées dans cette activité "lytique".

2. Identification de la souche No. 10

Tel qu'indiqué plus tôt, la souche No. 10 était la seule, parmi les 10 souches examinées, à montrer un potentiel "lytique" certain vis-à-vis des cellules tuées de *M. extorquens*. Cette souche a donc été choisie pour des études additionnelles. Il était important de bien identifier d'abord cette nouvelle souche.

2.1. Observations visuelles et microscopiques de la souche No. 10

L'identification de la nouvelle souche a débuté par des examens visuels et microscopiques. Sur géloses Mex, le mycélium végétatif des colonies de la souche No. 10 avait une apparence de cuir brunâtre; on retrouvait au centre des colonies du mycélium aérien blanc. Un frottis de ces colonies montrait la présence de filaments minces, beaucoup plus petits que ceux de champignons, nous faisant penser à une culture d'actinomycètes. De plus, la nature Gram-positive de cette souche renforçait l'idée qu'il pouvait s'agir d'une culture d'actinomycètes. Ces premières observations nous ont poussé alors à déterminer le type d'acide

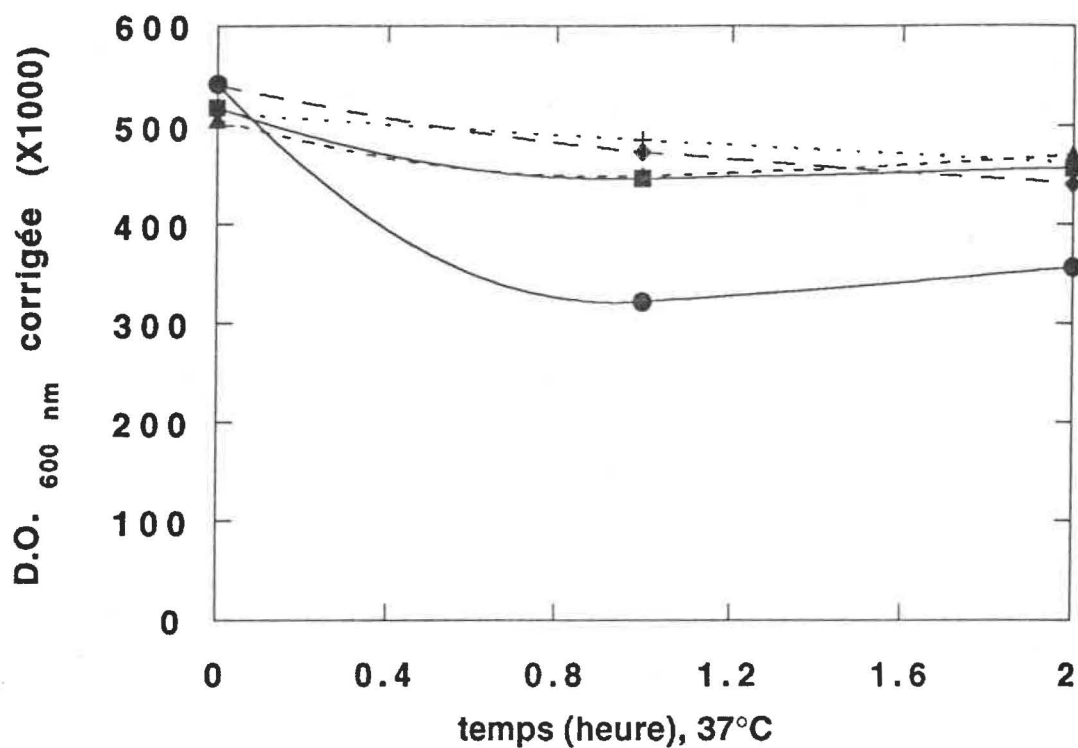


Figure 18: Inactivation thermique de l'activité "lytique" présente dans le surnageant de culture de la souche No. 10 après des traitements de 0 (●), 5 (◆), 10 (▲) et 15 minutes (+) à 100°C. Le contrôle est représenté par le symbole (■).

diaminopimélique (DAP) retrouvé dans la paroi de cette nouvelle souche bactérienne, présumément identifiée comme une souche d'actinomycète.

2.2. Détermination de l'isomère de DAP dans la paroi de la souche No. 10

La Figure 19 montre le résultat de la chromatographie en couche mince d'un hydrolysate de la souche No. 10. La bande obtenue pour l'hydrolysate de la souche No. 10 montre une tache de couleur vert-olive à la position de l'isomère LL-DAP. Suivant la clé développée par Schaal (Schaal, 1985), la souche No. 10 a facilement été assignée au genre *Streptomyces*. Le seul autre actinomycète à longue chaîne de spores à contenir du LL-DAP est *Kitosatosporia*, mais ce dernier, en culture immergée, ne contient que la forme *meso* du DAP, éliminant ce genre (Cross, 1990). Des études biochimiques et métaboliques ont ensuite été effectuées selon les techniques recommandées par le manuel Bergey's (Locci, 1989) afin de déterminer à quel espèce appartenait la souche No. 10.

2.3. Détermination de l'espèce

Une fois le genre bactérien identifié (*Streptomyces*), il restait à identifier l'espèce. Des observations visuelles et microscopiques, ainsi que des tests physiologiques ont été effectués selon les méthodes prescrites dans le manuel Bergey's pour les espèces appartenant au genre *Streptomyces*. Sur l'agar gruau, ainsi que sur le milieu Bennett, la masse de spores était abondante et grisâtre (Figure 20). De plus, un pigment brun-

Figure 19: Chromatographie en couche mince de l'hydrolysat de la souche No. 10. (1,3) = standard de DL-DAP (ou méso-DAP) contenant des traces de LL-DAP; (2,4) = hydrolysat de la souche No. 10.

LL-DAP

DL-DAP

1

2

3

4

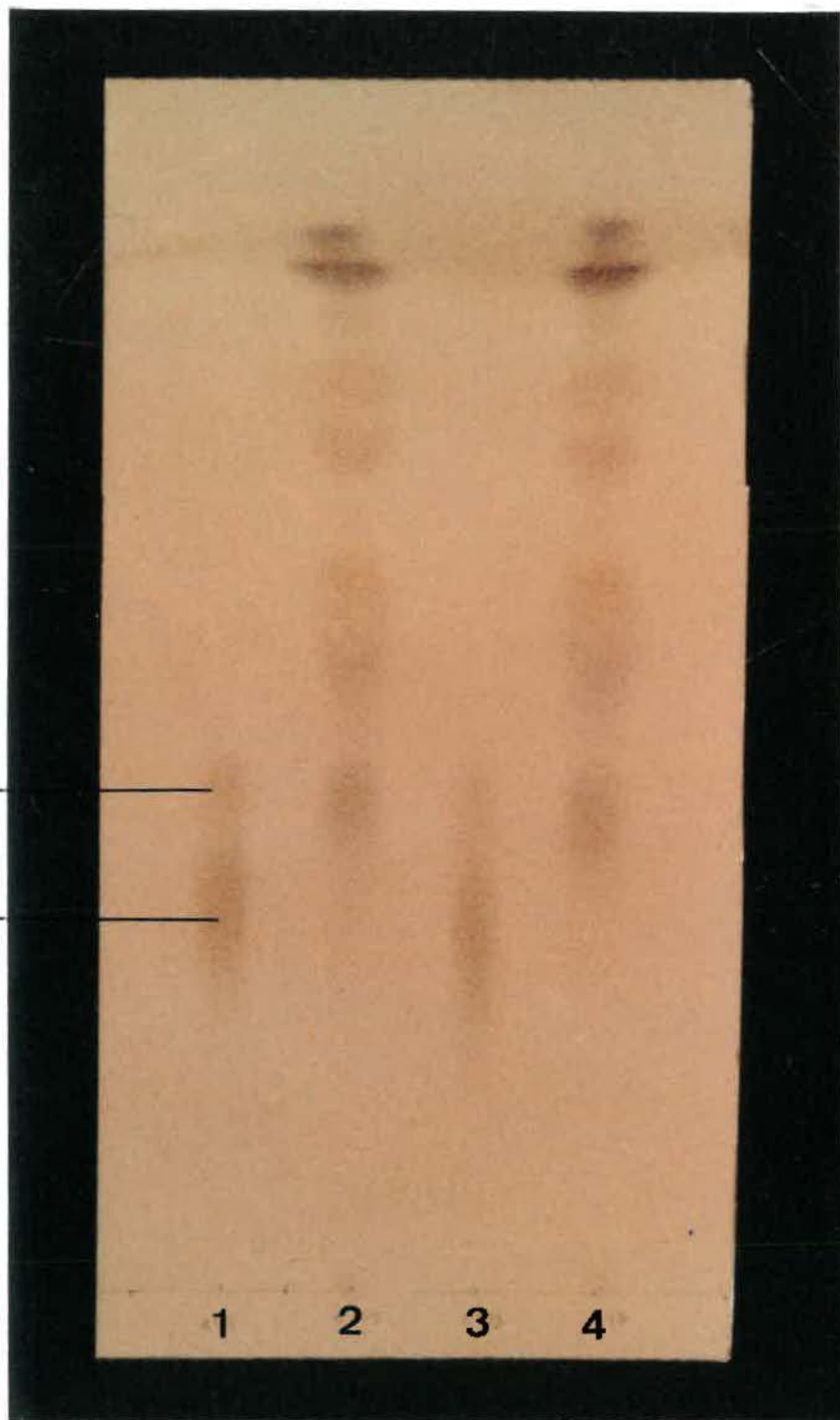
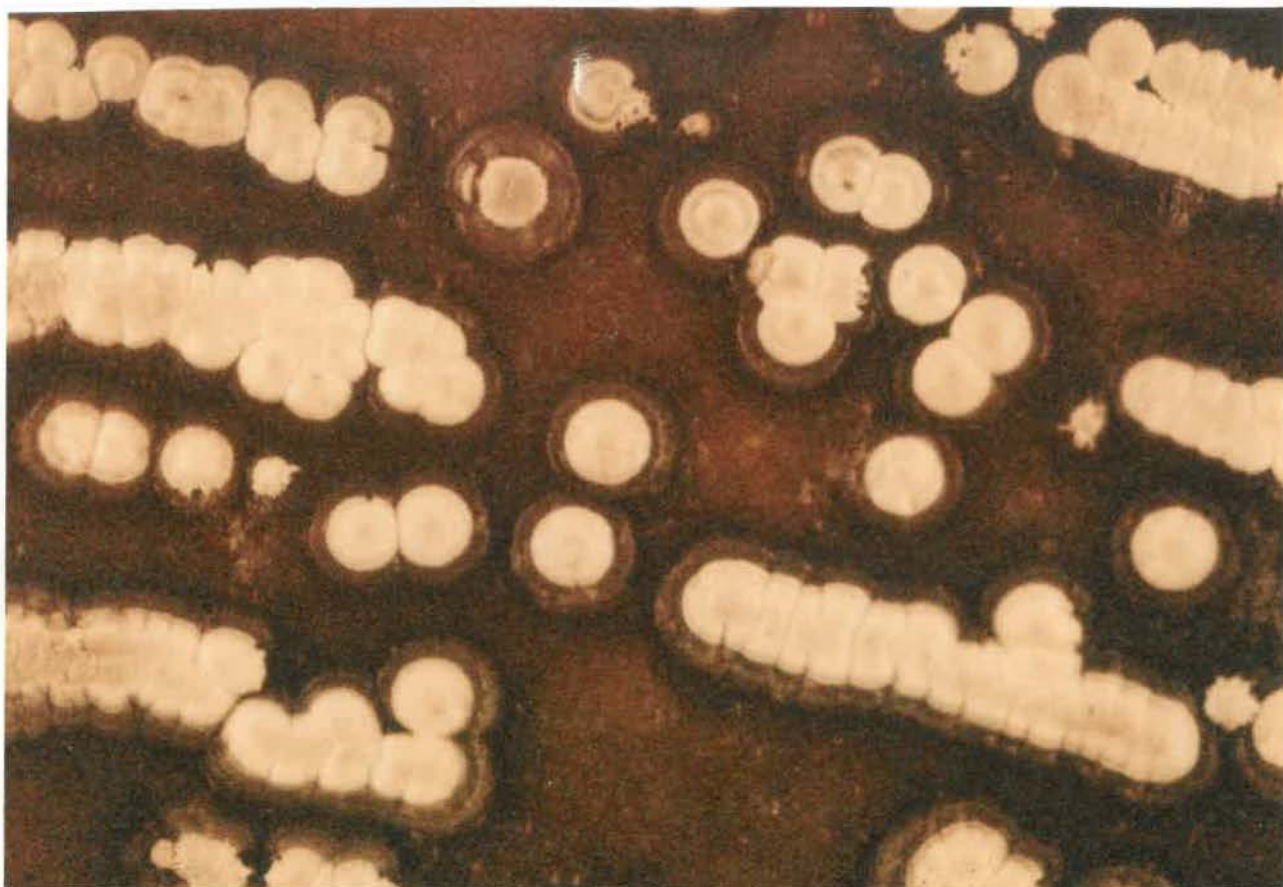


Figure 20: Souche No. 10 sur gélose gruau (a). À plus fort grossissement (b).



a ↙

↘ b



noir extracellulaire était libéré dans la gélose. Le mycélium végétatif était jaune-brun. Les chaînes de spores étaient difficiles à observer mais celles qui ont pu l'être (Figure 21) montraient une structure linéaire, sans spirale, dites *rectiflexibles*.

Des analyses physiologiques ont ensuite été effectuées. Les résultats sont résumés dans le Tableau 7. Ces résultats ont été comparés à ceux du Tableau 29.9 du manuel Bergey's. Ce dernier tableau donne le pourcentage de résultats positifs obtenus avec divers tests pour 23 groupes majeurs d'espèces du genre *Streptomyces*. On peut donc déterminer l'espèce d'une souche inconnue en comparant les résultats obtenus pour celle-ci avec les résultats de chacun des 23 groupes. Avec les 39 critères étudiés, c'est la souche *Streptomyces exfoliatus* qui arriva le plus près des résultats obtenus avec la souche No. 10, avec 31 caractères communs sur 39. Le deuxième groupe le plus proche est *Streptomyces violaceus*, avec 27 caractères communs sur 39, suivi de *Streptomyces halstedii* (26 sur 39).

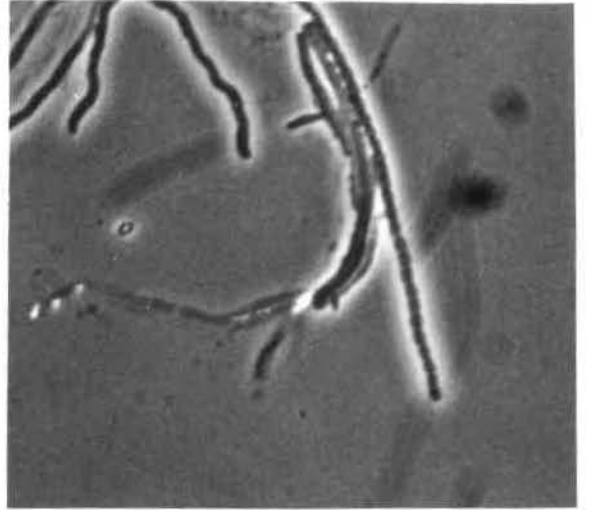
La souche No. 10 fut dès lors considérée comme étant une souche de *Streptomyces exfoliatus*.

3. Optimisation des conditions de lyse

Dans cette section, seules des cellules ne contenant pas ou peu de PHB ont été utilisées comme "substrat" dans les divers tests de lyse. En effet, on a pensé que l'utilisation de cellules contenant des granules pourrait causer une sous-estimation de la baisse de la densité optique, les granules libérés contribuant à la densité optique totale. Il était entendu

Figure 21: Chaîne de spores *rectiflexibles* de la souche No. 10 et filaments
(a). Même chaîne à plus fort grossissement (b) (Grossissement à 1000 X).

b



a

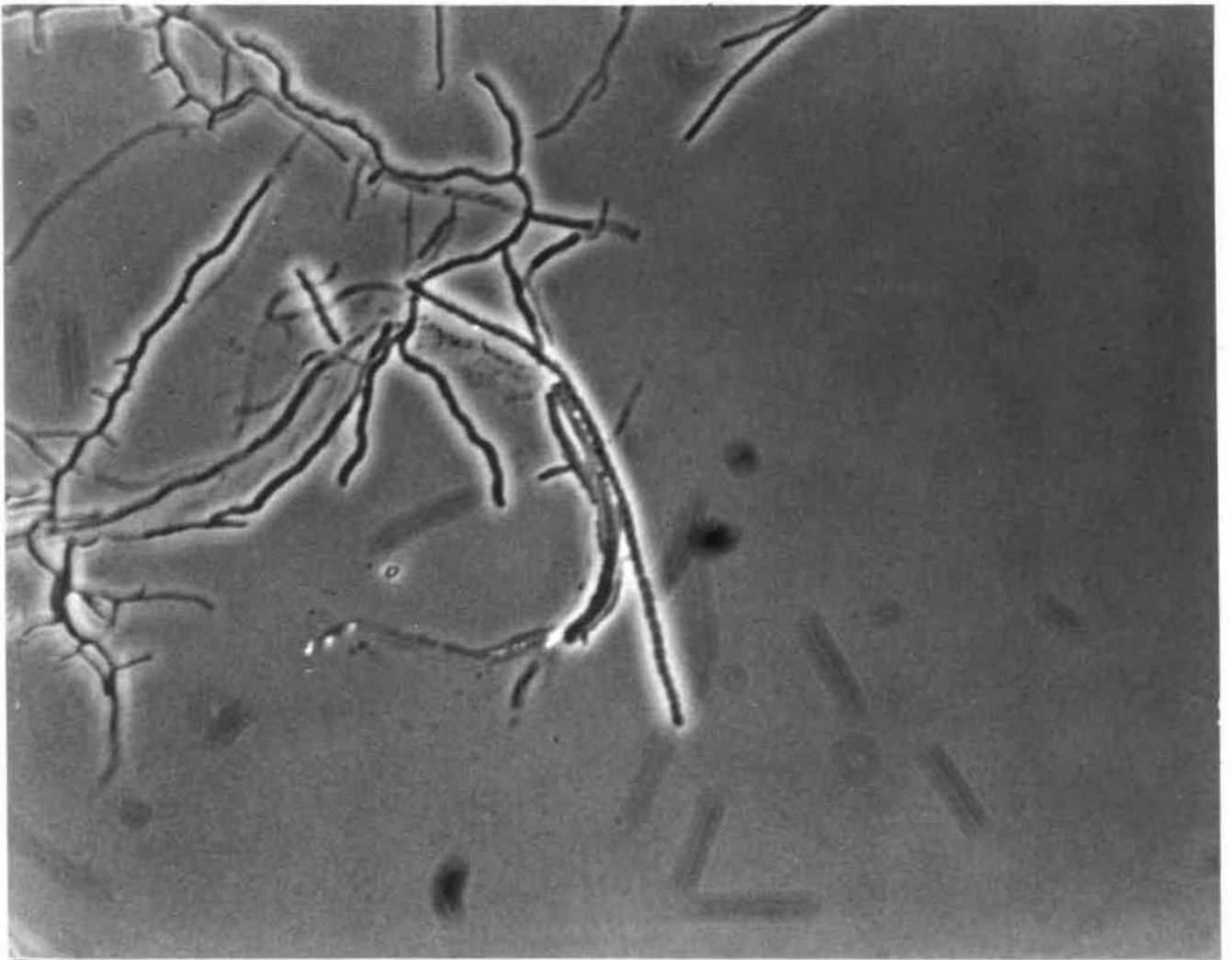


Tableau 7: Résultats d'analyses physiologiques et biochimiques faites sur la souche No. 10

Critères	Caractéristique(s)	Résultat
Milieu Bennett (1) et gruau (2)	a) chaîne de spores <i>rectiflexibles</i>	+
	b) chaîne de spores <i>spirales</i>	-
	c) masse de spores rouge	-
	d) masse de spores grise	+
	e) mycélium végétatif rouge-orange	-
Gélose PYIE (2)	Production de mélanines	+
Gélose Tyrosine	Production de mélanines	+
Activités enzymatiques (3)	lécithinase	-
	lipolyse	-
	réduction des nitrates	+
	production de H ₂ S	+
Activités de dégradation (3)	élastine	+
	xanthine	-
	arbutine	+
Résistance à certains antibiotiques (3)	néomycine	-
	rifampicine	-
	oléandomycine	+
	pénicilline G	+

suite à la page suivante

Tableau 7: Résultats d'analyses physiologiques et biochimiques faites sur la souche No. 10 (suite et fin)

Critères	Caractéristique(s)	Résultat
Croissance en présence de certains inhibiteurs (3)	NaCl (7,0 %, p/v)	-
	azoture de sodium (0,01 %, p/v)	+
	phénol (0,1 %, p/v)	-
	"tellurite" de potassium (0,001 %, p/v)	+
	acétate de thallium (0,001 %, p/v)	+
Utilisation de sources d'azote (0,1 %, p/v)(3)	acide DL- α -amino-n-butyrique	+
	L-cystéine	-
	L-valine	-
	L-phénylalanine	+
	L-histidine	-
	L-hydroxyproline	+
Utilisation de sources de carbone (1,0 %, p/v)(3)	sucrose	-
	<i>méso</i> -inositol	-
	mannitol	-
	L-rhamnose	+
	raffinose	-
	D-mélèzitose	-
	adonitol	-
	D-mélibiose	-
	dextrane	-
	xylitol	-

(1) (Tremblay, 1991)

(2) (Shirling et Gottlieb, 1966)

(3) tel que décrit dans Matériel et Méthodes.

que toute fraction "lytique" serait plus tard testée sur des cellules contenant des granules de PHB, une fois les travaux d'optimisation plus avancés.

3.1. Détermination du pH optimal

Après avoir isolé une souche capable de lyser des cellules traitées à la chaleur de *M. extorquens*, les conditions de la réaction ont partiellement été optimisées afin d'obtenir une meilleure réponse plus tard avec des cellules contenant cette fois des granules de PHB. L'influence du pH a été mesurée en effectuant des tests de lyse à des valeurs de pH variant de 2 à 12 sur des cellules ne contenant pas ou peu de PHB; les essais ont été faits à 37°C et duraient 2 heures. Les résultats de cette expérience sont présentés à la Figure 22. Aux pH acides, on voit que le pourcentage de baisse en densité optique était négatif, donc la densité optique augmentait au lieu de diminuer, ce qui pouvait avoir été dû à la cristallisation de certains éléments dans le mélange réactionnel. Le pourcentage de baisse de densité optique augmentait avec le pH pour atteindre 40 % à pH 8,0 environ pour ensuite diminuer à des valeurs de pH plus élevées. Les tampons utilisés ne semblaient pas avoir d'effets sur l'activité. Les tests ultérieurs de lyse seront donc effectués à un pH de 8,0.

3.2. Détermination de la température optimale

Après avoir déterminé le pH optimal, l'effet de la température a

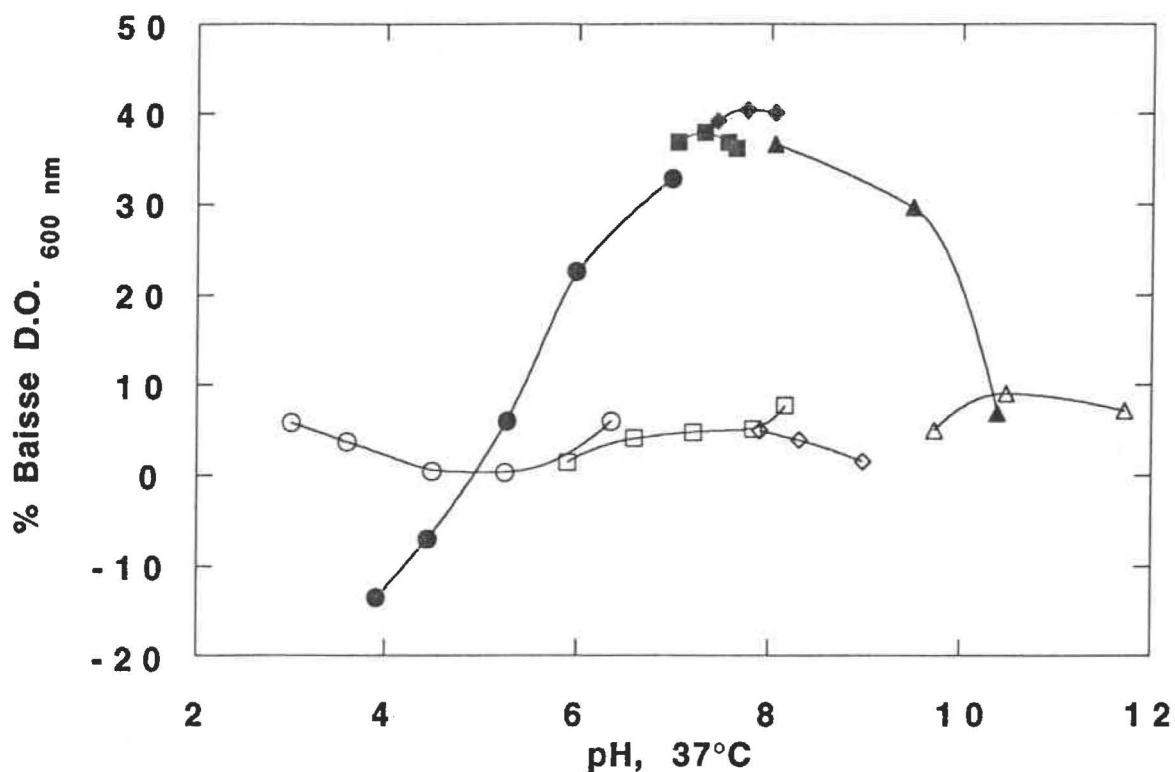


Figure 22: Détermination du pH optimal pour la lyse de cellules de *M. extorquens* par le surnageant dérivé de *S. exfoliatus* (souche No. 10). Les cellules de *M. extorquens* avec peu ou pas de PHB avaient d'abord été traitées à la chaleur (121°C, 15 min.). Le mélange était incubé pendant 2 heures. (●,○): tampon citrate de sodium; (■,□): tampon phosphate de sodium; (◆,◇): tampon Tris-HCl; (▲,△): tampon carbonate de sodium. Symboles pleins = avec surnageant; symboles vides = avec tampon (contrôle).

ensuite été étudié. Les cellules de *M. extorquens*, comme d'habitude traitées à la chaleur, étaient incubées avec le surnageant "lytique" à des températures variant de 30 à 60°C et au pH optimal de 8,0. Un effet lytique maximal (baisse de densité optique) était obtenu à 50°C (Figure 23). Il faut noter que le pH initial moyen des suspensions traitées avec le mélange enzymatique brut de *S. exfoliatus* était de 7,67, ce qui pourrait être dû au surnageant ajouté à la suspension. Cette température a donc été utilisée dans tous les tests lytiques subséquents.

3.3. Effets de divers ions sur l'efficacité de la lyse

Il est bien connu que certains ions peuvent avoir un effet positif sur une enzyme ou un groupe d'enzymes. Une série de sels a donc été testée afin de déterminer si certains ions pouvaient améliorer l'efficacité de la lyse. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 8. Chaque sel était évalué aux concentrations 1 et 10 mM. Aucun des 15 sels étudiés n'a amélioré de manière significative le pourcentage de lyse par rapport au contrôle (sans sels ajoutés). Les ions Cr^{++} et Ni^{++} causaient, à 1 mM, une diminution de 50% environ de l'activité lytique du système enzymatique. L'ion Hg^{++} inhibait complètement le système à 1 mM. Les ions Mg^{++} et Fe^{+++} , à une concentration finale de 10 mM, inhibaient complètement l'activité lytique. Plusieurs des sels n'ont pu être étudiés à la concentration 10 mM car leur ajout rendait la suspension tellement opaque qu'il était impossible de lire la densité optique. Certains autres ions tels les ions Zn^{++} , Cu^{++} , et Co^{++} ont montré un effet inhibiteur relativement faible à la concentration 1 mM tandis que les ions Ca^{++} , Mn^{++} , K^+ , Cs^+ , Na^+ et Cl^- n'ont pas montré d'effet inhibiteur aux deux concentrations testées.

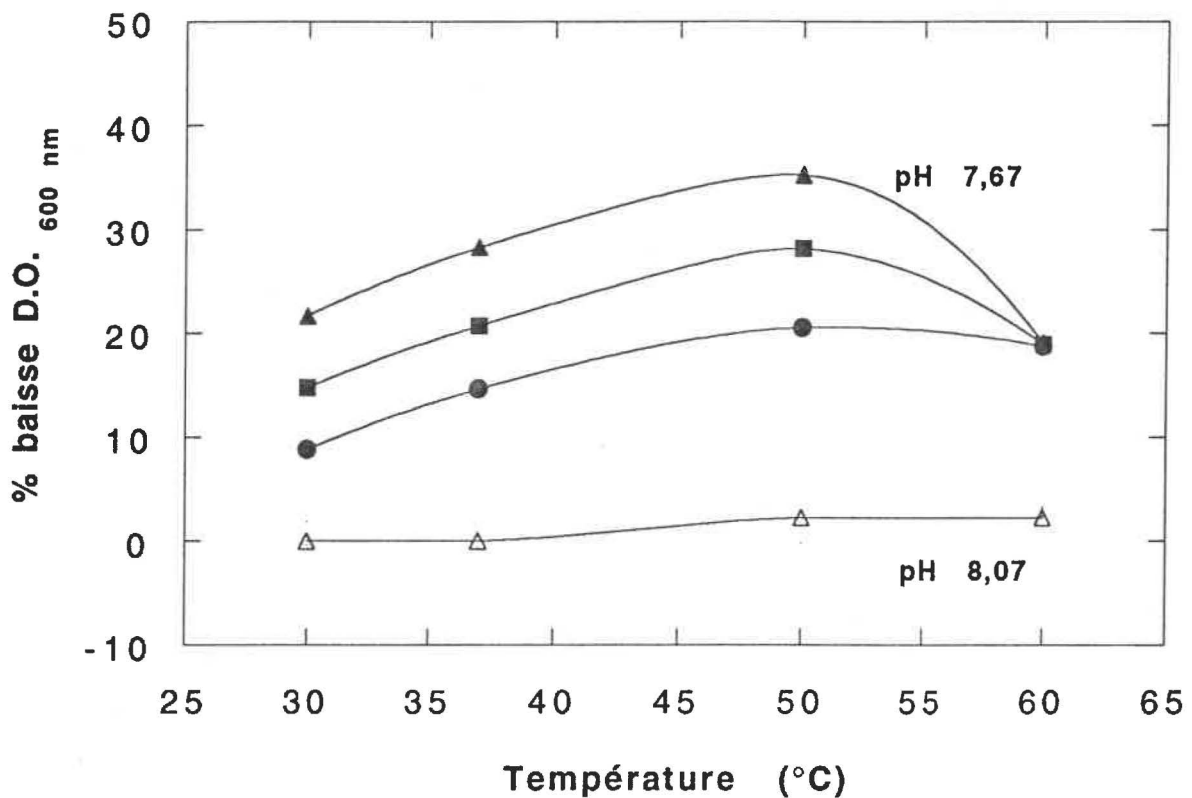


Figure 23: Détermination de la température optimale pour la lyse de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur (121°C, 15 min.) par le surnageant dérivé de *S. exfoliatus* (souche No.10). Les cellules de *M. extorquens* ne contenaient pas ou peu de PHB. Le mélange était incubé pendant 0,5 h (●), 1 h (■) et 2 h (▲) à un pH final de 7,67. Seuls les résultats à 2 h sont présentés (Δ) pour les contrôles, les résultats étant similaires pour les autres temps.

Tableau 8: Effets de divers ions (sels) sur l'activité du système enzymatique lytique présent dans le surnageant brut de *S. exfoliatus*. Les tests de lyse étaient effectués à 50°C, pH 8,0, dans du tampon phosphate de sodium à 50 mM.

Sel (ion)	% de lyse à la concentration ⁽¹⁾	
	1 mM	10 mM
Contrôle ⁽²⁾	100 ⁽³⁾	100
SnCl ₂	93	n.d. ⁽⁴⁾
CaCl ₂	109	100
MnCl ₂	110	97
MgCl ₂	98	0
CoCl ₂	74	n.d.
CuCl	83	n.d.
CrCl ₂	47	n.d.
NiCl ₂	48	n.d.
ZnCl ₂	79	n.d.
CdCl ₂	93	n.d.
KCl	108	87
NaCl	86	96
FeCl ₃	92	0
CsCl	106	87
HgCl ₂	1	n.d.

(1) Concentration finale

(2) Aucun sel ajouté au mélange réactionnel habituel

(3) Valeur relative

(4) Non-déterminé

Contrairement à nos attentes, aucun des ions étudiés n'a montré d'effet stimulateur important sur l'activité lytique.

3.4. Cinétique de la production des enzymes lytiques (système lytique)

Une cinétique de production du système lytique était requise afin de déterminer le temps optimal de récolte des enzymes lytiques. Nous avons déjà observé que le niveau de ces enzymes pouvait être faible ou nul en certaines occasions, suggérant que l'activité pourrait être variable dans le temps. Auparavant, cependant, une petite étude a été entreprise portant sur l'effet de l'extrait de levure sur la production de ces enzymes. L'extrait de levure est très riche en nutriments, surtout en azote, et son ajout pourrait être salubre pour la production du système lytique par *S. exfoliatus*. L'ajout de 1 % (p/v) d'extrait de levure a permis d'accroître d'un facteur trois la quantité d'enzymes lytiques produites (environ 1 UL vs 3 UL). Un milieu de production d'enzymes amélioré, le milieu Mex avec 1 % d'extrait de levure, a donc été employé pour déterminer la cinétique de production des enzymes lytiques chez *S. exfoliatus*.

La cinétique de production du système lytique a été déterminée sur une période de sept jours. Les paramètres suivants ont été suivis: l'activité lytique, la quantité de protéines dans le surnageant de la culture, le pH de la culture et la biomasse totale (poids sec). Les résultats sont représentés à la Figure 24. Au temps zéro, la biomasse sèche était légèrement supérieure à 2 g/L, ce qui représentait la quantité initiale désirée de cellules

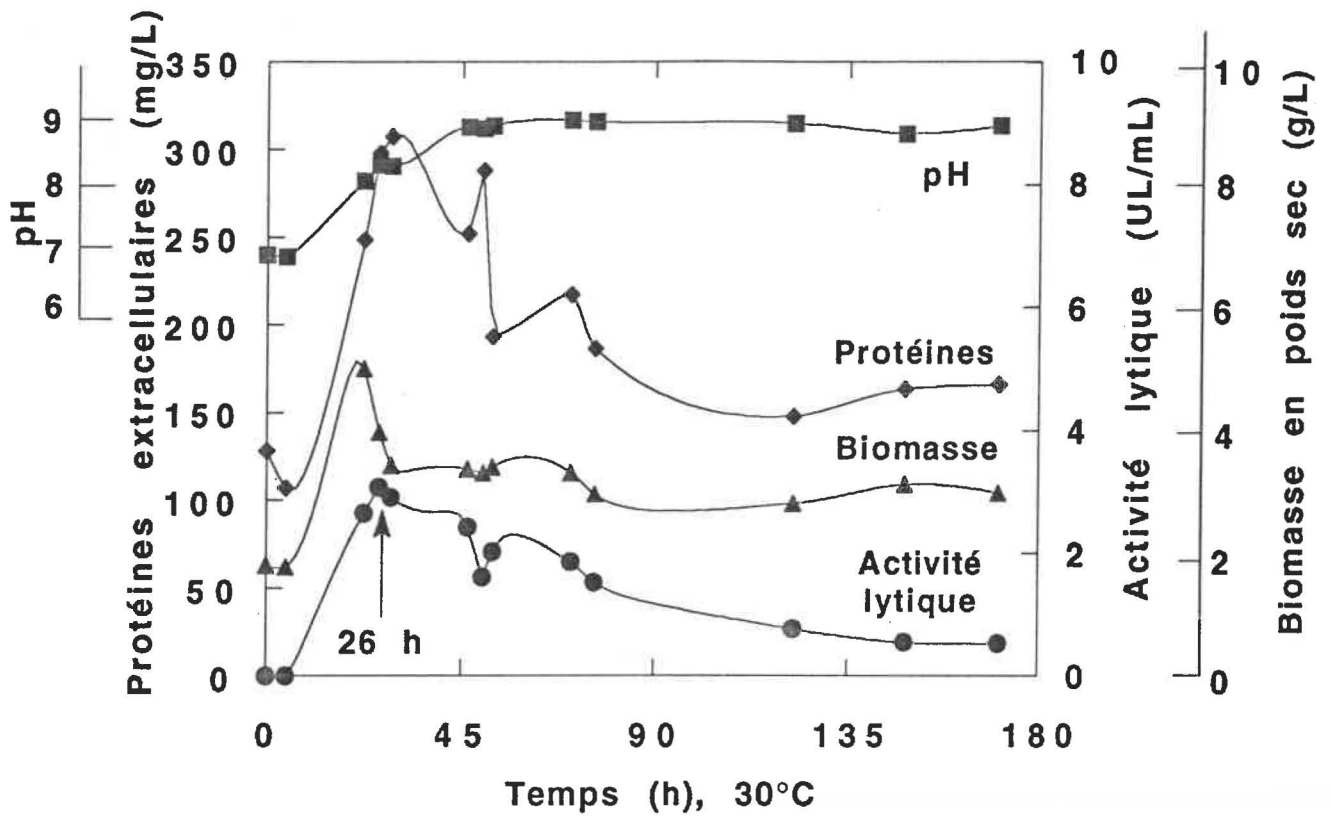


Figure 24: Cinétique de croissance et de production du système d'enzymes lytiques par *S. exfoliatus*. Le milieu employé était le bouillon Mex additionné de 1% (p/v) d'extrait de levure. La culture avait lieu dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu, à 30°C, avec une agitation de 300 rpm.

de *M. extorquens* (agissant comme substrat principal) dans le milieu de culture. Le pH initial était légèrement inférieure à 7,0. Après 26 heures, on voit que l'activité lytique maximale était atteinte et que celle-ci diminuait graduellement jusqu'à la fin de la culture, à environ 180 heures. De même, la quantité de protéines dans le surnageant de la culture était proportionnelle à l'activité lytique et diminuait de la même façon. La quantité de biomasse totale atteignait un maximum de 5 g/L à 24 heures (cellules tuées de *M. extorquens* + cellules de *S. exfoliatus*) pour ensuite se stabiliser à environ 3 g/L à partir de 36 heures, ce qui correspondrait peut-être à la biomasse de *S. exfoliatus*, la biomasse provenant de *M. extorquens* ayant été digérée par *S. exfoliatus*. Le pH, lui, s'élevait graduellement, passant de 7,0 à 9,0 en 45 heures.

Par hasard, on a aussi observé que le milieu CASO de la firme E. Merck, un milieu composé de peptone de caséine et de farine de soya, pouvait aussi permettre une bonne production d'enzymes lytiques. Ce milieu avait été utilisé auparavant dans la production de cellules de *S. exfoliatus* comme substrat pour la détermination du type d'acide diamino pimélique après l'hydrolyse des cellules (section 2.2). On avait alors observé que le surnageant de ces cultures pouvait aussi provoquer une diminution de la densité optique d'une suspension de *M. extorquens*. Une cinétique de production d'enzymes lytiques a alors été effectuée avec le milieu CASO. Les résultats de cette expérience sont représentés à la Figure 25. Comme pour la Figure 24, le pH, l'activité lytique du surnageant, et la biomasse (en poids sec) ont été suivis pendant une semaine. Puisque le milieu CASO est riche en protéines, il a été impossible d'établir cette fois-ci une corrélation entre l'activité lytique et la quantité de protéines

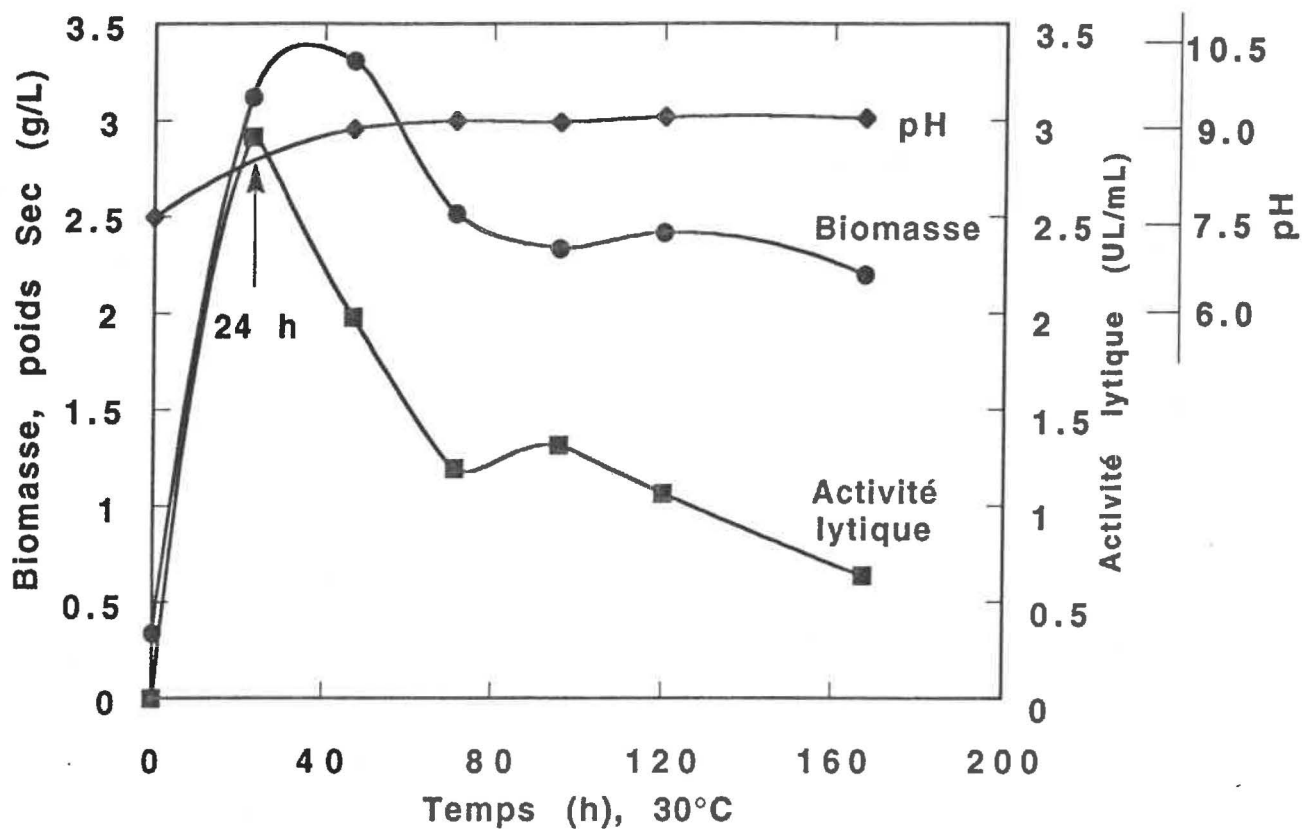


Figure 25: Cinétique de croissance et de production du système d'enzymes lytiques par *S. exfoliatus* sur milieu CASO (sans cellules de *M. extorquens*). La culture a eu lieu dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu, à 30°C, et avec une agitation de 300 rpm.

extracellulaires, du fait que la quantité de protéines extracellulaires mesurée au temps zéro était importante et variait peu durant l'incubation subséquente.

Le pH initial de la culture était de 7,5. Après 24 heures, l'activité lytique atteignait un maximum de 3 UL/mL, ce qui était équivalent à la production obtenue auparavant avec le milieu Mex additionné d'extrait de levure (Figure 24). La biomasse cellulaire était maximale autour de 40 heures, avec environ 3,5 g/L (poids sec). L'activité lytique semblait diminuer plus rapidement dans ce milieu qu'avec le milieu Mex avec extrait de levure (Figure 24). La biomasse cellulaire diminuait aussi durant la période 40-72 heures pour ensuite se maintenir à environ 2,5 g/L (poids sec) jusqu'à la fin de la culture. Le pH, lui, monta pour atteindre 9,0 après 40 heures et est demeuré stable par la suite. Une répétition de cette expérience a donné des résultats similaires, confirmant que le milieu CASO pouvait être utilisé avantageusement pour la production du système lytique extracellulaire par *S. exfoliatus*. Ce milieu était aussi plus facile d'utilisation que le milieu Mex, modifié ou non.

3.5. Effet de la concentration en enzyme sur l'efficacité de la lyse

A un moment donné, nous avons voulu déterminer le pourcentage de lyse maximal pouvant être obtenu avec le système lytique brut dérivé de *S. exfoliatus*. Pour ce faire, nous avons fait varier la quantité d'enzymes lytiques ajoutée au mélange réactionnel régulier. Des concentrations finales en enzymes lytiques de 0 à environ 3 UL/mL ont été évaluées pour cette

étude et les résultats sont présentés à la Figure 26. Le pourcentage de baisse de la densité optique augmentait en fonction de la quantité d'enzymes utilisée pour atteindre un plateau à 60% de lyse, ceci étant obtenu avec une concentration finale d'enzymes lytiques de 2 UL/mL. Cette concentration d'enzymes sera utilisée plus tard pour les tests de lyse employant des cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB.

3.6. Détermination du profil enzymatique du système lytique brut dérivé de *S. exfoliatus*

Le système lytique brut dérivé de *S. exfoliatus* contenait une activité protéolytique, comme on peut le voir à la Figure 27. En effet, l'accroissement de l'absorbance à 520 nm du surnageant obtenu du mélange réactionnel indiquait la présence d'une telle activité, l'augmentation de l'absorbance étant due à la libération du pigment rouge provenant de l'AZOCOLL. Le Tableau 9 montre aussi que le système lytique brut contenait aussi les activités N-acétyl-glucosaminidase, lysozyme et estérase, activités retrouvées dans plusieurs autres systèmes lytiques.

4. Essais de lyse de cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB

Des essais préliminaires de lyse faits avec des cellules de *M. extorquens* contenant une quantité appréciable de PHB avaient montré que le système lytique causait une dégradation significative du matériel cellulaire entourant les granules de PHB. En effet, lors d'observations microscopiques, les granules de PHB des cellules traitées avec le système

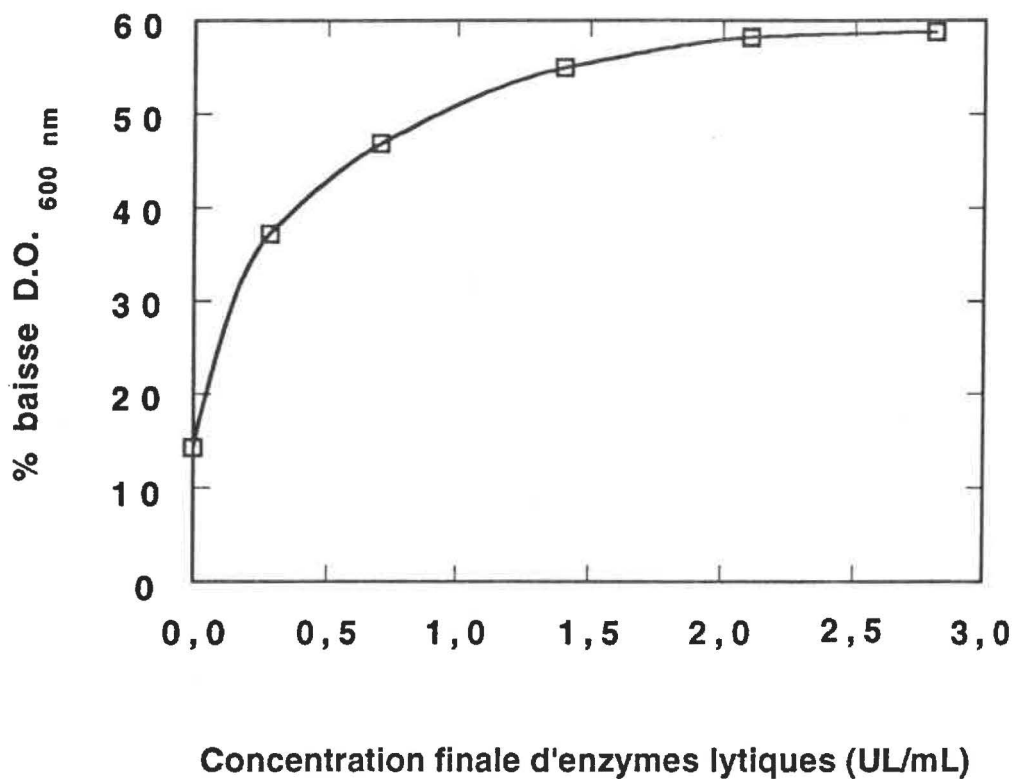


Figure 26: Influence de la concentration d'enzymes lytiques sur le degré de lyse d'une suspension de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur (121°C, 15 minutes). Les cellules contenaient peu ou pas de PHB. La préparation d'enzymes lytiques provenait d'un surnageant de *S. exfoliatus* cultivé dans le milieu CASO. La réaction avait lieu à pH 8,0, 50°C, avec une agitation de 250 rpm dans du tampon phosphate de sodium (50 mM).

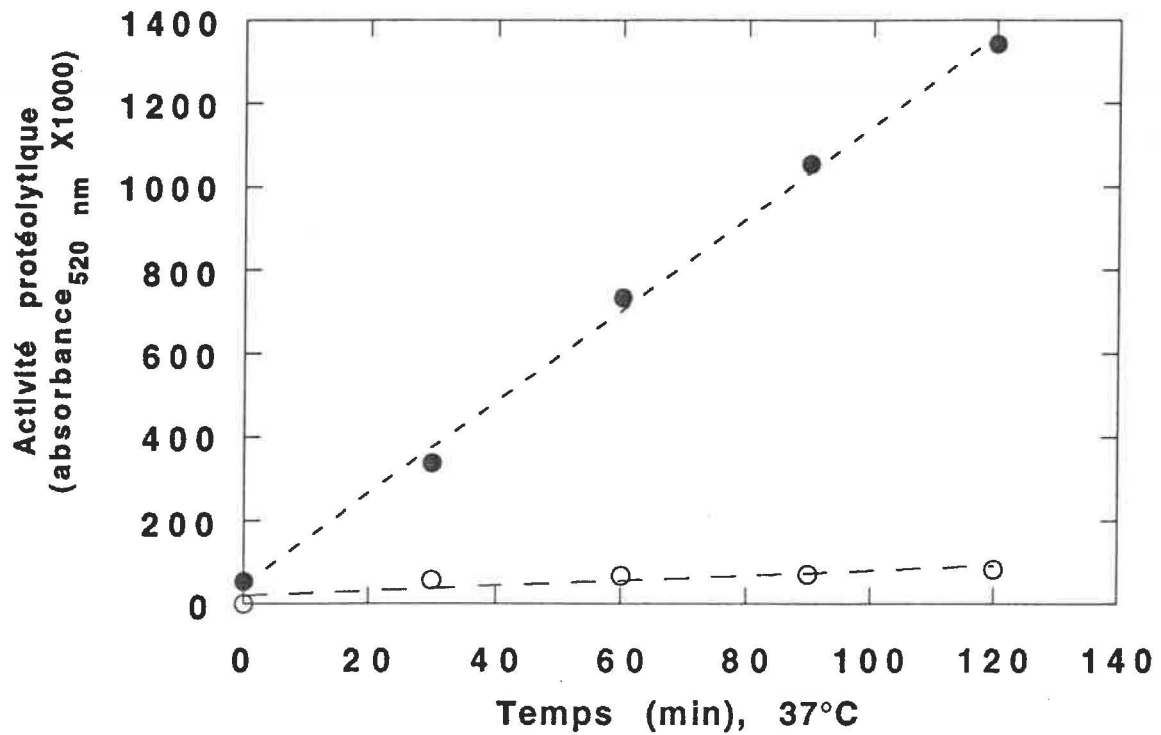


Figure 27: Évidence de la présence d'une activité protéolytique dans le système d'enzymes lytiques brut dérivé de *S. exfoliatus*. La réaction avait lieu à 37°C, dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), avec une agitation de 200 rpm. (●, avec enzymes; ○, contrôle avec le tampon)

Tableau 9: Profil enzymatique partiel du système lytique brut de *S. exfoliatus* produit dans le bouillon CASO.

Activité enzymatique	Substrat utilisé (1)	Résultat
Activité protéolytique	AZOCOLL	+
N-acétyl-glucosaminidase	4-méthylumbelliféryl-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside (4-MUADG)	+
N-acétyl-muramidase (lysozyme)	4-méthylumbelliféryl-N,N',N"-triacétyl-β-chitotrioside. (4-MUTC)	+
estérase	p-nitrophénylacétate (PNPA)	+

(1) détails techniques dans la section Matériel et Méthodes

d'enzymes lytiques étaient beaucoup plus visibles que les granules des cellules non-traitées. Même dans le meilleur des cas, les granules de PHB n'ont jamais été libérés complètement mais étaient encore retenus par du matériel cellulaire non-PHB.

4.1. Effet du prétraitement à la chaleur sur l'efficacité de la lyse

Jusqu'ici, les cellules de *M. extorquens* servant comme substrat dans les tests de lyse avaient toujours été traitées d'abord à la chaleur (121°C, 15 minutes) afin de les tuer et ainsi les "attendrir"; du même coup, ce traitement détruit les PHA dépolymérase de la cellule ainsi que les acides nucléiques qui augmente la viscosité de la suspension lors de leur relâchement. Afin de minimiser les coûts, nous avons voulu vérifier si un prétraitement à des températures moindres pourrait être aussi efficace. On trouve les résultats de ces travaux à la Figure 28. On a observé peu de différence entre des prétraitements à 85, 100 et 121°C d'une durée de 15 minutes chacun, un prétraitement à 85°C donnant un résultat aussi appréciables qu'à 121°C. Avec des cellules non-traitées (25°C), donc toujours vivantes, l'étendue de la lyse était sensiblement plus faible et semblait de nature "autolytique" car la lyse n'était pas supérieure à celle observée avec le test contrôle (environ 10% de lyse dans les deux cas). Les cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB donnèrent des baisses de densité optique environ trois fois inférieures aux valeurs maximales obtenues précédemment avec des cellules avec peu ou pas de PHB (50-60 % de lyse vs 16-18% ici). Il était facile d'observer au microscope que la digestion des cellules n'était pas aussi efficace que lors

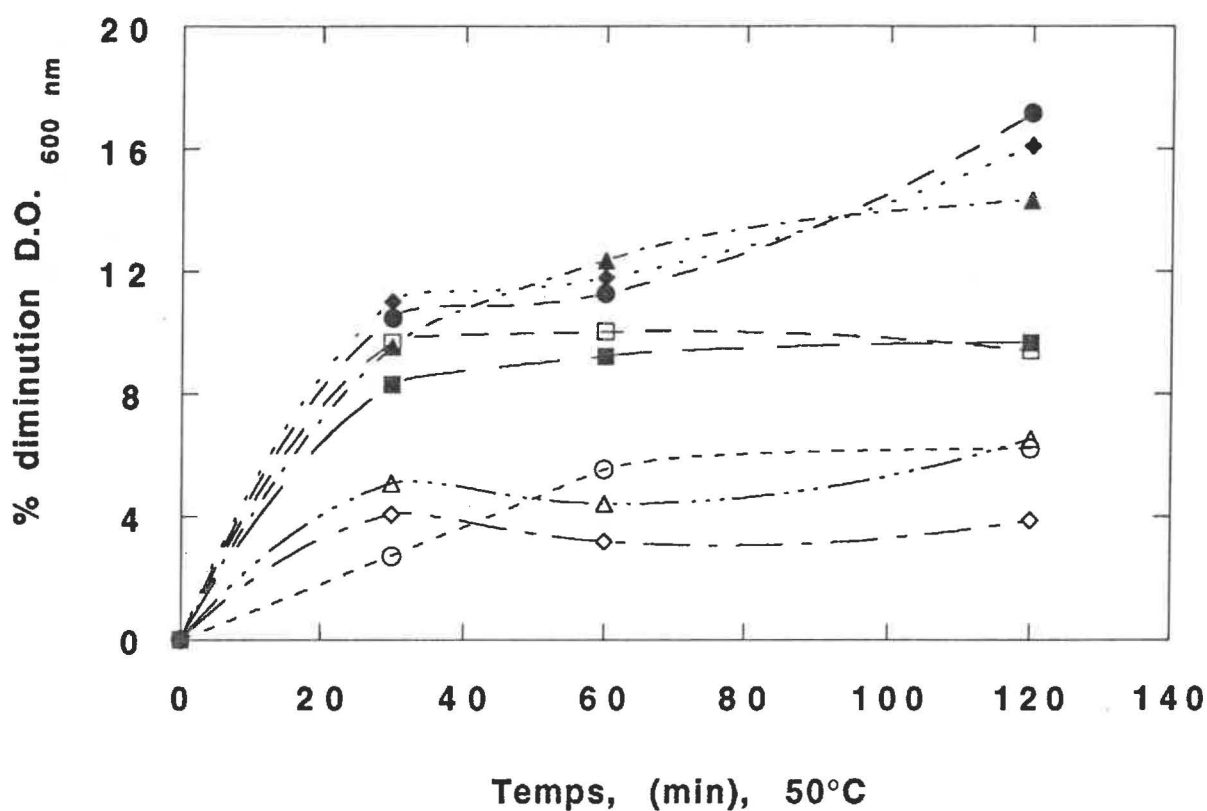


Figure 28: Influence du prétraitement thermique des cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB sur le degré de lyse de ces cellules par le système lytique brut de *S. exfoliatus*. La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8,0) avec une agitation de 200 rpm. (●,○)121°C, (◆,◇)100°C, (▲,△) 85°C et (■,□) 25°C. Symbole plein: cellules+enzymes; symbole vide: cellules+tampon (contrôle).

des essais préliminaires, les granules étant moins bien définis (voir section 4).

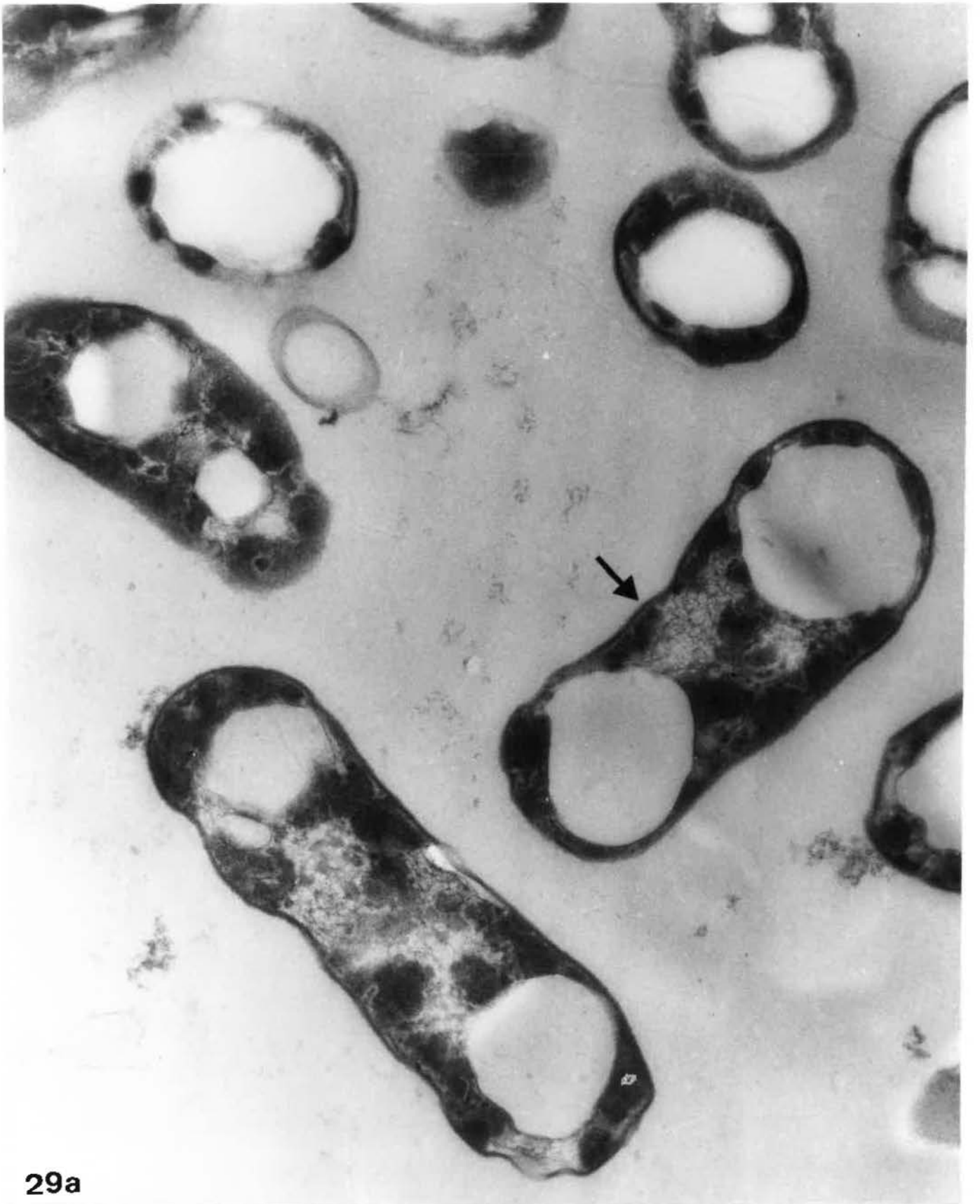
4.2. Evaluation par microscopie électronique à transmission de l'efficacité du traitements aux enzymes lytiques

Tel que rapporté précédemment, les granules de PHB étaient plus visibles en microscopie optique suite à un traitement enzymatique; les granules n'avaient pas été complètement libérés mais étaient encore entourés de matériel cellulaire non-PHB. Afin d'évaluer à nouveau l'étendue de la dégradation de la paroi bactérienne des cellules contenant des granules de PHB, suite au traitement lytique, des observations sur ces cellules ont été entreprises à l'aide de la microscopie électronique. Les observations ont été faites en trois temps, soit après 0, 5 et 24 heures de traitement avec les enzymes lytiques de *S. exfoliatus*, accompagnées des contrôles appropriés.

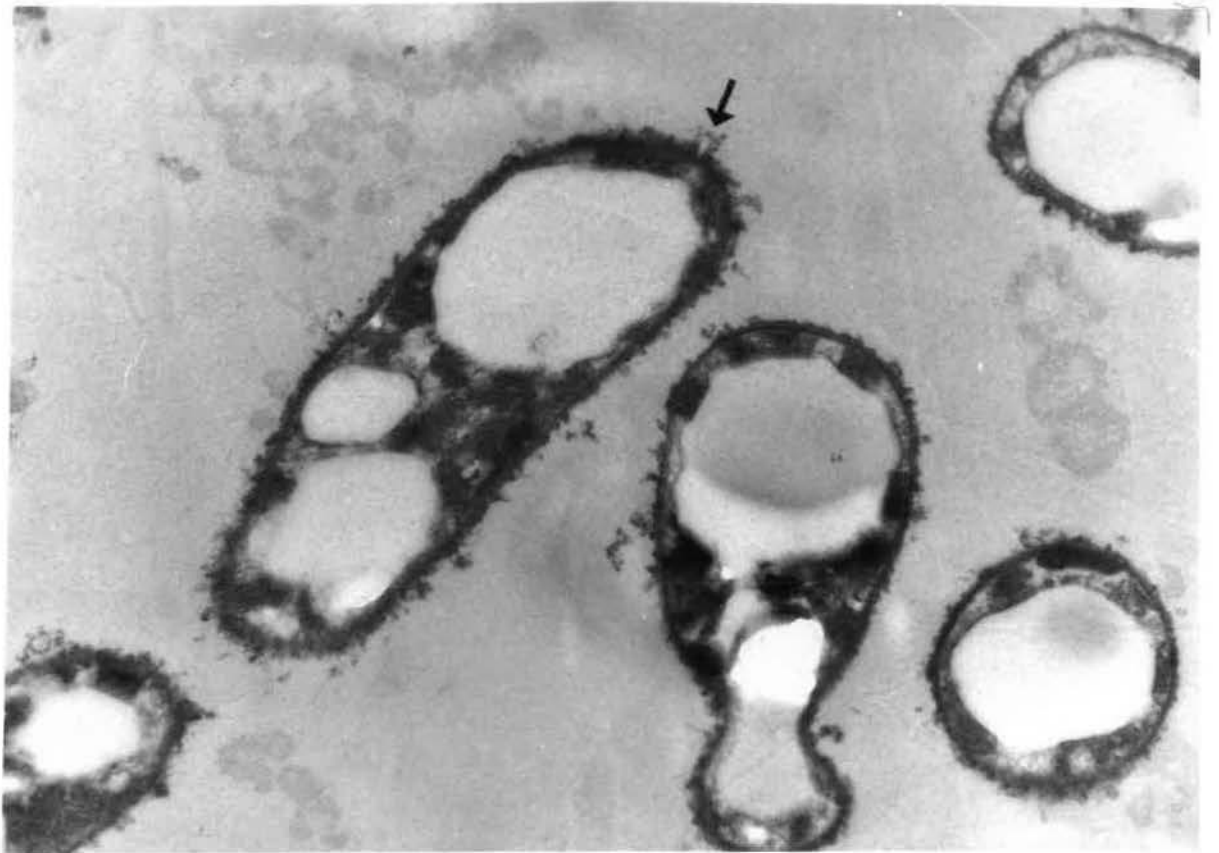
La paroi de la bactérie était encore bien visible au temps 0 h (Figure 29a), même si ces cellules avaient été prétraitées à la chaleur (121°C, 15 minutes). On distingue encore bien la couche de peptidoglycane (ligne foncée) entourant la cellule. Les granules sont bien visibles en blanc puisqu'ils ne fixent pas les métaux lourds des colorants utilisés. L'intérieur de la cellule est gris-pâle, ce qui est typique d'une cellule morte (Page, 1992). On peut aussi observer des zones denses aux électrons (*i.e.* qui fixe fortement les métaux lourds) à l'intérieur des cellules, de forme lamellaire, qui pourraient correspondre au chromosome détruit de la bactérie.

Figure 29: Micrographies électroniques à divers temps d'incubation de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur puis avec le système lytique de *Streptomyces exfoliatus* :

- (a) à temps zéro (45 000 X);
 - (b) à 5 heures (60 000 X);
 - (c) à 5 heures (contrôle) (51 000 X);
 - (d) à 24 heures (45 000 X);
 - (e) à 24 heures (contrôle) (45 000 X);
 - (f) à 24 heures (90 000 X).
-

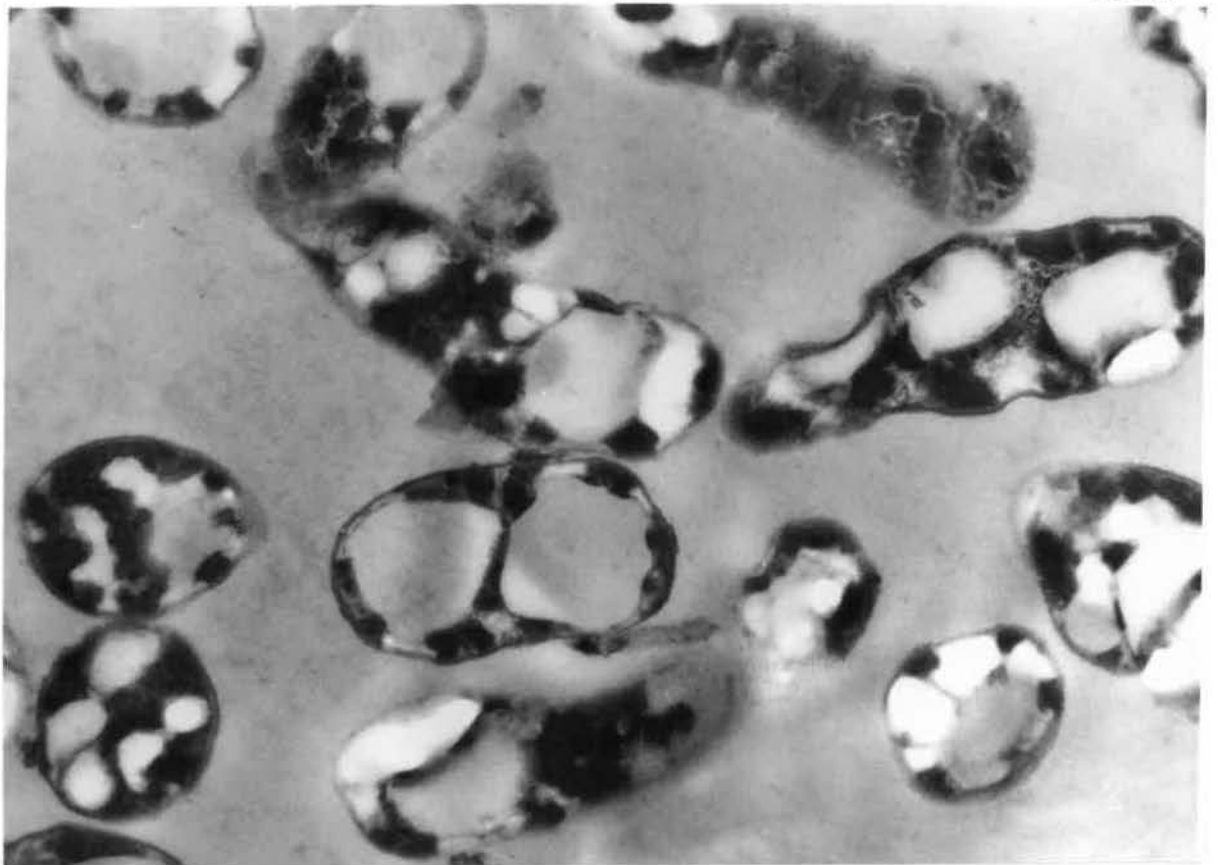


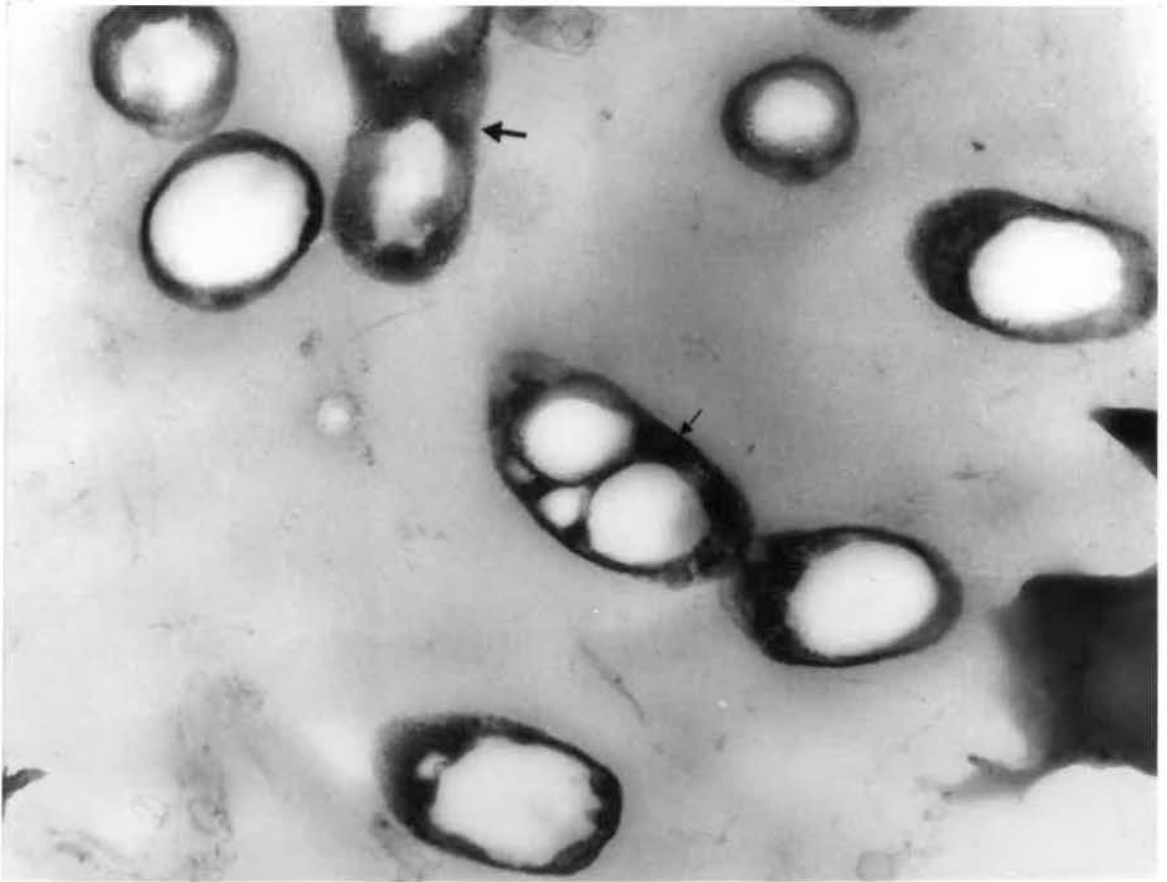
29a



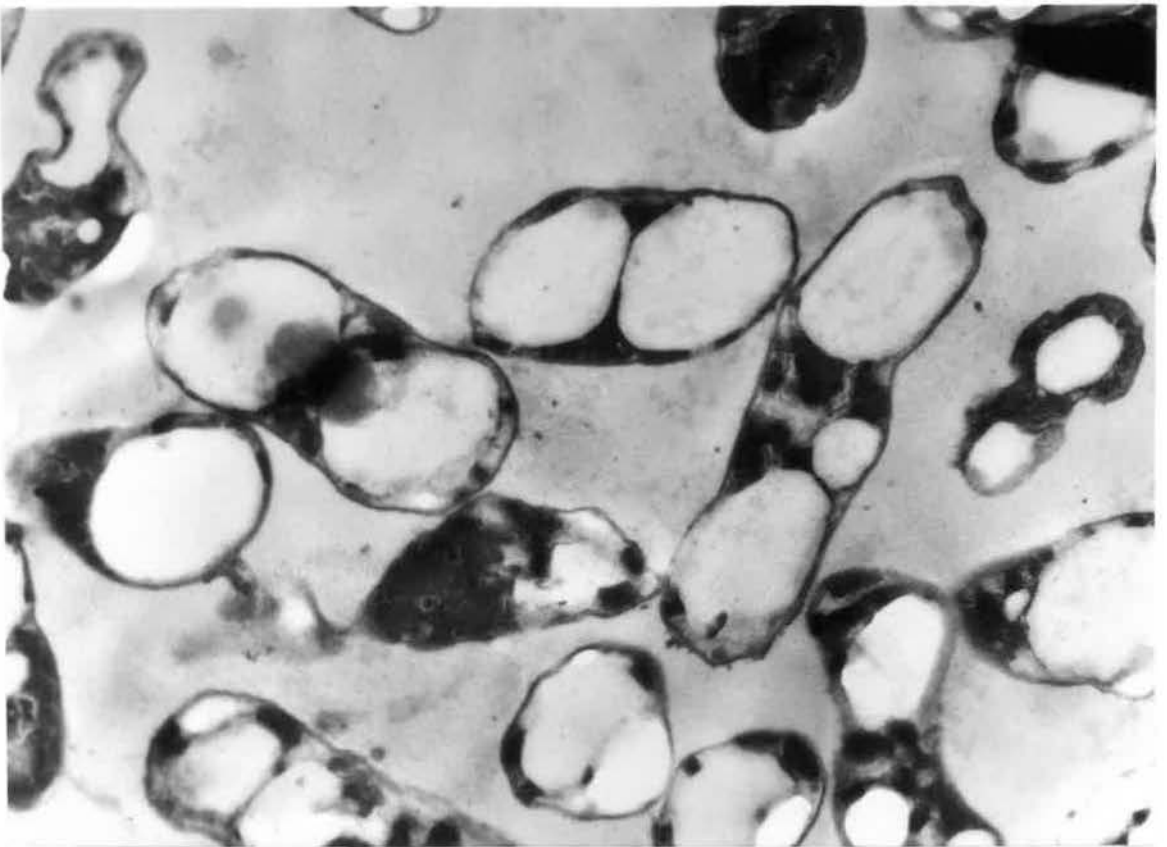
29b

29c





29d



29e



Après une incubation de 5 heures (Figure 29b), on voit apparaître des structures filiformes sur la surface bactérienne, comme si des filaments du peptidoglycane ou de la paroi s'étaient détachés en partie des cellules. Ces structures étaient absentes des cellules incubées avec du tampon seulement (Figure 29c). Après une incubation de 24 heures, la paroi des cellules traitées était devenue très floue (Figure 29d et 29f) et le matériel intracellulaire était plus foncé que celui retrouvé dans les contrôles (Figure 29e). Ce matériel formait une gaine retenant les granules ensemble. Il restait donc du matériel non-digéré autour des granules de PHB qu'il fallait encore éliminer.

4.3. Digestions répétées de cellules contenant des granules de PHB

Comme les granules de PHB n'étaient pas complètement libérés après 24 heures d'incubation avec le système d'enzymes lytiques utilisé précédemment, on a donc décidé de procéder à des digestions multiples. Donc, après 24 heures d'incubation en présence du système lytique dans les conditions optimales (pH 8,0, 50°C, 250 rpm), les cellules étaient centrifugées et resuspendues dans une préparation fraîche d'enzymes lytiques et le mélange réincubé pendant 24 heures. Ce traitement a été répété chaque jour pendant sept jours. À chaque jour, des observations microscopiques en contraste de phase étaient faites. À part le changement initial de forme déjà observé à 24 heures, les cellules semblaient ensuite conserver cette apparence suite aux autres traitements, comme si le système lytique avait atteint sa limite d'action et s'avérait incapable de

digérer plus de matériel cellulaire. Il était devenu évident que le système lytique brut produit par *S. exfoliatus* était incapable de libérer complètement les granules de PHB.

4.4. Influence de l'ajout de divers détergents sur la lyse des cellules

Il est bien connu que certains détergents peuvent être très efficaces pour la solubilisation du matériel cellulaire. Cela étant dit, nous avons voulu vérifier si certains détergents non-dénaturants pouvaient être utilisés avantageusement, en combinaison avec le système lytique, afin d'améliorer l'extraction du matériel cellulaire non-PHB. Dans une première étude, des cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur (et contenant des granules de PHB) étaient incubées pendant 15 minutes à 50°C en présence de divers détergents à une concentration finale de 0,5 % (v/v) en plus du système lytique brut de *S. exfoliatus*. Comme on peut le constater à la Figure 30, le détergent Brij 78 était le plus efficace: une baisse de 17 % de la densité optique fut obtenue avec ce détergent. Des observations microscopiques en contraste de phase indiquèrent que l'extraction du matériel cellulaire non-PHB avait été cependant relativement limitée. Il était évident que même un traitement combiné détergents plus enzymes n'était pas suffisant pour donner une extraction efficace du matériel cellulaire non-PHB. Notons en passant qu'une formation importante de flocs était observée avec le détergent Tween 85. Ceci pourrait être dû à la cmc (i.e. la concentration de surfactant nécessaire à la formation de micelle) de ce produit ou, encore, à sa structure chimique.

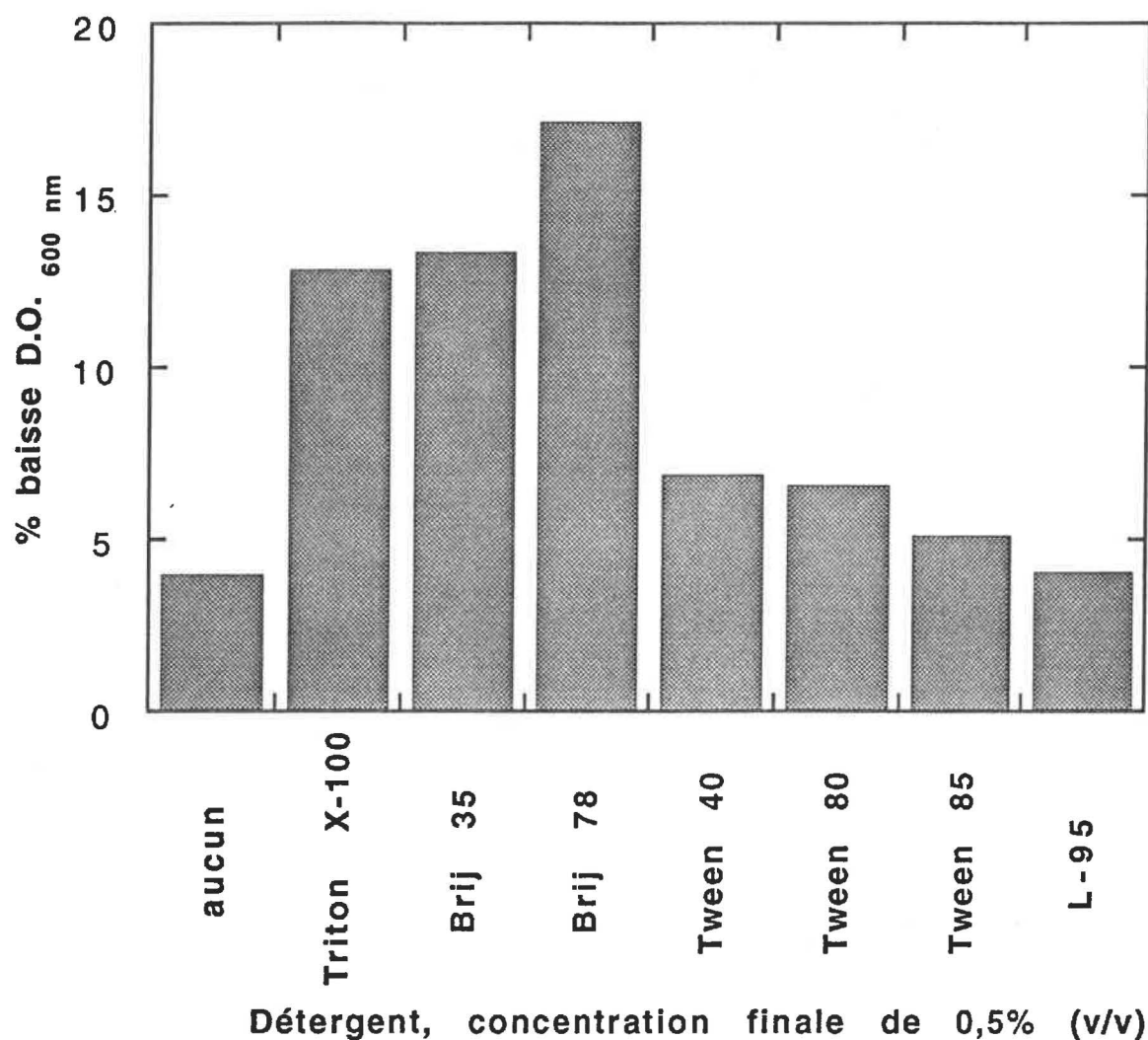


Figure 30: Influence de l'ajout de divers détergents sur la lyse (baisse de densité optique à 600 nm) de cellules de *M. extorquens* traitées par le système lytique de *S. exfoliatus*. (2 UL/mL) La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8.0) à une agitation de 250 rpm.

Une étude plus détaillée avec le détergents Brij 78 a ensuite été effectuée. On mesura alors l'effet de la concentration finale de ce détergent, toujours en combinaison avec le système lytique, sur la lyse (baisse de densité optique) des cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB. Les résultats sont présentés à la Figure 31. On a constaté que des concentrations du détergent Brij 78 dépassant 1.0 % (v/v) n'amélioreraient pas la lyse. Encore une fois, les observations microscopiques en contraste de phase indiquèrent que l'extraction du matériel cellulaire non-PHB avait été limitée. Les granules de PHB étaient toujours entourés de matériel cellulaire.

L'ajout de l'agent chélateur EDTA a aussi été considéré comme prétraitement avant la digestion aux enzymes lytiques. Après divers essais, nous avons conclu que l'EDTA n'apportait aucune amélioration du pouvoir lytique du système enzymatique dérivé de *S. exfoliatus*.

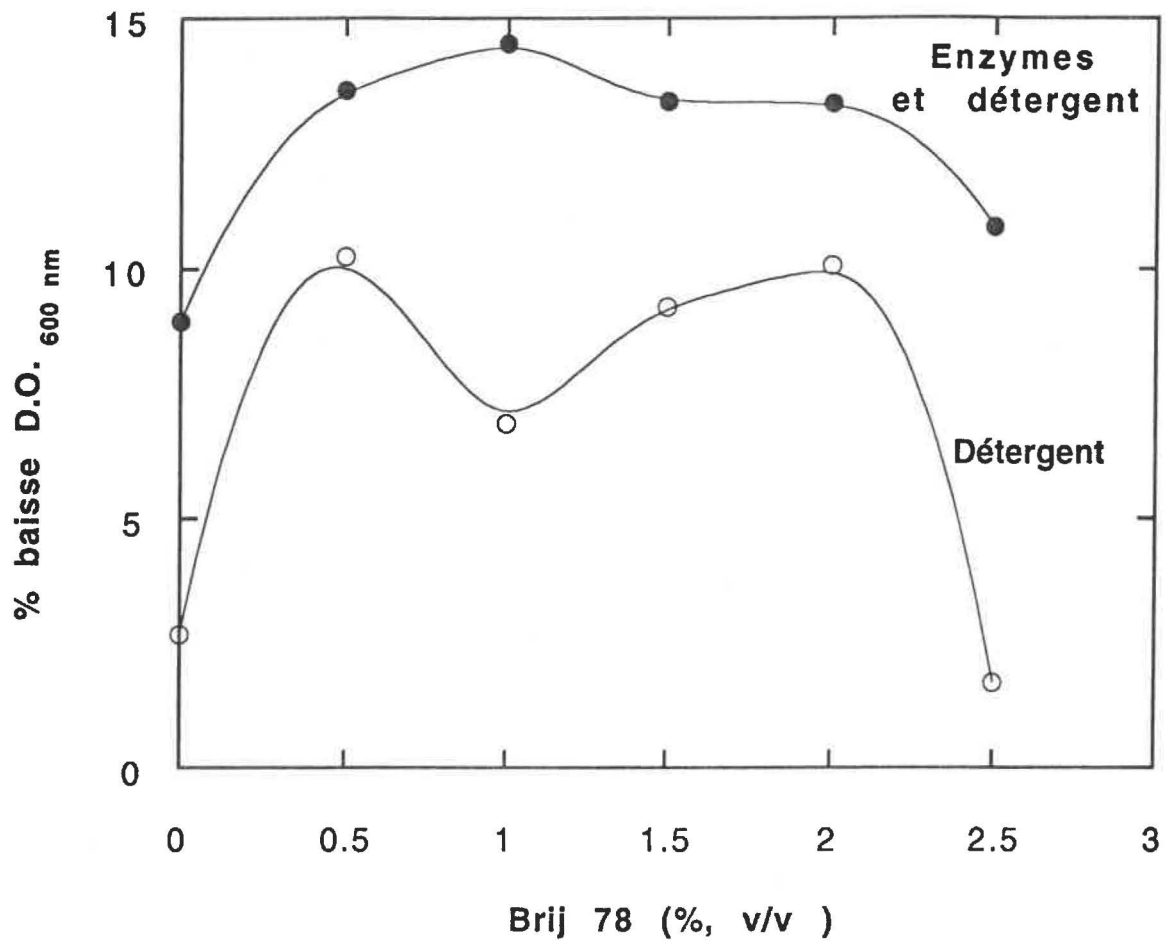


Figure 31: Effet de diverses concentrations du détergent Brij 78 sur la baisse de densité optique à 600 nm en présence (●) ou en absence (○) du système lytique. La réaction avait lieu à 50°C dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 8.0), avec 2 UL/mL du système lytique, et à une agitation de 250 rpm.

DISCUSSION

L'utilisation du milieu sélectif Mex (cellules tuées de *M. extorquens* dans de l'agar-agar) a permis d'isoler une souche bactérienne produisant des enzymes lytiques partiellement actives sur la bactérie méthylotrophe *Methylobacterium extorquens* isolée par Bourque et al. (1992a) et productrice de granules de PHB. Il a fallu toutefois s'y prendre deux fois afin d'isoler finalement une souche lytique prometteuse.

Lors du premier essai d'isolement, la souche prometteuse s'est avérée incapable, seule, de causer des zones de lyse sur les géloses Mex. Tel qu'indiqué plus tôt, la présence d'une deuxième culture à proximité de la première souche permettait toutefois l'apparition de zones d'éclaircissement entre les deux cultures (Figure 15), laissant supposer qu'une synergie quelconque entre les deux cultures était nécessaire pour une lyse efficace. On peut aussi supposer que les zones d'éclaircissement observées en phase initiale de purification étaient peut-être dues à un synergisme quelconque entre différents types microbiens provenant du sol. En effet, les systèmes d'enzymes lytiques sont souvent composés de plusieurs sortes d'enzymes (lysozyme, protéase, estérases, etc.). Il se peut donc que, dans certains cas, un microorganisme seul est incapable de produire le spectre complet d'enzymes nécessaire à une lyse efficace et qu'il faut l'apport d'au moins un autre microorganisme. Cela a pu être le cas lors du premier essai d'isolement. Lors de cet isolement, les échantillons de sols provenaient tous du même endroit, soit un sol riche en débris végétaux. En utilisant des sources d'échantillons plus variées, comme on l'a fait lors du deuxième essai d'isolement, on augmentait les chances d'isoler un microorganisme capable de produire en culture pure un système lytique efficace.

Aoki et al. (1985) ont isolé une souche de *Flavobacterium* capable de lyser la bactérie *Rhodococcus erythropolis*, une bactérie utilisant l'aniline comme seule source de carbone et d'azote. Pour ce faire, 800 échantillons de sol avaient été criblés pour donner 98 souches capables de causer des zones d'éclaircissement, grâce à une enzyme lytique, sur une gélose contenant 1% (p/v) de cellules vivantes de *R. erythropolis*. Dans notre cas, 6 échantillons de sol de provenance variée ont permis d'obtenir 10 souches capables de causer des zones d'éclaircissement évidentes sur des géloses Mex.

La souche No. 10, identifiée plus tard comme étant une souche de *Streptomyces exfoliatus*, était la seule souche, parmi les 10 souches préselectionnées, capable de produire un système enzymatique lytique avec une activité appréciable dans le milieu Mex liquide. L'absence de production évidente d'un tel système chez les autres souches pourrait être expliquée par l'absence d'un contact intime microorganisme/substrat due aux conditions de cultures utilisées (conditions agitées). La souche No. 10, une bactérie filamenteuse, a la propriété de s'associer étroitement aux amas de cellules de *M. extorquens* présents dans le milieu Mex liquide, favorisant ainsi ce contact intime présumément nécessaire. Initialement, le surnageant de la souche No. 10 avait provoqué une baisse d'environ 0,25 unité de densité optique corrigée à 600 nm (Figure 17), et ce, après une heure d'incubation. Ces résultats étaient comparables à la plupart des résultats initiaux rapportés par Aoki et al. (1985) et étaient donc très prometteurs.

Les enzymes bactériolytiques ne sont pas les seules molécules capables de provoquer la lyse de microorganismes. Plusieurs types d'antibiotiques peuvent causer la destruction de la cellule; par exemple, les β -lactames, telle la pénicilline, interfèrent avec la biosynthèse de la paroi bactérienne et provoquent l'autolyse de la cellule par ses propres autolysines (Tipper, 1987). Ces antibiotiques ne sont actifs toutefois que sur des cellules vivantes, dont le métabolisme est toujours actif. De petits peptides, tel la cécropine B, peuvent aussi provoquer la lyse de bactéries mais leur mode d'action n'est pas bien connu (Anon, 1990b). Les enzymes et autres protéines étant généralement plus thermosensibles que les molécules plus petites (antibiotiques, peptides), on soumet généralement toute activité lytique nouvelle à un test de résistance à la chaleur afin de vérifier si cette activité est associée à une protéine (enzyme) ou à une petite molécule. Dans notre cas, l'activité lytique présente dans un surnageant brut de la souche No. 10 était complètement détruite par un traitement à 100°C pendant 5 minutes (Figure 18), indiquant que l'activité lytique était due à une ou plusieurs protéines (enzymes).

La souche No. 10 a été identifiée comme étant une souche de *Streptomyces exfoliatus* après utilisation de techniques décrites dans le manuel Bergey's (Locci, 1989) et par Schaal (1985). Il faut noter toutefois que la corrélation obtenue avec *S. exfoliatus* n'est pas parfaite mais représente le meilleur résultat possible dans les circonstances. Afin de confirmer cette identification, nous avons fait appel à la firme Microcheck Inc. (Vermont, É.-U.), qui se spécialise dans l'identification microbienne. Cette firme utilise la chromatographie en phase gazeuse pour déterminer le profil des acides gras de la souche inconnue. En comparant ce profil à ceux

emmagasinés dans une banque de données, les 10 espèces les plus probables sont énumérées par un ordinateur. Dans notre cas, les résultats obtenus confirmaient que *S. exfoliatus* était l'identification la plus probable.

Après avoir identifié correctement la souche No. 10, on a procédé à une optimisation partielle des conditions réactionnelles employées pour la mesure de l'activité lytique. En premier lieu, nous avons déterminé le pH optimal auquel opérait le cocktail brut d'enzymes lytiques (Figure 22). Un pH optimal de 8,0 a été mesuré indiquant que l'activité lytique provenant de *S. exfoliatus* préférait des conditions alcalines. Si on se réfère à la littérature existant sur divers souches de *Streptomyces* productrices d'enzymes bactériolytiques, on voit que le pH optimal varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Par exemple, *Streptomyces rutgerensis* H-46 produit l'enzyme lytique SR-1 active sur des cellules lyophilisées et sur des parois isolées de la bactérie Gram-positif *Streptococcus faecalis* IFO 12580 (Hayashi et al., 1981). Cette enzyme montra un pH optimal de 6,0 sur des cellules vivantes de *S. faecalis* et sur des cellules ayant subi un traitement thermique (non-décrit dans le texte). D'un autre côté, *Streptomyces griseus* H-402 produit aussi une enzyme lytique ayant un pH optimal similaire (6,0); cette enzyme est active sur la bactérie Gram-positif *Streptococcus mutans* (Yokogawa et al., 1976). La souche *Streptomyces* No. 177, quant à elle, produit une enzyme active sur *Serratia marcescens*, une bactérie Gram-négative comme *M. extorquens*, ayant un pH optimal de 9,0 (Suzuki et al., 1985a). Suzuki et al. (1985b) ont même isolé une souche de *Micromonospora* produisant une enzyme active sur *S. marcescens* dont le pH optimal était de 11,0. Un fait intéressant est à noter; chez les

actinomycètes, les enzymes lytiques actives sur les bactéries Gram-positives tendent à avoir un pH optimal plutôt acide tandis que les enzymes lytiques actives sur les bactéries Gram-négatives montrent un pH optimal plutôt alcalin. Comme la composition chimique des parois varie selon que les bactéries soient Gram-positives ou Gram-négatives, il est plausible que les enzymes impliquées dans leur digestion diffèrent dépendant du type de paroi sur laquelle elles sont actives.

La température optimale de réaction tend à rester similaire d'un système enzymatique à l'autre. On a observé une température optimale de 50°C avec *S. exfoliatus* (Figure 23). Chez *Streptomyces griseus* H-402 et *Streptomyces rutgerensis* H-46, l'activité lytique était optimale à 50°C et 47°C, respectivement, ce qui est très proche de la valeur obtenue pour notre système (Yokogawa et al., 1976; Hayashi et al., 1981). Chez *Streptomyces* No. 177, une température optimale de 60°C a été observée (Suzuki et al., 1985a). En fait, la température optimale moyenne des enzymes lytiques provenant de divers actinomycètes varie de 50 à 60°C (Peczynska-Czoch et Mordarski, 1988).

La composition enzymatique de notre système lytique est similaire à celle du système mutanolysine de *Streptomyces globisporus* 1829, lequel comprend une N-acétylmuramidase, une N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase et une D-alanyl-(D)-*meso*-2,6-diaminopimélate endopeptidase (Kawata et al., 1983a; Kawata et al., 1983b; Kawata et al., 1984). Ce système mutanolysine est disponible commercialement et on a déjà suggéré son utilisation pour combattre la carie dentaire causée par la bactérie cariogène *Streptococcus mutans* (Hamada et al., 1978).

Il faut mentionner ici que nous avons effectivement mesuré une activité protéolytique et une activité estérase dans le système lytique brut de *S. exfoliatus*. Il est reconnu que les streptomycètes produisent plusieurs types de protéases extracellulaires de façon simultanée; par exemple, on a isolé dix protéases différentes du mélange Pronase de *Streptomyces griseus* (Peczynska-Czoch et Mordarski, 1988). La présence d'une activité estérase dans le système lytique de *S. exfoliatus* pourrait avoir un effet négatif sur la qualité finale du PHB. En effet, le PHB étant un polyester, celui-ci pourrait être attaqué par toute enzyme estérase présente, ce qui pourrait amener une baisse du poids moléculaire du polymère et affecter ainsi ses propriétés. La présence d'activité N-acétylglucosaminidase, une autre glycosidase, a été notée chez divers streptomycètes dont *Streptomyces griseus* (Peczynska-Czoch et Mordarski, 1988). Selon Savel'ev et al. (1980), cette enzyme, tout comme la N-acétylmuramidase, serait impliquée dans l'hydrolyse des liens β -1,4 entre l'acide N-acétylmuramique et le N-acétylglucosamine.

Divers ions métalliques sont capables d'améliorer l'activité de quelques systèmes lytiques. Par exemple, les ions Mn^{++} (à 1 mM) permettent une hausse de 42% de l'activité lytique de l'enzyme lytique No. 152 d'une espèce de *Micromonospora* (Suzuki et al., 1985b). Dans notre cas, aucune amélioration significative de l'activité lytique n'était observée après l'ajout de divers sels métalliques (Tableau 8) mais on remarqua toutefois que les ions Hg^{++} (à 1 mM) inhibaient fortement notre système lytique. Yokogawa et al. (1976) ont observé le même phénomène à la même concentration avec l'enzyme lytique de *S. griseus* H-402. On a aussi observé que les ions Mg^{++} inhibaient l'activité lytique à une concentration

finale de 10 mM mais n'avaient aucun effet à 1 mM. Les ions Mg^{++} inhibaient aussi l'enzyme lytique de la souche *Streptomyces* No. 177 (Suzuki et al., 1985a), laquelle perdait environ 50% de son activité en présence de sulfate de magnésium à 1 mM.

Avec notre souche de *S. exfoliatus*, la production du système lytique semblait se faire parallèlement à la production de biomasse (Figure 24), indiquant que le système lytique était probablement le résultat du métabolisme primaire de la culture; ce système lytique permettait l'apport de nutriments divers après digestion de la biomasse de *M. extorquens* servant de "milieu complexe". De plus, on a découvert plus tard qu'il n'était plus nécessaire d'utiliser des cellules de *M. extorquens* pour induire la synthèse des divers enzymes retrouvées dans le système lytique; en effet, l'utilisation du milieu CASO amenait aussi une bonne production des enzymes lytiques par notre souche de *S. exfoliatus*. Avec ce milieu, tout comme avec le milieu Mex, la production de ces enzymes semblait se faire parallèlement à la production de biomasse cellulaire (Figure 25). La souche *Micromonospora* No. 152 (Suzuki et al., 1985b) produit aussi une enzyme lytique de cette façon, bien que la production tend à s'accélérer après deux jours de culture. Un milieu minéral additionné de glucose, de peptone et d'extrait de levure était employé par ces chercheurs, sans ajout de cellules de *Serratia marcescens* pour induire la synthèse de l'enzyme. Ceci ne veut pas pour autant dire que la synthèse d'enzymes lytiques se fait de manière constitutive (non-induite). Les milieux complexes utilisés sont riches et pourraient contenir un ou des agent(s) causant l'induction de la production d'enzymes lytiques. Par exemple, la production de N-acétylglucosaminidase par une souche de *Streptomyces* est induite par la

présence de chito-oligosaccharides dans le milieu de culture (Iwamoto *et al.*, 1983). Des molécules similaires pourraient être présentes dans le milieu CASO, qui contient du peptone de caséine et de la farine de soja.

On a déterminé (Figure 26) que le système lytique brut dérivé de notre souche de *S. exfoliatus* ne pouvait pas causer plus de 60 % de lyse d'une suspension bactérienne de *M. extorquens* (cellules tuées avec peu ou pas de PHB). Ce maximum était atteint, dans nos conditions, avec une concentration finale de 2 UL/mL d'enzymes lytiques de *S. exfoliatus*. Il est plausible que les enzymes lytiques deviennent soit inhibées par un ou plusieurs produits de la lyse ou soit limitées par la quantité de "substrat cellulaire" disponible. Une étude plus exhaustive de cet aspect pourrait permettre l'identification de conditions réactionnelles conduisant à un degré final de lyse possiblement de l'ordre de 80-90%.

Après avoir déterminé la quantité maximale d'enzymes permettant d'obtenir la lyse maximale des cellules de *M. extorquens* sans PHB, on a ensuite procédé aux essais de lyse avec des cellules contenant des granules de PHB en quantité appréciable. Même après des ajouts répétés d'enzymes lytiques fraîches, les granules n'étaient jamais libérés complètement du matériel cellulaire les entourant. Il se peut donc qu'il y ait des différences structurelles et/ou chimiques entre la paroi des cellules avec ou sans PHB. Comme on l'a déjà mentionné, les cultures de cellules avec ou sans PHB étaient faites dans des conditions très semblables, ceci afin d'éviter de provoquer de trop grandes modifications dans la composition et la structure des cellules. Cependant, nous n'avons pu éviter le fait que la quantité d'azote disponible était moindre pour les cellules contenant du

PHB afin de permettre une accumulation plus rapide du polymère. Chez une espèce de *Vibrio* et chez *E. coli*, une carence en acides aminés, donc reliée à l'azote, peut causer des modifications à la paroi bactérienne (Siegele et Kolter, 1992). Par exemple, la souche *Vibrio* S-14, lorsque soumise simultanément à une carence en azote, en carbone et en phosphate, devient résistante à l'autolyse induite normalement par l'ampicilline et résistante aussi à la sonication (Nyström et Kjelleberg, 1989). Ces chercheurs ont remarqué qu'une demi-heure après le début de la carence provoquée, la synthèse du peptidoglycane avait augmenté significativement et s'était maintenue à de hauts niveaux tout au long de l'expérience. Tuomanen *et al.* (1988) ont étudié la composition du peptidoglycane de cellules de *E. coli* cultivées avec ou sans carence en acides aminés. Lorsque le peptidoglycane est digéré par diverses enzymes, on peut obtenir, par exemple, des monomères ou des dimères (N-acétylglucosaminyl-N-acétylmuramyle) qui peuvent être soit seuls, soit liés à des tripeptides ou à des tétrapeptides (provenant des ponts entre les chaînes de peptidoglycane) ou, encore, soit liés à des lipoprotéines. Ces chercheurs notèrent donc que le peptidoglycane obtenu de cellules en carence diffèrait de l'autre type de peptidoglycane sur les points suivants: (1) augmentation des complexes dimère-tripeptide, (2) diminution de la concentration de monomères et de dimères seuls ou liés aux lipoprotéines et (3) accroissement du nombre de ponts peptidiques DAP-DAP. On peut donc conclure qu'il y a plus de ponts peptidiques dans le peptidoglycane des cellules en carence d'azote. Ce même peptidoglycane était aussi plus résistant à la dégradation enzymatique *in vitro* (Tuomanen *et al.*, 1988). Ce phénomène a aussi été observé avec des cellules de *E. coli* entrant en phase stationnaire (Tuomanen *et al.*, 1988). Toujours selon Tuomanen *et al.*

(1988), les cellules devenaient plus résistantes à des traitements à l'acide trichloro-acétique ou à des cycles gel-dégel lorsque 90 % de leur peptidoglycane était du type "en carence". Il est donc plausible que cette situation existe chez d'autres espèces, comme *M. extorquens*, et ceci pourrait expliquer la plus grande résistance des cellules de *M. extorquens* contenant des granules de PHB au système d'enzymes lytiques de *S. exfoliatus*, tel qu'observé dans nos travaux. On a rapporté que les parois de divers espèces de *Methylobacterium* semblaient plus épaisses par comparaison à celles d'autres espèces bactériennes (Jensen et Corpe, 1991). La souche *Methylobacterium* AA10, par exemple, possède une couche externe épaisse composée de matériel fibrillaire. On a aussi noté la présence de matériel d'apparence granulaire autour des cellules de la souche SAL (Jensen et Corpe, 1991). Les divers espèces de *Methylobacterium* ne semblent donc pas posséder une paroi typique des bactéries Gram-négatives et pourraient donc être plus résistantes à certains types de stress environnementaux.

Il est bien connu que certains détergents (ex.: Triton X-100), certains chélateurs (ex.: EDTA) ou certains antibiotiques (ex.: polymyxine B) peuvent détruire la membrane externe des bactéries Gram-négatives (Andrews et Asenjo, 1987). Nos essais, malheureusement, ont démontré que l'EDTA et divers détergents (Figure 30 et 31) n'amélioreraient pas vraiment la lyse des cellules de *M. extorquens* contenant du PHB par le système lytique de *S. exfoliatus*. Une telle résistance à des détergents a été notée chez une souche de *Methylobacterium organophilum*; sa membrane externe n'était pas affectée par un traitement à 2 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 50°C. Cette résistance pourrait être due à la présence de lipides polaires non-phosphatés (Jensen et Corpe, 1991). De la même façon,

notre souche de *M. extorquens* pourrait être protégée de l'action partiellement destructrice des détergents et des chélateurs par de tels lipides polaires dont la présence n'a pas encore été prouvée toutefois chez *M. extorquens*.

Comme étape finale de notre étude, nous avons utilisé la microscopie électronique par transmission afin d'évaluer visuellement l'efficacité du complexe lytique de *S. exfoliatus* à digérer le matériel cellulaire de *M. extorquens*. Suite à une incubation de cinq heures en présence du système lytique, nous avons pu observer l'apparition de structures à la surface des cellules (Figure 29b), lesquelles structures pourraient correspondre à des morceaux de la paroi bactérienne devenus partiellement détachés de la cellule après l'action du système lytique. Après une incubation de 24 heures, la paroi avait presque complètement disparu (Figure 29d) par rapport aux cellules-contrôles (Figure 29e). Les cellules semblaient avoir perdu aussi de leur turgescence mais il était évident que les granules de PHB étaient encore entourés de matériel cellulaire et n'avaient donc pas été libérés tel qu'espéré au début de nos travaux. Harrison *et al.* (1991) ont tenté d'extraire les granules de PHB de cellules vivantes d'*Alcaligenes eutrophus* en utilisant un système lytique provenant d'une espèce de *Cytophaga*: des résultats semblables aux nôtres ont aussi été obtenus, *i.e.* seulement une élimination partielle du matériel cellulaire non-PHB et la présence de granules entourés de matériel cellulaire.

Le système lytique brut provenant de *S. exfoliatus*, et partiellement évalué dans cette étude, n'est pas encore assez puissant ou suffisant pour libérer complètement les granules de PHB des cellules de *M. extorquens*.

Cependant, il n'y a pas de doute que le système lytique cause des dommages appréciables aux suspension de cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur, et ceci est généralement vrai avec des cellules contenant peu ou pas de PHB. Avec des cellules contenant une quantité importante de PHB, l'efficacité du système lytique brut a été moindre.

L'examen au microscope électronique des cellules traitées a toutefois démontré que le système lytique avait extrait une partie du matériel cellulaire non-PHB et certainement endommagé la paroi bactérienne. Ou bien il faudra, dans des travaux futurs, employer un système lytique plus concentré (ou plus actif), ou différent, ou bien il faudra combiner cette méthode enzymatique avec une méthode mécanique (homogénéisateur, moulin à billes, etc.) afin d'obtenir une libération efficace des granules de PHB. Par exemple, Baldwin et Robinson (1990) ont utilisé un système lytique, la Zymolyase, contre *Saccharomyces cerevisiae* comme prétraitement avant le passage des cellules dans un homogénéisateur à haute-pression. Après 4 passes à l'homogénéisateur, presque 100 % des cellules avaient été détruites à comparer à 32 % pour des cellules non-prétraitées. L'utilisation d'enzymes permettrait donc de réduire les coûts d'utilisation des divers appareils mécaniques en réduisant le temps d'utilisation de ces appareils et aussi la demande en énergie.

Comme on l'a vu, la souche de *S. exfoliatus* isolée produit plusieurs sortes d'enzymes (Tableau 9). La littérature indique que d'autres souches de cette espèce produisent des produits d'intérêt commercial: antibiotiques antifongiques (Kneifel et al., 1974; Imai et al., 1990), antibiotiques contre les mites (Admirant et al., 1972), endonucléases (Shimotsu et al., 1980),

etc. Il pourrait donc être intéressant, dans une recherche future, d'étudier plus à fond les types d'enzymes et de métabolites produits par notre souche de *S. exfoliatus*. Il est bien connu que les souches de *Streptomyces* ont été à l'origine de surprises intéressantes dans le domaine des antibiotiques et des enzymes industrielles.

CONCLUSIONS

Les conclusions que l'on peut tirer de cette recherche en rapport avec l'isolement d'un microorganisme capable de produire un système lytique partiellement actif sur des cellules de *Methylobacterium extorquens* sont les suivantes:

- 10 souches microbiennes isolées de divers échantillons de sol se sont montrées capables de produire des zones d'éclaircissement sur des géloses Mex, indiquant un certain pouvoir lytique;
- Une seule de ces souches, la souche No. 10, était capable de livrer une activité lytique extracellulaire appréciable dans le bouillon Mex;
- Un traitement calorifique (100°C, 5 minutes) détruisait toute activité lytique, indiquant que l'activité lytique est d'origine protéique (probablement enzymatique) et non pas associée à de petites molécules (peptides, antibiotiques, etc.);
- Suite à des observations visuelles et morphologiques, après une chromatographie en couche mince et après des études biochimiques, cette souche a été identifiée finalement comme étant une souche de *Streptomyces exfoliatus*. Ceci a été confirmé plus tard par la firme Microcheck (Vermont, É.-U.);
- Le pH optimal et la température optimale sont, respectivement, 8,0 et 50°C pour le système lytique extracellulaire brut;
- Aucun des sels (ions) étudiés n'améliorait la digestion du matériel cellulaire non-PHB par le système lytique brut de *S. exfoliatus*; par contre, les ions Hg^{++} , Ni^{++} et Cr^{++} étaient inhibiteurs à une concentration finale de 1 mM. De plus, les ions Mg^{++} et Fe^{+++} , à une concentration finale de 10 mM, inhibaient complètement l'activité lytique;

- Une cinétique de croissance et de production d'enzymes dans le bouillon Mex, auquel on avait ajouté 1 % (p/v) d'extrait de levure, démontrait que le temps optimal pour la récupération des enzymes lytiques était de 26 heures;
- Le milieu CASO, à base de peptones de caséine et de farine de soja, permettait aussi la production d'enzymes lytiques par *S. exfoliatus*, sans avoir besoin d'inclure des cellules tuées de *M. extorquens* dans le bouillon. La production d'enzymes lytiques était maximale à 24 heures;
- Une concentration finale de 2 UL/mL du système lytique brut de *S. exfoliatus* causait un maximum de 60 % de baisse de la densité optique à 600 nm d'une suspension de cellules tuées de *M. extorquens* contenant peu ou pas de PHB; des concentrations supérieures à 2 UL/mL n'augmentaient pas le degré de lyse des suspensions cellulaires;
- Grâce à des tests biochimiques utilisant des substrats chromogéniques, on a déterminé que le système lytique brut de *S. exfoliatus* contenait les activités enzymatiques suivantes:
 - protéase
 - N-acétylglucosaminidase
 - N-acétylmuramidase
 - estérase;
- Bien que le système lytique montrait un effet certain sur les parois des cellules de *M. extorquens* traitées à la chaleur, les granules de PHB ne furent jamais complètement libérés. Des études en microscopie électronique ont démontré que la paroi était bel et bien attaquée par le système lytique brut mais il restait encore du matériel cellulaire non-PHB autour des granules;
- L'ajout de divers détergents, le Brij 78 en particulier, n'améliorait pas la

digestion du matériel cellulaire non-PHB. Ceci était aussi vrai pour le chélateur EDTA;

- Des essais de digestions répétées avec le système lytique brut n'ont pas amélioré l'extraction des granules de PHB;

En somme, on a pu isoler une souche bactérienne capable de produire un système d'enzymes lytiques partiellement actif sur des cellules traitées à la chaleur de *M. extorquens*. À ce jour, ce système ne permet pas une digestion complète du matériel cellulaire non-PHB mais affecte quand-même la paroi de la cellule. Des études plus poussées sur ce système permettront peut-être de réaliser une digestion complète de la paroi, permettant ainsi l'extraction des granules de PHB. Une autre approche serait l'utilisation d'un procédé d'extraction mettant en cause des enzymes lytiques en combinaison avec un traitement mécanique.

Avec des études plus poussées, la souche isolée pourrait dévoiler aussi d'autres surprises (antibiotiques nouveaux, enzymes d'utilité industrielle, etc.), ce qui est tout à fait plausible considérant les succès industriels obtenus jusqu'à ce jour avec les actinomycètes.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier Denis Groleau de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) pour m'avoir pris sous sa direction dans son laboratoire et m'avoir montré les trucs du métier. Je voudrais aussi remercier Jean-Guy Bisailon de l'Institut Armand-Frappier (IAF) pour m'avoir pris sous sa direction à l'IAF et pour m'avoir donné de précieux conseils. Un gros merci aussi à ma famille. Aussi, je voudrais remercier tout le groupe de Technologie Microbienne et plus particulièrement Denis Bourque et Martin Lafrance pour leur support technique. Qu'aurais-je fait sans eux ? Un autre merci à tout le monde du secteur de Bioingénierie. Merci à Sylvie et à Ginette de la bibliothèque de l'IRB ainsi qu'à l'ICIST, à Ottawa. À l'IAF, je voudrais remercier tout le personnel enseignant du CRMA pour la formation reçue, de même que le personnel de la bibliothèque de l'IAF ainsi que Robert Alain pour la microscopie électronique (du bon travail!). Merci à toute la promotion de 1992 en microbiologie appliquée. Merci à Deval Concept, pour la photographie. Finalement, je voudrais remercier le Conseil National de Recherches du Canada (CNRC) et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) pour l'aide financière tout au long de mes études de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

Admirant, J. D., Vos, C., Beukers, R., Meltzer, J. et Tempel, A. (1972). MYC 8005, an antibiotic against spider mites: Description of the producing organism (*Streptomyces exfoliatus* var. *echinosporus* var. *nov.*) and properties of the antibiotic. Netherland Journal of Plant Pathology. **78**: 1-14.

Anderson, A. J. et Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiological Review. **54**: 450-472.

Andrews, B. A. et Asenjo, J. A. (1987). Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. Trends in Biotechnology. **5**: 273-277.

Anon (1987). Biodegradables could ease landfill, litter problems. Journal of the Water Pollution Control Federation. **61**: 138-140.

Anon (1990a). McDonald's dumps clamshells. Environmental Digest. **1**: 1.

Anon (1990b). Lytic peptides: a magic bullet. Biotechnology News. January 11th 1990. page 8

Anthony, C. (1991). "Assimilation of carbon by methylotrophs" dans I. Goldberg and J. S. Rokem (Ed.): Biology of methylotrophs. Boston, Butterworth-Heinemann. pages 79-110.

Aoki, K., Hatakeyama, S., Shinke, R. et Nishira, H. (1985). Lytic enzyme towards aniline-assimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13: screening and production. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**: 2003-2009.

Baldwin, C. et Robinson, C. W. (1990). Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* using enzymatic lysis combined with high-pressure homogenization. *Biotechnology Techniques* **4**: 329-334.

Baptist, J. N. (1962). Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. US Patent 3036959.

Berger, É., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C. et Braunegg, G. (1989). PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques* **3**: 227-232.

Bourque, D. (1992). Institut de Recherche en Biotechnologie. Communication personnelle.

Bourque, D., Ouellette, B., André, G. et Groleau, D. (1992a). Production of poly- β -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **37**: 7-12.

Bourque, D., Pomerleau, Y. et Groleau, D. (1992b). High cell density of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: Production of high molecular weight PHB. En préparation.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. dans A. Fiechter (Ed.): *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 41, New York, Springer Verlag. pages 77-94.

Byrom, D. (1991). "Miscellaneous biomaterials" dans D. Byrom (Ed.): *Biomaterials: novel materials from biological sources*. New York, Stockton Press. pages 333-359.

Cheremismoff, N. P. et Cheremismoff, P. N. (1989). Special Report: the plastic waste problem. *Pollution Engineering* 21: 58-67.

Coleman, R. (1990). Biodegradable plastics from potato waste double savings to environment. *Agricultural Engineering*. 71: 20-22.

Cross, T. (1989). "Other Genera." dans S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins. pages 2586-2615.

Dawes, E. A. (1988). Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Bioscience Reports* 8: 537-547.

Doi, Y. (1990). *Microbial Polyesters*. New York, VCH Publishers, Inc. 156 pages.

Evans, J. E. et Sikdar, S. K. (1990). Biodegradable plastics: an idea whose time has come? *Chemtech*. January 1990. pages 38-42.

Hamada, S., Torii, M., Masuda, N., Ooshima, Yokogawa, K. et Kawata, S. (1978). Lysis of *Streptococcus mutans* cells with mutanolysin, a lytic enzyme prepared from a culture liquor of *Streptomyces globisporus* 1829. *Archives of Oral Biology* 23: 543-549.

Harrigan, W. F. et McCance, M. E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. New York, Academic Press. 452 pages.

Harrison, S. T. L., Chase, H. A. et Dennis, J. S. (1991). The lysis of gram-negative *Alcaligenes eutrophus* by enzymes from *Cytophaga*. *Biotechnology Techniques* 5: 115-120.

Hayashi, K., Kasumi, T., Kubo, N. et Tsumura, N. (1981). Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 2289-2300.

Holmes, P. A. (1988). "Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers" dans D. C. Bassett (Ed.): *Developments in crystalline polymers*. London, Elsevier Applied Science Publishers. pages 1-65.

Holmes, P. A. et Lim, G. B. (1988). Separation process for a 3-hydroxybutyrate polymer. European Patent Application 0 145 233.

Huang, J. C., Shetty, A. S. et Wang, M. S. (1990). Biodegradable plastics: a review. *Advances in Polymer Technology* 10: 23-30.

Huisman, G. W., DeLeeuw, O., Eggink, G. et Witholt, B. (1989). Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1949-1954.

Imai, S., Shimazu, A., Furihata, K., Furihata, K., Hayakawa, Y. et Seto, H. (1990). Isolation of a new phenoxazine antibiotic, exfoliazine, produced by *Streptomyces exfoliatus*. *The Journal of Antibiotics* 43: 1606-1607.

Ishizaki, A. et Tanaka, K. (1991). Production of poly- β -hydroxybutyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71: 254-257.

Iwamoto, T., Nakaya, T., Inaoka, M. et Naka, H. (1983). Induction of β -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine by *Streptomyces* sp. *Journal of Fermentation and Technology* 61: 499-503.

Jensen, T. E. et Corpe, W. A. (1991). "Ultrastructure of methylotrophic microorganisms" dans I. Goldberg and J. S. Rokem (Ed.): *Biology of methylotrophs*. Boston, Butterworth-Heinemann. pages 39-75.

Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J. et Phaff, H. J. (1978). Simple method

for the isolation of astaxanthine from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodomyza*. Applied and Environmental Microbiology 35: 1155-1159.

Johnson, R. (1988). An overview of degradable plastics. Journal of Plastic Film & Sheeting 4: 155-170.

Jones, K.L., 1949, Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. Journal of Bacteriology 57: 141-145.

Kawata, S., Takahashi, E., Takase, Y. et Yokogawa, K. (1983a). Characterisation of D-alanyl-(D)-*meso*-2,6-diaminopimelic acid endopeptidase from *Streptomyces globisporus* 1829. Agricultural and Biological Chemistry 47: 2801-2808.

Kawata, S., Takemura, T., Takase, Y. et Yokogawa, K. (1984). Purification and characterisation of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase from *Streptomyces globisporus* 1829. Agricultural and Biological Chemistry 48: 261-269.

Kawata, S., Takemura, T. et Yokogawa, K. (1983b). Characterisation of two N-acetylmuramidases from *Streptomyces globisporus* 1829. Agricultural and Biological Chemistry 47: 1501-1508.

Klemchuk, P. P. (1990). Degradable plastics: a critical review. Polymer Degradation and Stability 27: 183-202.

Kneifel, H., König, W. A., Wolf, G. . et Zähler, H. (1974). Metabolic products of microorganisms 123, thraustomycin, a new antifungal nucleoside antibiotic from *Streptomyces exfoliatus*. The Journal of Antibiotics **27**: 20-27.

Lafferty, R. M., Korsatko, B. et Korsatko, W. (1988). "Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid" dans H. J. Rehm (Ed.): Biotechnology Vol. 6b. New York, VCH Editor. pages 135-176.

Lam, K. S. et GrootWassink, J. W. D. (1990). Enzymatic digestion of spent yeast cells for nutrient recycling in inulase production. Journal of Industrial Microbiology **6**: 207-210.

Lestage, L. (1990). L'environnement, une priorité du SPI. Le Novateur. **7**: 6-7.

Limbach, B. (1990). Plastics and the environment: progress and commitment. Washington, D.C., Society of the Plastic Industry, Inc. 97 pages.

Locci, R. (1989). "Streptomyces and related genera" dans S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Ed.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins. pages 2451-2508.

Lubitz, W. (1991). Procedure for releasing poly-3-hydroxycarboxylic acids from Gram- negative bacteria using a bacteriophage lysis gene. European Patent Application 435 028.

Marchessault, R. H., Bluhm, T. L., Deslandes, Y., Hamer, G.K., Orts, W.J., Taylor, M.G., Bloembergen, S. et Holden, D.A. (1988). Poly(β -hydroxy-alkanoates) : biorefinery polymers in search of applications. *Die Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia* **19**: 235-254.

Nyström, T. et Kjelleberg, S. (1989). Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phase of starvation. *Journal of General Microbiology* **135**: 1599-1606.

Page, W.J. (1992). University of Alberta. Communication personnelle.

Peczynska-Czoch, W. et Mordarski, M. (1988). "Actinomycetes enzymes" dans M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski (Ed.): *Actinomycetes in biotechnology*. New York, Academic Press. pages 219-283.

Pitt, C. G. (1990). "Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers" dans M. Chasin and R. Langer (Ed.): *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York, M. Dekker Pub. pages 71-120.

Potts, J. E. (1984). "Plastics, environmentally degradable" dans Mark, H.F., Othmer, D.F., Overberger, C.G., Seaborg, G.T.(Ed.): *Encyclopedia of Chemical Technology, Supplemental Volume*. New York, John Wiley. Third ed. pages 626-668.

Ramsay, J., Ramsay, B., Normandin, D., Chavarie, C. et Braunegg, G. (1991). *Les plastiques biodégradables*. *Interface*. Janv.-Fév. 1991. pages 11-15.

Ramsay, J. A., Berger, É., Ramsay, B. A. et Chavarie, C. (1990). Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques* 4: 221-226.

Ramsay, B.A. (1993). École Polytechnique de Montréal. Communication personnelle.

Rankin, S. (1987). Plastic wastes are not harmful. *Waste Age*. 18: 113-118.

Reisch, M. (1990). McDonald's to drop polystyrene packaging. *Chemistry and Engineering News*. November 12. pages 5-6.

Robey, M. J., Field, G. et Styzinski, M. (1989). Degradable plastics. *Materials Forum* 13: 1-10.

Rogers, H. J., Perkins, H. R. et Ward, J. B. (1980). *Microbial cell walls and membranes*. London, Chapman and Hall. 564 pages.

Savel'ev, E. P., Petrov, G. I., Shmakova, Z. F. et Bitko, S. A. (1980). Isolation and characterization of endo-N-acetylmuramidase produced by *Actinomyces levoris*. *Biokhimiya* 45: 329-336.

Schaal, K. P. (1985). "Identification of clinically significant Actinomycetes and related bacteria using chemical techniques" dans M. Goodfellow and D. E. Minnikin (Ed.): *Chemical methods in bacterial systematics*. New York, Academic Press. pages 359-381.

Scott, G. (1989). Degradable plastics come of age. *Polymer News* **14**: 169-176.

Shimotsu, H., Takahashi, H. et Saito, H. (1980). Site-specific endonucleases in *Streptomyces* strains. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**: 1665-1666.

Shirling, E. B. et Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16**: 313-340.

Siegele, D. A. et Kolter, R. (1992). Life after log. *Journal of Bacteriology* **174**: 345-348.

Slater, S. C., Voige, W. H. et Dennis, D. E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* **170**: 4431-4436.

Sleyter, U. B., Messner, P., Minnikin, D. E., Heckels, J. E., Virji, M. et Rusell, R. B. B. (1988). "Structure of bacteria and their envelopes" dans I. Hancock and I. Poxton (Ed.): *Bacterial cell surface techniques*. Toronto, John Wiley and Sons. pages 1-30.

Steinbuchel, A. et Schlegel, H. G. (1991). Physiology and molecular genetics of poly-(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Microbiology* **5**: 535-542.

Suzuki, K., Uyeda, M. et Shibata, M. (1985a). *Serratia*-lytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. strain No. 177. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**: 3049-3050.

Suzuki, K., Uyeda, M. et Shibata, M. (1985b). *Serratia marcescens*-lytic enzyme from *Micromonospora* sp. strain No. 152. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**: 1719-1726.

Suzuki, T., Yamane, T. et Shimizu, S. (1986a). Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**: 366-369.

Suzuki, T., Yamane, T. et Shimizu, S. (1986b). Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**: 322-329.

Tanahashi, N. et Doi, Y. (1991). Thermal properties and stereoregularity of poly(3-hydroxybutyrate) prepared from optically active β -butyrolactone with a zinc based catalyst. *Macromolecules* **24**: 5732-5733.

Thayer, A. M. (1989). Solid waste concerns spur plastic recycling efforts. *Chemistry and Engineering News*. January 30. pages 7-15

Thwaites, J. J. et Surana, U. C. (1991). Mechanical properties of *Bacillus subtilis* cell walls: effects of removing residual culture medium. *Journal of Bacteriology* **173**: 197-203.

Timm, A., Byrom, D. et Steinbuchel, A. (1990). Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**: 296-301.

Tipper, D. J. (1987). "Mode of action of β -lactam antibiotics" dans D. J. Tipper (Ed.): *Antibiotics inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis*. New York, Pergamon. pages 133-170.

Toennies, G. et Gallant, D. (1949). The relation between photometric turbidity and bacterial concentration (bacterimetric studies IV). *Growth* **13**: 7-20.

Tremblay, E. (1991). Étude de la régulation du régulon xylanolytique de *Streptomyces lividans*. Institut Armand-Frappier. M. Sc.

Tuomanen, E., Markiewicz, Z. et Tomasz, A. (1988). Autolysis-resistant peptidoglycan of anomalous composition in amino-acid-starved *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**: 1373-1376.

Uttley, N. (1985). Biopol: one of nature's polymers. *Manufacturing Chemist*. October 1985. pages 63-65

Voss, D. (1989). Plastic recycling: New bottles for old. *Chemical Engineering Progress*. October 1989. pages 67-72.

Wood, A. (1990). Plastics: can more be made into less ? *Chemical Week*.

May 2 1990. pages 36-40.

Yokogawa, K., Kawata, S. et Yoshimura, Y. (1976). Purification and properties of a lytic enzyme from *Streptomyces griseus* H-402. *Agricultural and Biological Chemistry* **40**: 661-667.