

Université de Montréal

**Effets de mutations dans le gène *ldhA* et dans la protéine FhIA
ainsi que de la limitation en glucose ou en soufre sur la production
d'hydrogène chez *Escherichia coli***

Par Jonathan Turcot

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.sc.)
en microbiologie et immunologie

Avril 2005

© Jonathan Turcot, 2005



W

4

U58

2005

v. 132

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets de mutations dans le gène *ldhA* et dans la protéine FhlA
ainsi que de la limitation en glucose ou en soufre sur la production
d'hydrogène chez *Escherichia coli***

Présenté par :
Jonathan Turcot

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. Szatmari

Directeur de recherche : Dr. Patrick C. Hallenbeck

Membre du jury : Dr. Drolet

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

La production de biohydrogène chez l'entérobactérie *Escherichia coli* se fait en condition anaérobie par la fermentation acides mixtes en absence d'un accepteur d'électron alternatif comme l'azote. Le rendement de production est cependant très bas. Cette production se fait à l'aide du complexe formiate hydrogène lyase qui est composé de la formiate déshydrogénase, de transporteurs d'électrons et de l'hydrogénase 3. Ce complexe a besoin de formiate et d'un activateur transcriptionnel qui est la protéine FhlA. Cependant, en plus de produire de l'hydrogène par l'hydrogénase 3, la cellule contient deux autres hydrogénases (1 et 2) qui elles, consomment de l'hydrogène. De plus, il n'y a pas seulement par l'hydrogénase 1 et 2 que la cellule perd de l'hydrogène mais également lors de la formation de lactate par la lactate déshydrogénase (*ldhA*).

Mon projet de maîtrise consiste donc à étudier les effets de mutations sur le gène *ldhA* le rendant inactif et sur le gène *fhlA* rendant la protéine FhlA indépendante du formiate et du molybdène. Il consiste également à étudier les effets d'une limitation en glucose ou en soufre sur le métabolisme de la bactérie dans le but d'améliorer les rendements de conversion du glucose en biohydrogène. Nous avons utilisé une souche d'*Escherichia coli* où les hydrogénases 1 et 2 avaient été inactivées afin de minimiser les pertes d'hydrogènes. Nous avons réussi à obtenir une meilleure production d'hydrogène lorsque le gène *ldhA* était inactivé et ce lorsque la croissance s'effectuait si bien en lot et qu'en continu. La mutation sur FhlA a également eu un effet positif en améliorant la production d'hydrogène. En ce qui concerne la limitation du glucose et du soufre la production d'hydrogène et le rendement, nous nous sommes aperçu que le glucose avait un effet positif tandis que le soufre ne semblait pas jouer un rôle particulier. Nous avons également essayé d'exprimer l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum* afin d'avoir une plus grande production d'hydrogène par la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3). Cependant, aucune augmentation ne fût notée.

Mots clés : Biohydrogène, fermentation, pyruvate formiate lyase, hydrogénase, lactate déshydrogénase.

ABSTRACT

Under anaerobic conditions and in the absence of alternative terminal electron acceptors, such as nitrate, the enterobacterium *Escherichia coli* produces biohydrogen by mixed acid fermentation. However, the production yield of hydrogen is low. Hydrogen is produced by the formate hydrogenlyase complex which includes formate dehydrogenase, electron carriers and hydrogenase 3. The synthesis and activity of this complex requires formate, formed by the action of pyruvate formate lyase and the transcriptional activator protein FhlA. Cell yields of hydrogen might be lowered by the uptake hydrogenase activity of hydrogenases 1 and 2 and by the formation of lactate from pyruvate by lactate dehydrogenase.

The goal of the research reported here was to determine some of the limiting factors for the production of hydrogen. The effect of the inactivation of *ldhA* (coding for lactate dehydrogenase) and the effect of a mutated FhlA protein, which results in formate independent expression of the *hyc* operon, were examined. The effects of glucose or sulfate limitation on hydrogen production were also studied. As might be expected, strains in which uptake hydrogenases 1 and 2 were inactivated showed greater hydrogen production. As also might be expected, there was increased hydrogen production when *ldhA* was inactivated. The presence of the mutated allele of *fhlA* also had a positive effect on hydrogen production. The production yield was better when the cells were grown in media which contained a low level of glucose whereas a limitation in sulfate had no particular effect on hydrogen production.

In an effort to increase hydrogen yields, the heterologous expression of hydrogenase from *Clostridium pasterianum* was attempted. Unfortunately the hydrogenase wasn't functional in *Escherichia coli* BL21 and a higher hydrogen production was not observed.

Key words : biohydrogen, fermentation, pyruvate formate lyase, hydrogenase, lactate dehydrogenase.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des Tableaux	ix
Liste des Figures	x
Liste des Abréviations	xiii
CHAPITRE I – REVUE DE LITTÉRATURE	15
1. LE BIOHYDROGÈNE	16
1.1 DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRODUCTION	16
1.1.1 Biophotolyse directe	16
1.1.2 Biophotolyse indirecte	17
1.1.3 Photofermentation	17
1.1.4 Fermentation	18
1.2 DIFFÉRENTS TYPES DE FERMENTATION	19
1.2.1 Fermentation acides mixtes chez <i>Escherichia coli</i>	19
1.3 HYDROGÉNASES	21
1.3.1 Les hydrogénases NiFe et Fe	21
1.4 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE PAR <i>E. COLI</i>	22
1.4.1 Régulation de la pyruvate formiate lyase	23
1.4.2 Complexe formiate hydrogène lyase (FHL)	23
1.4.2.1 Régulation de l'activité du complexe formiate hydrogène lyase	24
1.4.2.1.1 Le gène <i>fdhF</i> ainsi que son produit, la formiate déshydrogénase (FDH)	25
1.4.2.1.2 L'opéron <i>hyc</i> et l'hydrogénase 3	26
1.4.2.1.3 L'opéron <i>hyp</i> et le locus <i>hydA</i>	27
1.4.3 La protéine FhlA	28
1.4.3.1 FhlA indépendante du formiate	29
1.4.4 L'hydrogénase 4	29
1.4.4.1 Les protéines de l'hydrogénase 4	31

1.4.5 Les hydrogénase 1 et 2	32
1.4.5.1 La régulation des hydrogénases 1 et 2	33
1.4.6 La lactate déshydrogénase	34
1.5 LES CONDITIONS DE CROISSANCE	35
1.5.1 Limitation en nutriments	35
1.6 PROJET DE RECHERCHE	37
CHAPITRE II – PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	38
2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES PLASMIDES ET PHAGE UTILISÉS	39
2.2 MILIEUX DE CULTURE	40
2.2.1 Milieu Luria-Bertani (LB)	40
2.2.2 Milieu minimal M9	41
2.2.3 Milieu Minimal M9 + MES	41
2.2.4 Milieu Minimal M9 + HEPES	41
2.2.5 Milieu R-top	41
2.3 ANTIBIOTIQUES	42
2.3.1 Chloramphénicol	42
2.3.2 Tétracycline	42
2.3.3 Kanamycine	42
2.3.4 Ampicilline	42
2.4 TAMPONS	43
2.4.1 MES	43
2.4.2 Sodium HEPES	43
2.4.3 Tampon MC	43
2.4.4 Tampon citrate 0.1M	43
2.5 MÉTHODES DE MANIPULATION DE L'ADN	44
2.5.1 Extraction plasmidique par lyse alcaline	44
2.5.2 Cellules compétentes et transformation	45
2.5.2.1 Préparation de cellules thermocompétentes congelées	45
2.5.2.2 Cellules thermocompétentes fraîches	45

2.5.2.3 Transformation chimique	46
2.5.2.4 Électroporation	46
2.5.3 Amplification d'ADN par PCR	46
2.5.4 Digestion par enzymes de restriction	47
2.5.5 Extraction de l'ADN d'un gel d'agarose	47
2.5.6 Ligation	47
2.6 TRANSDUCTION	48
2.6.1 Préparation du lysat phagique	48
2.6.2 La Transduction	48
2.7 MÉTHODES DE CROISSANCE DES SOUCHES	49
2.7.1 Croissance anaérobie en lot («Batch»)	49
2.7.2 Croissance anaérobie en continu à l'aide d'un biofermenteur («Chemostat»)	50
2.8 MÉTHODE D'ANALYSE DE LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE	50
2.8.1 Étude par chromatographie en phase gazeuse	50
2.9 MÉTHODE D'ANALYSE DES PRODUITS DE FERMENTATION	51
2.9.1 Étude par HPLC	51
2.10 SPECTROPHOTOMÉTRIE	52
2.11 DOSAGE DE GLUCOSE	52
CHAPITRE III – RÉSULTATS	53
3.1 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'<i>ESCHERICHIA COLI</i> EN CROISSANCE EN LOTS	54
3.1.1 Comparaison de la production de biohydrogène entre la souche BW545 et JW135 et les mutants dérivés	54
3.1.2 Production de biohydrogène des différentes souches mutantes	55
3.1.2.1 Mutation dans le gène <i>ldhA</i>	55
3.1.2.2 La protéine FhlA mutée	57
3.1.2.3 La double mutation (<i>ldhA</i> et FhlA)	58

3.2 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'<i>ESCHERICHIA COLI</i> EN CONDITIONS LIMITANTES DE GLUCOSE	59
3.2.1 Concentration de glucose limitante pour la croissance	59
3.2.2 Production de biohydrogène en condition limitante de glucose	61
3.2.3 Rendement de conversion du glucose en hydrogène	62
3.3 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'<i>ESCHERICHIA COLI</i> EN CONDITIONS LIMITANTES DE SOUFRE	64
3.3.1 Concentration de soufre limitante pour la croissance	64
3.3.2 Production de biohydrogène en condition limitante de soufre	65
3.3.3 Rendement de conversion du glucose en hydrogène	67
3.4 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'<i>ESCHERICHIA COLI</i> EN CROISSANCE EN CONTINU	69
3.4.1 La limitation en glucose	69
3.4.2 La limitation en soufre	70
3.4.3 Synthèse de la production d'hydrogène et du rendement de conversion	71
3.5 HYDROGÉNASE I DE <i>CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM</i>	72
3.5.1 Clonage de l'hydrogénase I de <i>Clostridium pasteurianum</i>	72
CHAPITRE IV – DISCUSSION	74
CONCLUSION	83
BIBLIOGRAPHIE	84
ANNEXE	94
REMERCIEMENTS	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Gènes et enzymes entrant dans la fermentation acides mixtes chez <i>Escherichia coli</i>	20
Tableau II : Quelques mécanismes d'adaptation des bactéries aux manques de nutriments	36
Tableau III : Description des différentes souches utilisées lors des expériences	39
Tableau IV : Description des plasmides ainsi que du phage utilisés au cours des expériences	40
Tableau V : Description des amorces utilisées lors des réactions PCR	47
Tableau VI : Comparaison de la quantité d'hydrogène produite, exprimée en μmol , par la souche d' <i>Escherichia coli</i> sauvage BW545 et la souche mutée JW135	54
Tableau VII : Production d'hydrogène et rendement de conversion pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 en conditions limitantes de glucose pour différentes dilutions	70
Tableau VIII : Production d'hydrogène et rendement de conversion pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 en conditions limitantes de soufre pour différentes dilutions	70
Tableau IX : Comparaison de la production (exprimé en μmol) et du rendement (moles par mole de glucose) pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 dans des conditions limitantes pour le glucose (44 μmol) et le soufre (0,05%) pour les études en « batch » et à l'aide d'un fermenteur	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Schématisation de la biophotolyse indirecte	17
Figure 2 :	Fermentation acides mixtes	22
Figure 3 :	Modèle de l'arrangement du complexe formiate hydrogène lyase proposé par Sauter et al. 1992	28
Figure 4 :	Représentation d'une hydrogénase NiFe	30
Figure 5 :	Modèle de l'arrangement du complexe formiate hydrogène lyase formé de l'hydrogénase 4 proposé par Andrews et al.	32
Figure 6 :	Comparaison par HPLC des différents produits de fermentation (acétate, lactate, formiate, succinate et éthanol) exprimé en grammes pour les souches JW135, BW545, LJT135 et LJT545	56
Figure 7 :	Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d' <i>Escherichia coli</i> BW545, JW135, LJT135 et LJT545	56
Figure 8 :	Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d' <i>Escherichia coli</i> BW545, JW135, FJT135 et FJT545	58
Figure 9 :	Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d' <i>Escherichia coli</i> BW545, JW135, DJT135 et DJT545	59
Figure 10 :	Comparaison de la densité optique (DO_{600}) pour les souches d' <i>Escherichia coli</i> JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose	60

- Figure 11 :** Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimé en μmol) pour les 4 souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose 61
- Figure 12 :** Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimé en μmol) pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose 62
- Figure 13 :** Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 pour des quantités de glucose variant de 2,25 à 176 μmol 63
- Figure 14 :** Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 pour des quantités de glucose variant de 2,25 à 176 μmol 63
- Figure 15 :** Comparaison des densités optiques à une longueur d'onde de 600nm pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre 65
- Figure 16 :** Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimé en μmol) pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre 66
- Figure 17 :** Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimé en μmol) pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre 66
- Figure 18 :** Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 pour des quantités de soufre variant de 0,005 à 0,09% 67

- Figure 19 :** Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 pour des quantités de soufre variant de 0,005 à 0,09% 68
- Figure 20 :** PCR de l'hydrogénase 1 de *Clostridium pasteurianum* 72
- Figure 21 :** Analyse de restriction sur le plasmide PJT2 digéré par les enzymes NcoI et BamHI 73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degré Celsius
A : adénine
Å : angström
Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A
Ap : ampicilline
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ADN : acide désoxyribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
C : cytosine
Cm : chloramphénicol
cm : centimètre
DO : densité optique
G : guanine
g : gramme
H : heure
kDa : kilodalton
Km : kanamycine
L : litre
M : molaire
mA : milliampère
min : minute
mL : millilitre
mm : millimètre
mmol : millimole
nm : nanomètre
nmol : nanomole
pH : puissance hydrogène
PCR : polymérase chain reaction
rpm : rotations par minute
s : seconde
SDS : sodium dodécyl sulfate
T : tyrosine

Tet : tétracycline

µg : microgramme

µL : microlitre

µmol : micromole

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

1. LE BIOHYDROGÈNE

La dépendance de combustibles fossiles non renouvelables comme source d'énergie primaire peut engendrer plusieurs problèmes dus à la pollution dégagée lors de la combustion. Des problèmes comme la dégradation de l'environnement, les changements climatiques ou même la santé de la population peuvent être envisageables. L'hydrogène s'avère donc ici un bon moyen de recharge puisqu'il propose de l'énergie propre et renouvelable. L'hydrogène peut en effet être produit par différents procédés déjà exploités, comme l'électrolyse de l'eau, ou par des procédés biologiques nous donnant ainsi le biohydrogène. De plus, les systèmes de production de biohydrogène par des procédés biologiques peuvent être multiples (biophotolyse directe, biophotolyse indirecte, photofermentation et par fermentation). Dépendamment du microorganisme et de la technique utilisée, nous aurons droit à des rendements différents. (Mertens et al. 2004).

1.1 DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRODUCTION

1.1.1 Biophotolyse directe

La production d'hydrogène par la biophotolyse directe consiste à convertir un substrat, qui est ici l'eau, en hydrogène et en oxygène en utilisant la lumière selon l'équation suivante : $2 \text{H}_2\text{O} + \text{lumière} \rightarrow 2 \text{H}_2 + \text{O}_2$. Cette méthode de production est effectuée par les algues vertes, comme les *Chlamydomonas*, en anaérobie. Les hydrogénases combinent donc les protons présents dans le milieu avec les électrons venant de la ferredoxine réduite pour former et relâcher dans le milieu de l'hydrogène (H_2). Donc, le procédé consiste en l'absorption de la lumière par le photosystème II qui va générer des électrons qui vont être transférés à la ferredoxine en utilisant l'énergie lumineuse absorbée par le photosystème I. Une hydrogénase réversible va donc accepter les électrons directement de la ferredoxine pour générer de l'hydrogène (H_2) (Levin et al. 2004, Hallenbeck et Benemann. 2002).

Cette méthode possède par contre deux contraintes majeures qui sont la basse efficacité de la conversion de la lumière solaire par les photosystèmes et le prix élevé d'un biofermenteur adéquat (Levin et al. 2004).

1.1.2 Biophotolyse indirecte

Les cyanobactéries, également appelées algues bleues-vertes, peuvent synthétiser de l'hydrogène via la biophotolyse indirecte en deux étapes qui impliquent des réactions séparées en présence ou en absence d'oxygène couplées à une fixation de dioxyde de carbone (CO_2) comme le montre la **figure 1** (Levin et al. 2004; Hallenbeck et al. 2002).

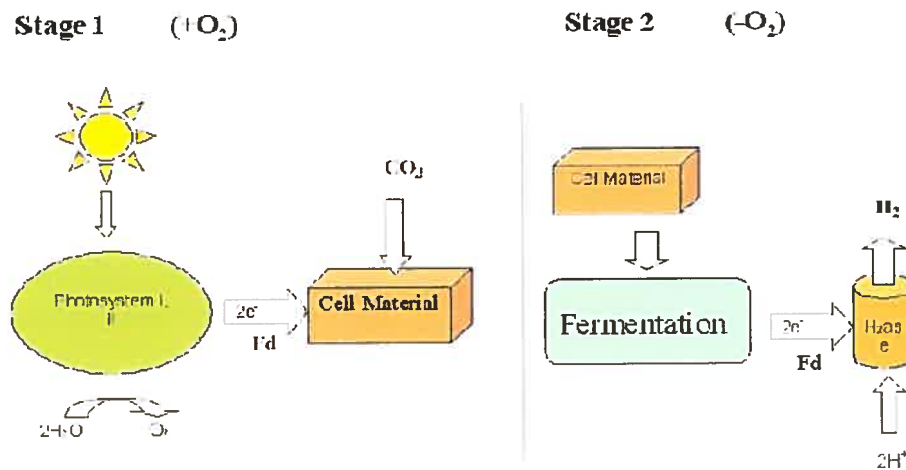


Figure 1 : Schématisation de la biophotolyse indirecte

1.1.3 Photofermentation

Les bactéries pourpres non-sulfureuses comme *Rhodobacter sp.* produisent de l'hydrogène (H_2) par la nitrogénase en condition déficiente d'azote en utilisant de la lumière. Donc ces bactéries photohétérotrophes ont le potentiel de convertir l'énergie lumineuse en hydrogène (H_2) en utilisant des déchets organiques comme substrats. Généralement, le ratio de production d'hydrogène est plus élevé lorsque les bactéries sont fixées sur ou dans une matrice solide que lorsqu'elles sont libres.

Cependant, ce type de production comporte des inconvénients comme le fait d'utiliser la nitrogénase qui demande beaucoup d'énergie et la faible efficacité de conversion de la lumière solaire en hydrogène (Levin et al. 2004).

1.1.4 Fermentation

L'hydrogène peut être produit par fermentation par des microorganismes qui croissent sur un substrat riche en hydrate de carbone. La fermentation peut également se faire à partir de différents déchets organiques. La majorité de la production d'hydrogène vient du métabolisme anaérobie du pyruvate formé pendant le catabolisme de substrats comme le glucose. La dégradation du pyruvate est catalysée par l'enzyme PFL (pyruvate formate lyase) ou la PFOR (pyruvate ferredoxine oxydoréductase) (Knappe et al. 1969). Dans les deux systèmes, il y a production d'acétyl-CoA ainsi que de formiate ou d'une ferredoxine réduite, desquels l'hydrogène est dérivé. Les entérobactéries, comme *Escherichia coli*, produisent leur hydrogène par la dégradation du formiate. Cependant, cette production d'hydrogène est très basse ce qui laisse croire que les bactéries se concentrent sur la production de biomasse cellulaire plutôt que sur la production d'hydrogène (Levin et al. 2004, Hallenbeck et al. 2002).

L'hydrogène obtenu par fermentation consiste à éliminer l'étape photobiologique principalement chez les algues vertes et les cyanobactéries. Cette approche peut également se faire chez les bactéries anaérobies facultatives comme les entérobactéries. Tandis que la biophotolyse directe et indirecte donnait de l'hydrogène pur, ici avec cette fermentation nous avons un mélange de gaz. Cette fermentation produit de l'hydrogène (H_2) et du dioxyde de carbone (CO_2). Des études ont déjà démontrées chez les algues vertes et les cyanobactéries que du point de vue pratique, le fait de réduire la taille des bioréacteurs en faisant la fermentation aiderait à trouver plusieurs nouvelles opportunités car les photobioréacteurs sont la principale limitation à la production d'hydrogène par biophotolyse (Levin et al. 2004, Hallenbeck et al. 2002).

1.2 DIFFÉRENTS TYPES DE FERMENTATION

La fermentation est un processus anaérobie qui génère de l'énergie et par lequel les molécules organiques servent à la fois de donneuses et d'acceptrices d'électrons. Il est important de mentionner que dépendamment du microorganisme et du milieu dans lequel il croît, y a plusieurs types de fermentation. Il y a la fermentation alcoolique qui consiste à fermenter les sucres en éthanol et en CO₂. Cette fermentation est souvent faite par les mycètes, quelques bactéries et par les algues. La fermentation lactique, où le pyruvate est réduit en lactate, est plus répandue que la fermentation alcoolique et est retrouvée chez certaines bactéries, algues et moisissures par exemple. Cette fermentation lactique est sous divisée en deux groupes, homolactique et hétérolactique. Les organismes homolactiques réduisent le pyruvate en lactate uniquement, alors que les organismes hétérolactiques vont produire, en plus du lactate, du CO₂ et de l'éthanol. En dernier lieu, il y a la fermentation formique, où le pyruvate est métabolisé en acide formique (formiate) et en d'autres substances. La fermentation formique est surtout spécifique à la famille des *Enterobacteriaceae*. La fermentation formique est également divisée en deux groupes; la fermentation butanodiolique, présente chez *Enterobacter*, *Serratia* et *Erwinia* et qui consiste en la transformation du pyruvate en acétone qui est ensuite réduit en 2,3-butanediol, ainsi que la fermentation acides mixtes qui aboutit à l'excrétion d'éthanol, et de plusieurs autres acides (formiate, succinate, acétate, lactate). De plus, des bactéries comme *Escherichia*, *Salmonella* et *Proteus* peuvent produire du CO₂ et de H₂ à partir de l'acide formique (Prescott et al. 1995).

1.2.1 La fermentation acides mixtes chez *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* est une entérobactérie anaérobie facultative qui vit naturellement dans l'intestin humain ou d'autres animaux. Elle peut également vivre en utilisant le sucre, par exemple le glucose, comme unique source de carbone. De plus, peu importe la voie utilisée (aérobie ou anaérobie) le glucose entre dans la cellule par le système phosphotransférase et est plus tard catabolisé en pyruvate (Clark, D. 1989). C'est à partir de ce moment que l'on distingue la différence entre la croissance en condition aérobie ou anaérobie en ce

qui concerne le métabolisme du pyruvate. En effet, à ce point, si la bactérie croît en présence d'oxygène, le NADH généré pendant la glycolyse et par le cycle de Krebs est réoxydé par la chaîne respiratoire (Ingledeew et al. 1984). Cependant, en absence d'O₂, le NADH produit par la glycolyse lors de l'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate doit être réoxydé en NAD⁺ afin que le cycle continu puisque si le NAD⁺ n'est pas régénéré, la glycolyse s'arrêtera (Prescott et al. 1995). Donc la solution à ce problème est le recyclage, par la fermentation acides mixtes, du NADH par la conversion du pyruvate en plusieurs produits de fermentation afin d'utiliser le pyruvate, ou un des dérivés, comme accepteurs d'électrons et d'hydrogène pour réoxyder le NADH. Le système de fermentation acides mixtes est donc un système complexe qui requiert plusieurs enzymes. Les principaux gènes codant pour les enzymes de la fermentation sont énumérés dans le **tableau I** (Les gènes codant pour les hydrogénases ne sont pas énumérés car ils seront traités dans les prochaines sections) (Clark, 1989).

Tableau I : Gènes et enzymes entrant dans la fermentation acides mixtes chez *Escherichia coli*

Gene	Fonction
<i>acd</i>	Activité de ACDH
<i>ackA</i>	Acétate kinase
<i>ackB</i>	Acétate kinase
<i>acs</i>	Acétyl-CoA synthetase
<i>adhB</i>	Niveau de ADH/ACDH
<i>adhC</i>	Promoteur de <i>adhE</i>
<i>adhE</i>	Gène structural ADH/ACDH
<i>adhR</i>	Régulation négative d' <i>adhE</i>
<i>ana</i>	Régulation d' <i>adhE</i>
<i>fdhF</i>	Formiate déshydrogénase du complexe formiate hydrogène lyase
<i>fnr</i>	Activateur de la respiration anaérobique
<i>frdABCD</i>	Réductase du fumarate
<i>fumB</i>	Fumarase B
<i>fumC</i>	Fumarase C
<i>ldhA</i>	Lactate déshydrogénase
<i>ldhB</i>	Lactate déshydrogénase
<i>mdh</i>	Malate déshydrogénase
<i>pfl</i>	Pyruvate formiate lyase
<i>ppc</i>	Phosphoénolpyruvate carboxylase
<i>pta</i>	phosphotransacétylase

1.3 HYDROGÉNASES

Afin de faire un lien entre la fermentation acides mixtes et la production de biohydrogène chez *Escherichia coli*, il est de mise d'exposer brièvement les protéines desquelles dérivent le biohydrogène; les hydrogénases. Les hydrogénases ont été découvertes en 1931 par Stephenson et Stickland dans les bactéries du colon (Stephenson et al. 1931). Actuellement, il a été démontré que les hydrogénases sont présentes dans divers microorganismes qui vont des bactéries aux protozoaires en passant par les archaea. Les hydrogénases sont les protéines desquelles dérivent le biohydrogène et peuvent être de différents types.

1.3.1 Les hydrogénases NiFe et Fe

Dans les sections qui suivent, l'entérobactérie *Escherichia coli* et sa production de biohydrogène par ses hydrogénases nickel-fer seront détaillées. Cependant, il n'existe pas uniquement des hydrogénases nickel-fer. En effet, il existe trois classes d'hydrogénases : les hydrogénases nickel-fer qui sont généralement impliquées dans la consommation de biohydrogène (mais également dans la production), les hydrogénases fer seulement qui sont bidirectionnelles mais généralement impliquées dans la production de biohydrogène et les hydrogénases sans métaux qui sont présentes chez les archaea méthanogéniques (Evans et al. 2003). De plus, les hydrogénases nickel-fer sont généralement associées à l'oxydation de l'hydrogène (donc à la consommation) alors que les hydrogénases à fer sont plutôt associées à la réduction des protons (Przybyla et al. 1992; Adams, 1990) La réduction réversible des protons en dihydrogène comme le montre l'équation suivante $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ est en fait une réaction bien simple, mais qui en pratique, requiert plusieurs étapes catalytiques. Le fonctionnement exact des centres métaux-soufre catalysant cette conversion est présentement étudié (Evans et al. 2003). Cependant, du point de vue structural, nous savons que les deux principaux types d'hydrogénases (fer et nickel-fer) contiennent des sites actifs qui sont incrustés très profondément dans la matrice protéique si bien que le transport de H^+/H_2 du ou vers ces centres se font dans des canaux spécifiques (Evans et al. 2003).

1.4 LA PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE PAR *E. COLI*

La production de biohydrogène chez *Escherichia coli* vient de la fermentation acides mixtes et des hydrogénases, mais plus précisément du gène *pfl* qui code pour la pyruvate formiate lyase. Cette pyruvate formiate lyase est la protéine qui agit en quelque sorte comme point tournant à la production de biohydrogène. Comme le montre la **figure 2** (représentation de la fermentation acides mixtes) la pyruvate formiate lyase prend le pyruvate afin de le convertir en acide formique et en acétyl-CoA (Knappe et al. 1976).

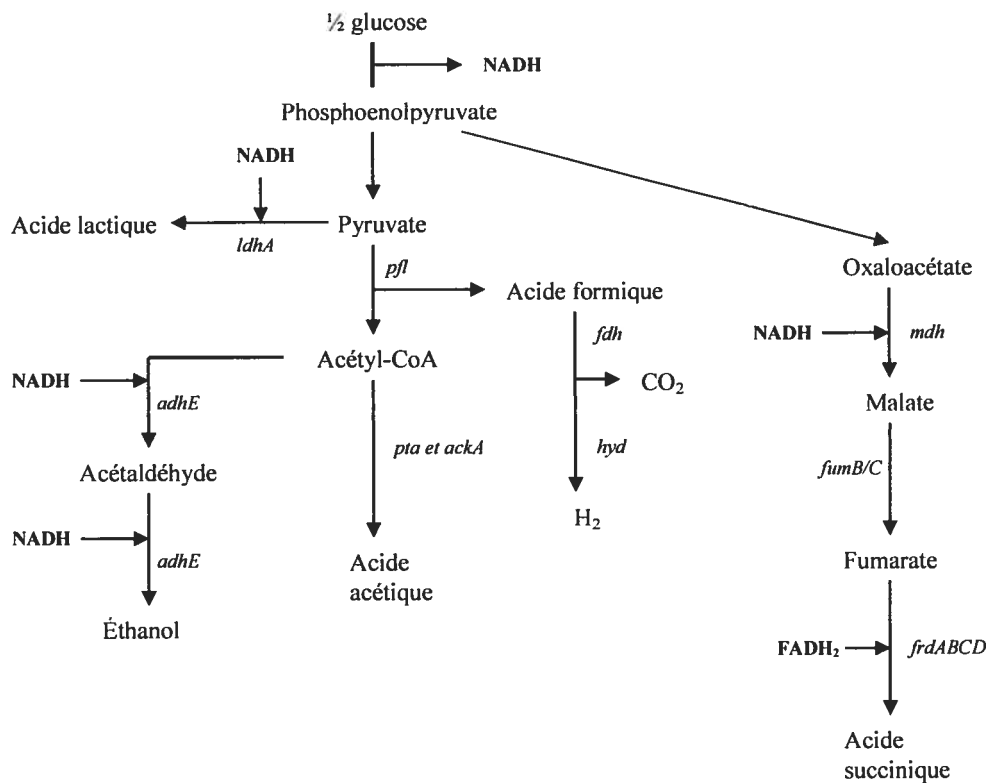


Figure 2 : Fermentation acides mixtes

La régulation de la pyruvate formiate lyase est très complexe. En effet, cette enzyme, même si présente en quantité modeste, est inactive en aérobie, mais lorsque la cellule se retrouve en anaérobie, la pyruvate formiate lyase passe de la forme inactive à la forme active par une succession de réactions complexes.

1.4.1 Régulation de la pyruvate formiate lyase

Nous savons qu'en condition aérobie, la cellule contient un faible niveau de pyruvate formiate lyase si bien qu'au moment de passer en anaérobie sur un milieu glucosé, la production de cette enzyme augmente d'un facteur de 10 et atteint même 2,7% de la quantité totale de protéines présentes dans le cytoplasme (Sawers et al. 1988). De plus, pour passer de sa forme inactive à sa forme active, la pyruvate formiate lyase doit subir une régulation post-traductionnelle qui requiert une enzyme activatrice. Ce système de conversion entre la forme inactive et la forme active est réversible (si les cellules repassent dans un milieu aérobie, la forme active redeviendra inactive) et est lié au clivage de l'adénylméthionine en méthionine et 5'-déoxyadénosine (Conradt et al. 1984; Clark, D.P. 1989). De plus, le gène *pfl*, qui est bien sûr induit en anaérobie, est sous le contrôle partiel de la protéine d'activation Fnr. On parle de contrôle partiel puisqu'il a été prouvé que même en l'absence de la protéine Fnr, il y a quand même présence de pyruvate formiate lyase, donc il y a expression du gène *pfl*. Ceci est dû aux multiples promoteurs situés en aval du gène *pfl*, ce qui suggère une régulation par plusieurs activateurs. De plus, il est bon de noter que la synthèse de la pyruvate formiate lyase est régulée au niveau de la transcription (Clark, D.P. 1989; Sawers et al. 1988).

1.4.2 Complexe formiate hydrogène lyase (FHL)

La pyruvate formiate lyase convertit, en anaérobie, le pyruvate en acétyl-CoA et en formiate (acide formique). Cependant, la transformation ne s'arrête pas à ce stade pour l'acide formique (voir **figure 2**). En effet, le formiate doit être clivé pour nous donner de l'hydrogène sous forme de H₂. C'est donc à ce point que la cellule produit le biohydrogène qui nous intéresse. Cependant, cette

méthode de production reste complexe. En effet, l'acide formique doit être clivé par un complexe enzymatique qui se nomme formiate hydrogène lyase (FHL). Autrement dit, la formiate hydrogène lyase va cliver le formiate pour donner du H₂ et du CO₂ (Ordal, E.J. 1939). Les gènes qui codent pour les protéines qui sont impliquées dans la formation ainsi que dans la maturation du complexe formiate hydrogène lyase sont organisés en quatre unités transcriptionnelles. Ces unités sont les opérons *hyc* et *hyp*, le gène *fdhF* ainsi que le locus *hydA* et tous forment ce que l'on appelle le régulon formiate. (Skibinski, D. 2002)

Côté protéines, ce complexe inclut la formiate déshydrogénase (FDH-H) qui est codée par le gène *fdhF*, l'hydrogénase 3 (HYD3) codée par l'opéron *hyc*, et des transporteurs intermédiaires d'électrons qui sont eux aussi codés par l'opéron *hyc* et qui sont responsables de l'oxydation de l'acide formique (HCOOH) en CO₂ et en H₂ (Self et al. 2001). De plus, le complexe formiate hydrogène lyase est sensible à l'oxygène et est transcrit uniquement en anaérobie et en absence d'autres accepteurs d'électrons terminaux (Self et al. 2000). Ce complexe est également induit par son substrat, l'acide formique, et par un environnement acide plutôt que basique (Clark, D.P. 1989). La transcription du gène *fdhF* (codant pour la formiate déshydrogénase) ainsi que l'opéron *hyc* (codant pour l'hydrogénase 3 et pour les transporteurs d'électrons) requièrent également un activateur transcriptionnel σ^{54} -dépendant qui se nomme FhlA (Schlensog et al. 1994).

1.4.2.1 Régulation de l'activité du complexe formiate hydrogène lyase

Il a été clairement démontré que le formiate jouait un rôle important dans la régulation de la formiate hydrogène lyase chez *Escherichia coli*. Le formiate permettant la régulation de ce complexe est présent dans la cellule principalement parce que la fermentation acides mixtes produit du formiate en plus des autres acides. Il est également possible de faire fonctionner ce complexe à l'aide d'acide formique venant d'une source externe, comme par exemple en ajoutant du formiate dans le milieu de croissance. Ce formiate venant de l'extérieur peut donc pénétrer dans la cellule via une formiate perméase (Rossmann et al. 1991).

Le pH est également un élément important de la régulation puisqu'en effet, une légère acidification du milieu permet l'induction du complexe (Rossmann et

al. 1991). Il est donc logique que la fermentation acides mixtes augmente l'activité du complexe formiate hydrogène lyase, puisque l'augmentation des produits de fermentation, les acides organiques, cause une baisse de pH en plus d'augmenter la concentration de formiate dans le cytoplasme. Cependant, un pH trop bas inhibe la production d'hydrogène.

L'acide formique interagit avec la protéine Fh1A qui elle va venir activer une série de gènes permettant la formation et la régulation de ce complexe (Self, W.T. 2001). Donc, dans tous les cas, que ce soit par fermentation acides mixtes ou par une source externe, le formiate est requis pour l'expression de gènes résultant en la synthèse et à la régulation du complexe formiate hydrogène lyase.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement du complexe formiate hydrogène lyase, il est de mise de détailler les différentes unités transcriptionnelles (les opérons *hyc* et *hyp*, le gène *fdhF* ainsi que le locus *hydA*).

1.4.2.1.1 Le gène *fdhF* ainsi que son produit, la formiate déshydrogénase (FDH)

Les formiates déshydrogénases, retrouvées chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, ont comme rôle de catalyser l'oxydation du pyruvate en CO₂ et H⁺ (Jormakka et al. 2003). L'entérobactérie *Escherichia coli* possède trois formiates déshydrogénases qui ont toutes des fonctions différentes. Il y a premièrement la FDH-N. Cette formiate déshydrogénase à nitrate fait partie de la chaîne respiratoire formiate-nitrate qui inclut une quinone, une nitrate réductase terminale et la formiate déshydrogénase (FHD-N). Cette enzyme est associée à la membrane et est présente en condition anaérobie lorsqu'il y a une source de nitrate. Deuxièmement, il y a la FDH-O dont la fonction est moins claire. Cependant, nous savons qu'elle catalyse l'oxydation du formiate (Sawers, 1994).

La dernière formiate déshydrogénase, la FDH-H (un polypeptide de 79 kDa), concerne la production de biohydrogène. Cette formiate déshydrogénase fait donc partie du complexe formiate hydrogène lyase et est une molybdoenzyme, c'est-à-dire que du molybdène est présent dans cette protéine (Self, et al. 2000). En plus de contenir à son site actif de la sélénocystéine (SeCys), du molybdène (Mo) et les deux cofacteurs MGD, on retrouve un centre fer-soufre dont le site actif a le rôle d'oxyder le formiate (Boyington, et al. 1997). Dans un même ordre

idées, il a été démontré que le molybdène (Mo) joue un rôle en ce qui concerne l'activité de la formiate hydrogène lyase, car celui-ci est nécessaire pour une transcription optimale de l'opéron *hyc* et du gène *fdhF*. Le molybdène serait transporté sous forme de molybdate par un transporteur de haute affinité codé par l'opéron *modABCD*. De plus, la protéine ModE, qui est un répresseur de l'opéron *modABC*, serait également un activateur transcriptionnel secondaire de l'opéron *hyc*. Donc ModE joue le rôle de détecteur de molybdate et de régulateur chez *Escherichia coli* en coordonnant le transport du molybdate (par l'opéron *modABC*) ainsi que la synthèse de molybdoenzymes. Il a également été démontré que la protéine MoeA fait également partie de la régulation de l'opéron *hyc* puisque les produits catalysés par MoeA, qui sont des formes actives de molybdate, agiraient sur l'activation et la régulation transcriptionnelle de cet opéron (Hasona et al. 1998; Self et al. 1999; Self et al. 2001; Self et al. 2000; Sawers, G. 1994).

Le pH joue un rôle important dans l'activité de la formiate déshydrogénase H. En effet, un pH en bas de 6 engendre une baisse d'activité de la FDH-H (Axley et al. 1990).

1.4.2.1.2 L'opéron *hyc* et l'hydrogénase 3

L'opéron *hyc* est un opéron de neuf gènes codant pour des produits requis pour la formation du système formiate hydrogène lyase (FHL) (Rossmann et al. 1991; Rossmann et al. 1994). Ces gènes sont nommés *hycA*, *hycB*, *hycC*, *hycD*, *hycE*, *hycF*, *hycG*, *hycH* et *hycI* (Sauter et al. 1992). Tous les gènes jouent un rôle dans le développement, la formation ou la fonction de l'hydrogénase 3 appelée aussi Hyd-3. Cette hydrogénase fait partie du complexe FHL et est responsable de la production d'hydrogène.

Cette protéine est très complexe puisqu'elle est constituée de plusieurs sous-unités. De plus, due à sa complexité, l'hydrogénase 3 est très labile. L'hydrogénase 3 est une protéine de la membrane périphérique et est située du côté cytoplasmique.

L'hydrogénase 3 est codée par plusieurs gènes. Premièrement, le gène *hycA* code pour un répresseur de l'opéron *hyc*. C'est donc le produit de ce gène qui a la possibilité de réprimer l'opéron au complet. La protéine HycA vient donc

interagir avec la protéine FhlA, qui elle est activatrice (Sauter et al. 1992). Pour ce qui est du gène *hycB*, il semblerait avoir la même fonction que *hycF* puisque tous les deux codent pour une petite sous-unité qui aurait une fonction dans le transfert des électrons à l'intérieur du complexe formiate hydrogène lyase. HycB ainsi que HycF sont des protéines membranaires (Sauter et al. 1992). Pour sa part *hycC* code, comme *hycD*, pour une protéine membranaire et son rôle, tout comme HycD, n'est pas encore clair (Sauter et al. 1992). Les gènes *hycE* et *hycG* vont de paire car ils codent respectivement pour la grosse et la petite sous-unité de l'hydrogénase (Bohm et al. 1990). La grosse sous-unité HycE de 65kDa est une protéine fer-soufre qui contient également du nickel. Dans certain cas, le nickel peut être remplacé par du zinc ou un autre métal. De son côté, *hycG* code pour la petite sous-unité. Une protéine hydrophile régulatrice est codée par *hycH* tandis que *hycI* code pour une protéase qui est requise pour la maturation de la grosse sous-unité de l'hydrogénase (Bagramyan et al. 2002; Sauter et al. 1992).

Le fonctionnement exact du transport des électrons dans l'hydrogénase 3 reste à être clarifié. En effet, il y a plusieurs études en cours qui cherchent à comprendre l'implication réelle de chaque sous-unité dans ce transport.

1.4.2.1.3 L'opéron *hyp* et le locus *hydA*

Pour commencer, l'opéron *hyp* fait partie du régulon formiate et il entre dans la formation et la régulation du grand complexe formiate hydrogène lyase (Leonhartsberger et al. 2000). Les produits des gènes *hypABCDEFG* de cet opéron jouent des rôles dans la maturation de l'hydrogénase 3 puisqu'ils sont nécessaires à l'incorporation du nickel dans la grande sous-unité (HycE) (Hube et al. 2002). Il faut savoir que HypB, HypD, HypE et HypF sont nécessaires à la synthèse des trois hydrogénases tandis que HypA et HypC le sont uniquement pour l'hydrogénase 3 (Jacobi et al. 1992). L'expression des gènes de l'opéron *hyp* dépend également du formiate et de la protéine activatrice FhlA.

En ce qui concerne le locus *hydA*, il est de mise de souligner son utilité dans le complexe formiate hydrogène lyase. En effet, ce locus consiste en un opéron de deux gènes, *hydN* et *hypF*, qui sont essentiels dans la maturation des trois hydrogénases. Comme mentionné auparavant, le produit du gène *hypF* joue un rôle dans l'incorporation du nickel dans la grande sous-unité de l'hydrogénase

3 tandis que le gène *hydN* code pour un transporteur d'électrons (Maier et al. 1996). La **figure 3** nous montre ce qui semble être l'arrangement du complexe formiate hydrogène lyase tel que nous le connaissons aujourd'hui.

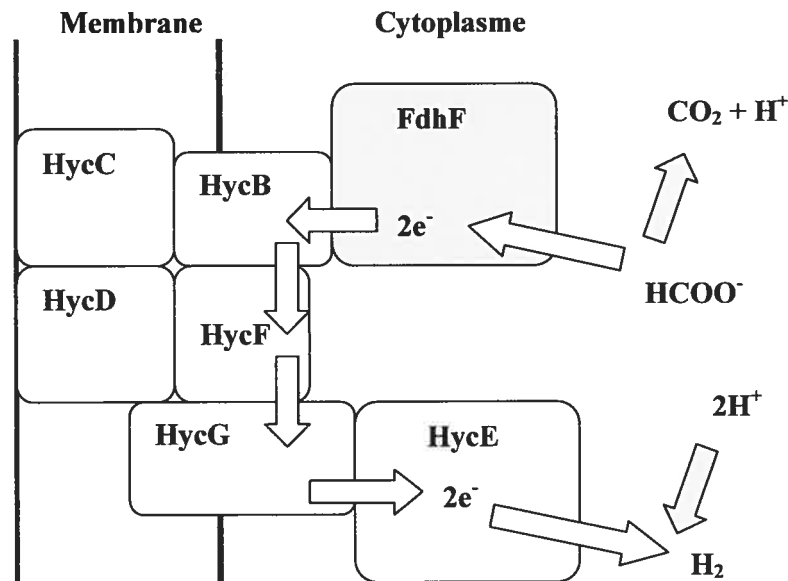


Figure 3: Modèle de l'arrangement du complexe formiate hydrogène lyase proposé par Sauter et al. 1992

1.4.3 La protéine FhIA

Les gènes codant pour le système formiate hydrogène lyase d'*Escherichia coli* sont transcrits grâce à la protéine activatrice FhIA (Schlensog et al. 1994). La protéine FhIA est codée à partir d'un gène de l'opéron *hyp* (Leonhartsberger et al. 2000; Schlensog et al. 1994) et a un poids moléculaire de 78kDa (Sankar et al. 1988). De plus, la protéine FhIA est autorégulée et sa structure possède trois domaines distincts qui sont en partie similaires à d'autres activateurs transcriptionnels présent chez d'autres espèces comme par exemple NifA de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* ainsi que des activateurs de la famille des NtrC d'*Escherichia coli*. (Maupin et al. 1990) Donc, pour revenir aux trois domaines distincts, il y a la partie C-terminale, la région centrale et la partie N-terminale et chacune jouent un rôle bien défini. En effet, la partie C-terminale contient un

motif hélice-tour-hélice qui constitue un domaine se liant à l'ADN. La partie centrale est responsable de l'interaction avec la forme σ^{54} de l'ARN polymérase lors de l'initiation de la transcription et la partie N-terminale contient une région qui module l'activité transcriptionnelle de la partie C-terminale. Afin d'activer l'opéron *hyc*, la protéine va s'attacher à environ 100 pb avant le site de départ de la transcription et en présence de formiate, il va activer le promoteur (Skibinski et al. 2002). Cependant, la protéine FhlA n'agit pas seulement sur l'opéron *hyc* mais également sur l'expression de l'opéron *hyp* et sur le gène *fdhF* (Sauter et al. 1992).

1.4.3.1 FhlA indépendante du formiate

Il est intéressant de mentionner qu'en 2001, le laboratoire de Shanmugam a effectué une expérience qui consistait en l'élimination de la partie N-terminale (entre les acides aminés 5 et 374) de la protéine FhlA. En fait l'expérience consistait à supprimer la majeure partie centrale de l'ADN codant. Ils ont fait plusieurs mutations et après avoir analysé les résultats, ils ont découvert que la protéine mutée (FhlA165) avait une particularité intéressante. En effet, la protéine FhlA165 est indépendante de la quantité de formiate et de molybdène, c'est-à-dire qu'elle est capable d'aller activer le complexe FHL sans formiate le rendant toujours actif (Self et al. 2001). Ils ont d'ailleurs vérifié l'affinité de la protéine pour l'opéron *hyc* et ils se sont aperçus qu'elle était plus élevée que la protéine native.

1.4.4 L'hydrogénase 4

Il a été récemment démontré que le système formiate hydrogène lyase ne comportait pas uniquement l'hydrogénase 3 mais qu'il existait également une autre hydrogénase, l'hydrogénase 4 (Hyd-4) (Andrews et al. 1997). L'hydrogénase 4, comme l'hydrogénase 3, contiendrait une protéine ayant du nickel ainsi que des centres fer-soufre. Donc, les deux hydrogénases (Hyd-3 et Hyd-4) forment un groupe à part entière d'hydrogénases dites nickel-fer tandis que d'autres hydrogénases ne contiennent que du fer. La **figure 4** représente une hydrogénase nickel-fer.

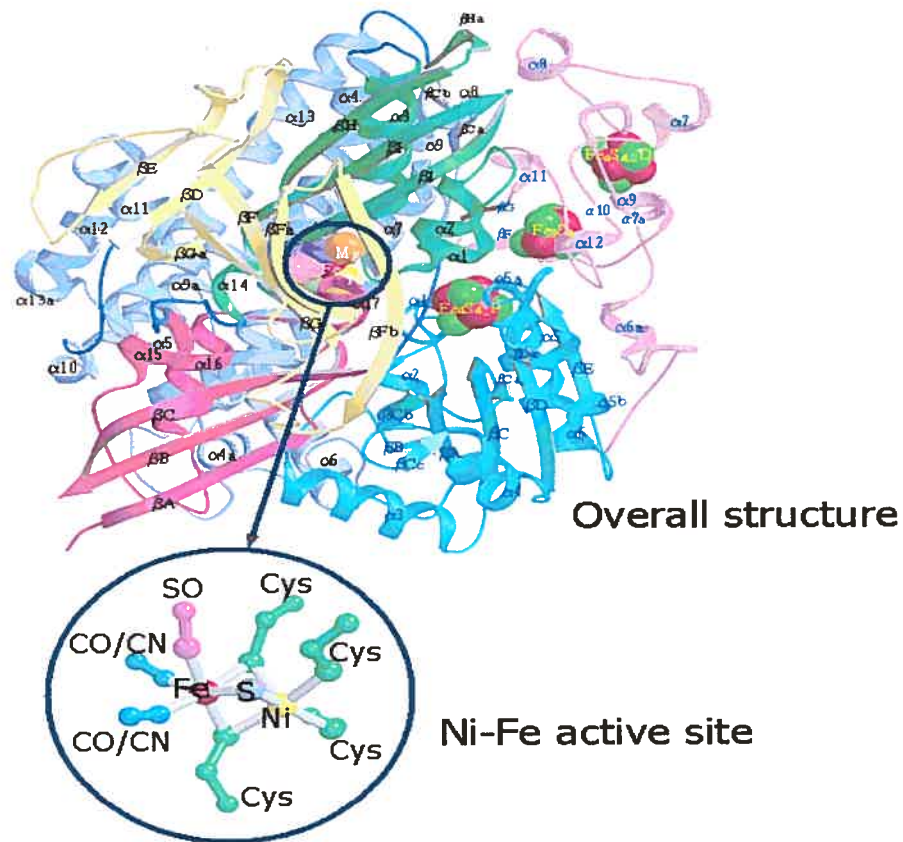


Figure 4 : Représentation d'une hydrogénase NiFe

Donc, comme l'hydrogénase 3 fait partie du complexe formiate hydrogène lyase, il est maintenant possible de spécifier que ce complexe est la formiate hydrogène lyase 1 tandis que le complexe formé de l'hydrogénase 4 est le complexe formiate hydrogène lyase 2 (Andrews et al. 1997). L'hydrogénase 4 est codée par l'opéron *hyf* et contient 10 sous-unités. L'opéron *hyf* (*hyf-ABCDEFGHIJR-focB*) code pour des homologues aux sous-unités de l'hydrogénase 3.

1.4.4.1 Les protéines de l'hydrogénase 4

Côté protéique maintenant, HyfA (homologue à HycB) serait une protéine fer-soufre jouant le rôle de ferrédoxine. HyfB, HyfD ainsi que HyfF seraient des protéines servant au transfert des protons. HyfC est une sous-unité de l'hydrogénase ayant un rôle incertain tout comme HyfE. HyfG (homologue à HycE) est une protéine nickel-fer et une sous-unité de l'Hyd-4. HyfH, protéine fer-soufre, joue le rôle de ferrédoxine tandis que HyfI, qui est aussi une protéine fer-soufre, est une sous-unité de l'hydrogénase. HyfJ a un rôle non défini tandis que la protéine HyfR est une protéine régulatrice ayant la même fonction que FhlA, donc un senseur de formiate. En ce qui concerne FocB, il jouerait le rôle de perméase pour l'acide formique (Andrews et al. 1997). Il faut cependant mentionner que l'hydrogénase 4, contrairement à l'hydrogénase 3, produit de l'hydrogène à pH alcalin tandis que l'hydrogénase 3 du complexe formiate hydrogène lyase 1 produit du biohydrogène à pH acide. Donc à pH alcalin, l'activité du complexe formiate hydrogène lyase 2 est dépendante de la formiate déshydrogénase H (FDH-H) et de l'hydrogénase 4. De plus, il a été récemment découvert qu'à pH acide et en présence d'une source extérieure d'acide formique, la production de biohydrogène dépend de l'hydrogénase 3 plutôt que de l'hydrogénase 4 chez *Escherichia coli* (Andrews et al. 1997).

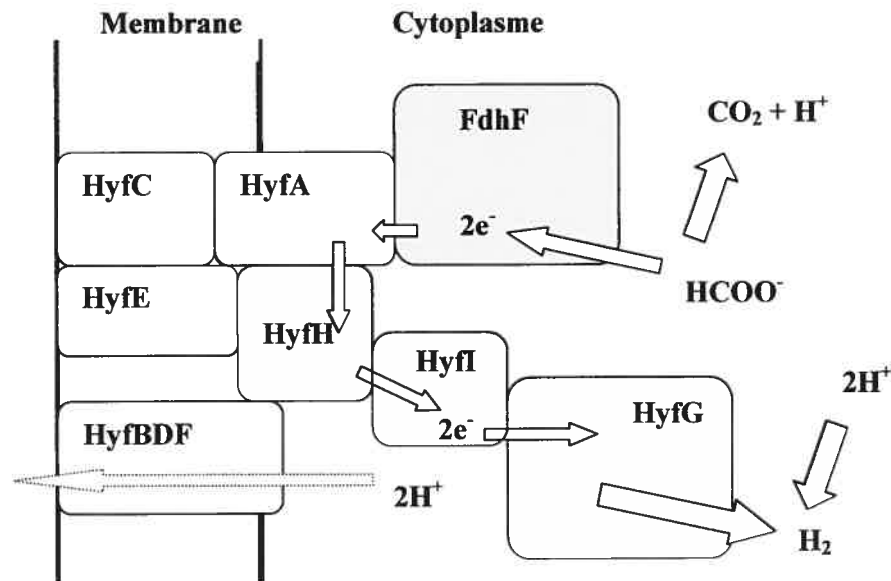


Figure 5: Modèle de l'arrangement du complexe formiate hydrogène lyase formé de l'hydrogénase 4 proposé par Andrews et al.

1.4.5 Les hydrogénases 1 et 2

Comme il a été mentionné plus tôt, *Escherichia coli* est capable, en anaérobie, de synthétiser deux hydrogénases qui consomment de l'hydrogène au lieu d'en produire comme le fait l'hydrogénase 3. Ces deux hydrogénases sont Hyd1 et Hyd2 (hydrogénase 1 et hydrogénase 2) et consomment l'hydrogène en l'oxydant (Menon et al. 1994). Les deux hydrogénases sont en fait des hétérodimères $\alpha\beta$ qui consistent en une petite et une grande sous-unité contenant du nickel et qui sont localisées dans la partie intérieure de la membrane (Ballantine et al. 1986; Sawers et al. 1986). De plus, l'activité de l'hydrogénase 2 est plus grande que l'hydrogénase 1, ce qui fait en sorte qu'elle consomme plus que l'autre (Ballantine et al. 1986; Sawers et al. 1986). Ces isoenzymes sont également spécifiques à certains pH. En effet, le pH optimum pour l'hydrogénase 1 se situe entre 6 et 8 alors que celui de l'hydrogénase 2 est de 8 (Ballantine et al. 1986; Sawers et al. 1986). Les gènes codant pour ces hydrogénases sont compris sur les opérons *hya* et *hyb*. En effet, l'opéron *hya* comprend les gènes *hyaA* et *hyaB* qui codent respectivement pour la petite et la grande sous-unité de

l'hydrogénase 1 tandis que l'opéron *hyb* comprend les gènes *hybA* et *hybC* qui codent également pour la petite et la grande sous-unité de l'hydrogénase 2 (Menon et al. 1990; Menon et al. 1994). De plus, si on prend l'hydrogénase 1, les gènes *hyaDEF* sont requis pour une modification post-traductionnelle des sous-unités naissantes tandis que chez l'hydrogénase 2 ce sont les gènes *hybFG* qui jouent ce rôle (Menon et al. 1991; Menon et al. 1994).

1.4.5.1 Régulation des hydrogénases 1 et 2

Pour ce qui est de la régulation des hydrogénases, nous savons qu'elles sont actives en anaérobie. De plus, pour l'hydrogénase 2, la protéine Fnr est requise pour l'expression de l'opéron *hyb*. L'hydrogénase 2 a un niveau d'activité maximal lorsque la culture croît en présence d'hydrogène et de fumarate. Il a donc été démontré que l'hydrogénase 2 a comme fonction de fournir des électrons à la fumarate réductase, électrons venant de l'oxydation de l'hydrogène, pour lui permettre de réduire le fumarate en succinate (Ballantine et al. 1986; Menon et al. 1994; Sawers et al. 1985).

Du côté de l'hydrogénase 1, il a été découvert que pour une expression maximale, l'opéron *hya* nécessitait le facteur sigma RpoS ainsi que des régulateurs transcriptionnels AppY et ArcA.

La fonction précise de l'hydrogénase 1 n'est pas encore bien définie. Toutefois, il a été démontré qu'elle contribuerait, en plus d'avoir sensiblement le même rôle que pour l'hydrogénase 2, au pool des quinones en fournissant des électrons venant de l'oxydation de l'hydrogène. De plus, l'activité enzymatique de l'hydrogénase 1 est maximale lorsqu'elle croît sur du glucose (Bronsted et al. 1994; Atlung et al. 1997).

Il est bon de noter que la condition de croissance (anaérobie) ainsi que le pH jouent un rôle dans l'expression des opérons et dans l'activité des hydrogénases. Cependant, ces hydrogénases, comme la 3 et la 4, ne sont pas requises pour une croissance en anaérobie (King et al. 1999).

1.4.6 La lactate déshydrogénase

La production de biohydrogène engendre aussi des pertes, et l'une des voies où l'on perd de l'hydrogène lors de la fermentation acides mixtes est celle de la production de lactate par la lactate déshydrogénase.

Si nous nous référons encore une fois à la **figure 2** qui représente la fermentation acides mixtes, nous pouvons y voir que le pyruvate peut également, en plus d'être converti en acide formique et en acétyl-CoA, nous donner de l'acide lactique à l'aide de la lactate déshydrogénase. En résumé, la lactate déshydrogénase fermentative convertit le pyruvate en acide D-lactique. Cette réaction consomme également un NADH par pyruvate. Il y a donc perte ici d'une molécule d'hydrogène. De plus, en anaérobie avec un pH acide, la lactate déshydrogénase fermentative est dix fois plus induite engendrant ainsi une plus grande perte d'hydrogène (Mat-Jan, et al. 1989). Il est bon de noter que la lactate déshydrogénase fermentative est codée par le gène *ldhA* (Bunch et al. 1997). Il y a également deux autres lactate déshydrogénase chez *Escherichia coli* qui sont en fait des flavoprotéines liées à la membrane et qui sont couplées à la chaîne respiratoire. On dit que ce sont plutôt des lactates oxydases (Haugaard, 1959; Kline, et al. 1965).

Des études ont été effectuées par Mat-Jan en 1989 à savoir si cette voie de production de lactate, est nécessaire à la survie de la bactérie. En effet, ils ont isolé des mutants *ldhA* qui étaient privés de lactate déshydrogénase fermentative. Ce qu'ils ont découvert c'est qu'il n'y avait aucun effet sur la croissance de la bactérie en anaérobie et qu'elle continuait à fermenter le sucre et à produire les autres produits tels que le succinate, le formiate, l'acétate et l'éthanol. Cependant, cette mutation (située à 30,5 min du chromosome d'*Escherichia coli*) jumelée avec une délétion de la pyruvate formiate lyase entraîne une impossibilité de fermenter un bon nombre de composés carbonés (Mat-Jan et al. 1989).

1.5 LES CONDITIONS DE CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE

La croissance et la production de biohydrogène par *Escherichia coli* sont étroitement liées aux conditions dans lesquelles la bactérie se trouve. En effet, les milieux utilisés, le pH, les minéraux, le mode de croissance (en « batch » ou en continu) et plusieurs autres facteurs peuvent être manipulés afin d'engendrer diverses réponses du microorganisme étudié. Une simple omission d'un minéral (Ca) ou bien un changement de source de carbone (xylose au lieu de glucose) peut faire toute la différence entre une croissance adéquate ou la mort cellulaire. Concernant la production de biohydrogène, nous savons par exemple qu'un pH basique va réduire considérablement la quantité produite. Cependant, les études liant la limitation en nutriments comme le glucose ou le soufre avec la production de biohydrogène sont pratiquement inexistantes.

1.5.1 Limitation en nutriments

Il y a 50 ans, Monod a souligné la relation entre les nutriments et le taux de croissance bactérienne. Il a démontré qu'il était possible de réduire la quantité de nutriments nécessaires jusqu'à un certain point où la bactérie vit au ralenti. De plus, le fait de réduire ces substances ne résulte pas seulement en une baisse de vitesse de la croissance mais également à une adaptation et à un réajustement des bactéries à leur milieu. En fait, la définition proprement dite de la limitation en nutriments est le point précis où la croissance bactérienne n'est plus optimale. Donc lorsque la croissance est optimale nous ne parlons pas de limitation n'y de réponse de la bactérie. Ce qui nous amène à dire que lorsque la bactérie est dans un environnement non propice il y a des répercussions physiologiques et régulatrices de la part du microorganisme (Firenci, T. 1999).

Nous savons que plusieurs gènes et plusieurs protéines sont affectés par une limitation en nutriments. Il y a donc des changements physiologiques et des changements dans les systèmes de régulation (**Tableau II**).

Tableau II : Quelques mécanismes d'adaptation des bactéries aux manques de nutriments (Lengeler J.W. 1993)

Niveaux de régulation	Les méthodes d'adaptions des bactéries
Niveau Biochimique	Augmentation du Vmax (amplification de gènes, régulation) Augmentation de l'affinité et spécificité des enzymes Dérépression de nouveaux systèmes
Niveau des gènes	Beaucoup de mutations Réarrangements chromosomiques Nouveau système par transfert horizontal de gène
Niveau Morphologique	Formation de biofilms Formation de spores Formation d'hyphes
Niveau de la population	Symbiose entre les membres de la population

Chez les bactéries grames négatives comme *Escherichia coli*, il y a une adaptation de la perméabilité de leur membrane externe pour combattre la limitation. En ce qui concerne la limitation par les sucres comme le glucose ou le tréhalose, la régulation des porines OmpF et LamB en présence d'un niveau bas de nutriments est primordiale. En effet, lorsqu'il y a une diminution de sucre, la transcription du gène *lamB* codant pour la glycoporine LamB va s'ajuster facilitant ainsi le taux de diffusion du maltose dans les cellules bactériennes. Tout comme LamB, OmpF est aussi présent en plus grande quantité en conditions limitantes de glucose (*ompF* est exprimé 10 fois plus en conditions limitantes). Les mauvaises conditions de croissance affectent également les transporteurs de type ABC par exemple qui sont présent en plus grande quantité. Les ribosomes et la traduction sont aussi affectés ce qui fait en sorte que lorsque le taux de croissance baisse, moins de protéines sont formées. La limitation par le carbone affecte également certains systèmes de régulation et le changement le plus important semble se jouer du côté de L'AMPc. Le gène *malt* est un des plus régulé par l'augmentation de l'AMPc. Les limitations affectent également les gènes sous le contrôle de RpoS (Firenci, T. 1999).

Comme décrit, les limitations en nutriments jouent des rôles dans plusieurs systèmes. Cependant, plusieurs effets des limitations restent à voir et surtout, dans le cas qui nous intéresse, les effets d'un manque de nutriments sur la production de biohydrogène. En effet, les limitations en nutriments s'avèrent une piste de recherche intéressante en ce qui concerne le biohydrogène puisqu'elle n'a pratiquement jamais été explorée.

1.6 PROJET DE RECHERCHE

Le projet de recherche consistait en l'étude de la production de biohydrogène chez des souches d'*Escherichia coli* en conditions limitantes de glucose ou de soufre en « batch » et en continu. L'hydrogène produit a été détecté par chromatographie en phase gazeuse.

Dans un deuxième temps, des souches mutantes ont été construites afin d'en étudier également la production de biohydrogène et ce, dans les mêmes conditions de croissance que les souches non mutées. Ces mutations fût faites dans le gène *ldhA* et la seconde consistait en l'incorporation d'un plasmide contenant un gène codant pour une protéine FhlA indépendante de l'acide formique. Dans un troisième temps, nous avons cloné par PCR l'hydrogénase Fe de *Clostridium pasteurianum* dans une souche de *Escherichia coli* et avons tenté d'en étudier les effets sur la production d'hydrogène.

CHAPITRE II
PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS

Au cours des expériences, plusieurs souches, plasmides ainsi qu'un phage furent utilisés. Le tableau suivant décrit les souches permettant de mener à terme les expériences effectuées.

Tableau III: Description des différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées lors des expériences

Souches	Caractéristiques	Références
BL21 (DE3)	F ⁺ ompT [lon] hsdS _B avec DE3, un prophage λ transportant le gène de l'ARN polymérase T7	Collection du laboratoire
DH5α	φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF) recA endA hsdR supE	GIBCO-BRL
BW545	Δ(lacU)169 rpsL	Menon et al., 1991
JW135	BW545 Δhya-Km Δhyb-Km	Collection du laboratoire de K.T. Shanmugam
FTD147	MC4100, ΔhyaB ΔhybC ΔhycE	Skibinski et al., 2002
SE1750	ldhA :: Tn10	Bunch et al., 1997
WS127	WS113, Δgal mod ⁺ (pWS165)	Self et al., 2001
SMC360	<i>E. coli</i> TG1 portant pSM475	EniTecnologie
SMC361	<i>E. coli</i> TG1 portant pSM654	EniTecnologie
JTHYD1	BL21 (DE3) portant pJT2	Ce travail
JTHYD2	JTHYD1 portant pSM475	Ce travail
LJT135	JW135 ldhA :: Tn10	Ce travail
LJT545	BW545 ldhA :: Tn10	Ce travail
FJT135	JW135 portant pWS165	Ce travail
FJT545	BW545 portant pWS165	Ce travail
DJT135	LJT135 portant pWS165	Ce travail
DJT545	LJT545 portant pWS165	Ce travail

Tableau IV: Description des plasmides ainsi que du phage utilisés lors des expériences

Plasmides et phage	Caractéristiques	Références
Plasmides		
pWS165	pACYC184, <i>fhlA165</i> Cm ^R	Self et al., 2001
pSM654	Ap ^R , Cp <i>HydI</i> (1750 pb) dans p <i>BtacI</i> aux sites PstI/HindIII	EniTecnologie
pSM475	Ap ^R , Cp <i>fd</i> (200 pb) dans p <i>BtacI</i> aux sites EcoRI/PstI	EniTecnologie
pMR101	Km ^R , Vecteur d'expression (4100 pb)	ATCC
pJT2	Km ^R , Cp <i>HydI</i> (1750 pb) dans pMR101 aux sites PstI/HindIII	Ce travail
pT7-5	Ap ^R , vecteur d'expression (2470 pb)	Collection du laboratoire
Phage		
P1 vir		Collection du laboratoire
Légende :	Cp : <i>Clostridium pasteurianum</i> ; HydI : Hydrogénase I; fd : Ferredoxine	

2.2 MILIEUX DE CULTURE

Plusieurs souches bactériennes ont été étudiées et selon les résultats escomptés, différents milieux de culture ont été utilisés.

2.2.1 Milieu Luria-Bertani (LB)

Bacto tryptone : 10 g

Extrait de levure : 5 g

NaCl : 5 g

Ajustée à 1L d'eau distillée

(milieu solide : 15 g d'agar).

2.2.2 Milieu minimal M9

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$: 10 g

KH_2PO_4 : 3 g

NaCl : 0.5 g

NH_4Cl : 1 g

Ajuster à 1L d'eau distillée

Après stérilisation :

MgSO_4 1M : 10 ml

CaCl_2 0.1 M : 10 ml

Glucose (selon l'expérience)

2.2.3 Milieu Minimal M9 avec MES

Même recette que le milieu minimal M9 sauf que l'eau distillée est remplacée par le tampon MES (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid) pH 6,40, 1M.

2.2.4 Milieu Minimal M9 avec HEPES

Même recette que le milieu minimal M9 sauf que l'eau distillée est remplacée par le tampon sodium HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-N'(2-Ethanesulfonic Acid)) pH 7,5, 1M

2.2.5 Milieu R-top

Bacto tryptone : 10 g

Extrait de levure : 1 g

NaCl : 8g

Agar : 8g (R-plates contient 12g d'agar)

100ml eau distillée : ajustée à 1L

Après stérilisation :

CaCl_2 1M : 2 ml

Glucose 20% : 5 ml

2.3 ANTIBIOTIQUES

Afin de sélectionner les souches contenant des gènes de résistances aux antibiotiques dans leur génome ou sur un plasmide, nous avons utilisé différents antibiotiques à différentes concentrations et disposés à -20°C.

2.3.1 Chloramphénicol

Solution stock : 30 mg/ml, dissout dans de l'éthanol 100 %. Utilisé à 30 µg/ml dans les milieux de culture.

2.3.2 Tétracycline

Solution stock : 12.5 mg/ml, dissout dans l'éthanol 50%. Utilisé à 12.5 µg/ml dans les milieux de culture.

2.3.3 Kanamycine

Solution stock : 50 mg/ml, dissout dans l'eau distillée et stérilisé par filtration. Utilisé à 50 µg/ml dans les milieux de culture.

2.3.4 Ampicilline

Solution stock : 50 mg/ml, dissout dans l'eau distillée et stérilisé par filtration. Utilisé à 50 µg/ml dans les milieux de culture.

2.4 TAMPONS

En plus des milieux de culture et des antibiotiques pour sélectionner les souches, différents tampons ont été utilisés soit pour maintenir le pH ou pour subvenir aux besoins de divers protocoles.

2.4.1 MES

MES (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid) : 1M; pH 6,40.

2.4.2 Sodium HEPES

Sodium HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'(2-Ethanesulfonic Acid)) : 1M; pH 7,50.

2.4.3 Tampon MC

MgSO₄ 0.1M

CaCl₂ 0.005 M

2.4.4 Tampon citrate 0.1M

Acide citrique : 9.6 g

NaOH : 4.4 g

Eau distillée : 500 ml

Ajuster le pH à 5,5

2.5 MÉTHODES DE MANIPULATION DE L'ADN

2.5.1 Extraction plasmidique (mini-préparation) par lyse alcaline

Afin d'étudier plus en détail un plasmide, il doit être isolé, c'est-à-dire extrait de la souche dans laquelle il est, pour ensuite être en mesure de faire différentes expériences comme de transformer une seconde souche ou d'insérer un gène dans ce plasmide. La technique utilisée dans le laboratoire afin d'extraire le plasmide consiste tout d'abord à préparer 5 ml de culture dans un milieu avec antibiotique et de l'incuber une nuit à 37°C. Ensuite, il faut centrifuger 10 minutes à 10 000 rpm. L'étape suivante consiste à resuspendre le culot dans 100 µl de TEG (Tris-HCl 25mM, EDTA-Na₂ 10mM, glucose 50mM, pH 8.0) et de l'incuber 5 minutes sur glace. Pendant ce temps, une solution de NaOH 0.2M/SDS 1% est fraîchement préparée et après l'incubation de 5 minutes, 200 µl de cette solution est ajoutée. Une fois bien mélangée par inversion, on remet les cellules pour une incubation de 5 minutes sur glace. Ensuite, on ajoute 150 µl d'acétate d'ammonium 3M pH 4.5, on mélange doucement et on réincube 5 minutes sur glace. Après incubation, il faut transférer le tout dans un eppendorf de 1,5 ml et centrifuger à 10 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite transféré dans un eppendorf stérile, 900 µl d'éthanol absolu (100%) sont ajoutés, et après avoir brièvement vortexé, il faut centrifuger pendant 15 minutes à 10 000 rpm à température pièce. Ensuite, le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol 70% et séché à l'air ambiant. Une fois séché, le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau stérile et 1 µl de RNase A (10 mg/ml) est ajouté.

2.5.2 Cellules compétente et transformation

Afin de transformer une cellule en lui introduisant un plasmide quelconque, cette cellule doit préalablement être apte à le recevoir.

2.5.2.1 Préparation de cellules thermocompétentes congelées

Pour rendre les différentes cellules d'*Escherichia coli* compétentes, le traitement au chlorure de calcium avec un choc au froid est la technique que nous avons utilisée. Premièrement, il faut incuber une culture de 25 ml de cellules dans du LB, une nuit à 37°C. Le lendemain, la culture est diluée 1/50 dans 1 L de LB et incubée à 37°C. Lorsque la DO_{600} atteint 1.0, la culture est mise dans la glace. À cette étape, toutes les opérations sont effectuées à 4°C. Après 15 minutes de centrifugation à 5000 rpm, les cellules sont resuspendues dans 10 ml d'une solution froide de $CaCl_2$ 0,1 M et conservées dans la glace 10 minutes. Une seconde centrifugation doit suivre et les cellules sont resuspendues dans 1/5^e du volume original avec la solution de $CaCl_2$. Finalement, les cellules sont aliquotées à raison de 200 µl de suspension par tube et conservées à -80°C.

2.5.2.2 Cellules thermocompétentes fraîches

La préparation de cellules thermocompétentes fraîches a pour but de les rendre aptes à recevoir un plasmide. Pour ce faire, il faut avoir une culture de nuit ayant été incubée à 37°C et diluer cette culture 1/50 dans 5 ml de LB pour ensuite la réincuber 2h à 37°C. Ensuite, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 10000 rpm, le surnageant est enlevé et le culot est placé sur glace pour une période de 15 minutes. Ensuite, il faut resuspendre le culot dans 1 ml de $CaCl_2$ 0,1M froid et transférer le tout dans un eppendorf stérile afin de faire une autre centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (Pour préserver la chaîne de froid). Ensuite, il faut resuspendre le culot dans 200 µl de $CaCl_2$ 0,1 M froid et incuber le tout 30 minutes sur glace. Les cellules thermocompétentes maintenant prêtes, nous pouvons procéder à la transformation.

2.5.2.3 Transformation chimique

La transformation est très utile car elle permet d'introduire un plasmide dans des cellules compétentes préalablement préparées. Plusieurs souches étudiées contenaient des plasmides dont certains ont été incorporés par transformation chimique. Pour faire la transformation, il faut premièrement mettre en contact 2 à 3 μl de plasmides avec environ 100 μl de cellules compétentes. Deuxièmement, il faut mélanger le tout et l'incuber sur glace 30 minutes. Ensuite, un choc thermique de 6 minutes à 37°C doit être donné suivit d'une incubation sur glace de 2 minutes. Par la suite, il faut ajouter 1 ml de LB et incuber le tout 1 heure à 37°C. Après l'incubation, une certaine quantité (environ 100 μl) du mélange est étalée sur des pétris qui sont incubés pendant la nuit à 37°C. Ensuite, il faut repérer les transformants et ensemercer une colonie sur un pétri de LB à 37°C pendant toute la nuit afin de la purifier et d'en avoir une plus grande quantité «stock».

2.5.2.4 Électroporation

Une autre méthode de transformation (l'électroporation) a été utilisée lors de nos expériences. En effet, l'électroporation consiste à faire une transformation à l'aide d'un courant électrique. Cette technique permet d'avoir un meilleur rendement de cellules transformées et consiste à mettre 200 μl de cellules électrocompétentes («stock» de cellules électrocompétentes du laboratoire) avec 2 μl d'ADN dans une cuvette contenant des électrodes. Ensuite, il faut soumettre ce mélange à un choc électrique très bref (millisecondes) et y ajouter 500 μl de LB. Après, ce mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C et, après incubation, le tout est étalé sur une gélose LB contenant le bon antibiotique de sélection. Dans notre cas, les transformations par électroporation ont été effectuées à l'aide d'un MicroPulser[™] de BioRad.

2.5.3 Amplification d'ADN par PCR

Le PCR (polymerase chain reaction) permet l'amplification de fragments d'ADN in vitro. L'appareil GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) a été

utilisé avec l'enzyme de polymérisation Taq de la compagnie Fermentas. Le PCR a été effectuée afin d'amplifier des gènes destinés à être clonés. Pour ce faire, différentes amorces (les amorces ont été fabriquées par la compagnie Alpha DNA) ont été utilisées à une concentration finale de 1 μ M (Tableau V). Nous avons également eu besoin de dNTP à 0,2 mM, un tampon à PCR+MgSO₄ 1X de Fermentas, de l'eau stérile et d'ADN à amplifier.

Tableau V : Description des amorces utilisées lors des réactions PCR

Noms des amorces	Séquence 5'-3'
Sechyd2NcoI	<u>CCATGGAGGAGGCT</u> AGAAATGAAA
Sechyd4BamHI	GGCT <u>CGGATCCT</u> ATTTTTTATATTT

Légende : Les nucléotides soulignés sur les séquences représentent les sites de restriction introduits dans l'ADN.

2.5.4 Digestion par enzymes de restriction

Les digestions enzymatiques ont été effectuées à 37°C pendant 1 heure. Les différentes enzymes de restriction ainsi que les tampons provenaient de la compagnie Invitrogen.

2.5.5 Extraction de l'ADN d'un gel d'agarose

Afin de purifier de l'ADN à partir d'un gel d'agarose, il faut tout d'abord extraire la bande du gel et la déposer dans un eppendorf stérile. Ensuite, pour extraire l'ADN de cette bande d'agarose, le Qiaex Gel Extraction Kit (Qiagen) fût utilisé selon la méthode du manufacturier.

2.5.6 Ligation

La ligation sert à lier un fragment d'ADN dans un vecteur. Pour faire une ligation efficace, un ratio de 4 :1 (insert : vecteur) doit être respecté. Donc, afin de faire nos ligations, le ratio a été respecté et la ligation a été faite à l'aide de la T4 ligase de la compagnie Invitrogen. Les ligations ont été effectuées à température pièce, soit environ 22°C, pendant 1 heure.

2.6 TRANSDUCTION

Afin de transférer une mutation, une méthode qui se nomme transduction peut être utilisée. Cette méthode consiste à transférer un gène muté dans une bactérie à l'aide d'un bactériophage.

2.6.1 Préparation du lysat phagique

Afin d'effectuer la transduction d'une souche donneuse à une souche receveuse, il faut préparer le lysat phagique. Pour commencer il faut faire une dilution 1:50 dans un milieu LB, où $5 \times 10^{-3} \text{M}$ de CaCl_2 ont été ajoutés, à partir d'une culture de nuit d'une souche donneuse (dans notre cas la souche fût SE1750) et l'incuber 1 heure à 37°C . Par la suite, 10^7 phages (dans notre cas P1 vir) sont ajoutés à 1 ml de la culture bactérienne et le tout est incubé 20 minutes dans un bain-marie à 37°C . Après incubation, 2,5 ml de R-top agar sont ajoutés et coulés sur une gélose R-plate (le R-top et R-plate agar contiennent l'antibiotique désiré). Il faut incuber la gélose toute la nuit à 37°C et le lendemain, il faut gratter l'agar mou (R-top agar) et la déposer dans un tube. Après, la gélose est lavée avec 1 ml de LB qui est ajouté au tube. Il faut par la suite ajouter 5 gouttes de chloroforme, vortexer 30 secondes et centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant, contenant le phage, est récupéré et entreposé à 4°C avec 1 à 2 gouttes de chloroforme.

2.6.2 La Transduction

Après avoir obtenu le lysat phagique à partir de la souche donneuse, il suffit d'infecter la souche receveuse avec ce lysat. Pour la transduction, il faut tout d'abord avoir une culture de nuit de la souche receveuse (JW135 et BW545) et centrifuger cette culture 10 minutes à 10 000 rpm pour ensuite resuspendre le culot de cellules dans 500 μl de tampon MC. Par la suite, il faut distribuer 0,1 ml des cultures dans 3 eppendorfs. Dans le premier eppendorf 0,1 ml du lysat phagique y est ajouté, dans le deuxième 0,1 ml du lysat dilué 10X et dans le troisième pas de lysat y est ajouté. Un quatrième tube contenant 0,1 ml du lysat est également présent. Il faut ensuite incuber tous ces tubes dans un bain-marie à

37°C pendant 20 minutes et après incubation y ajouter rapidement 0,2 ml de tampon citrate de sodium (0,1 M). Ensuite, 0,1 ml du contenu des eppendorfs est étalés sur des gélose LB contenant un antibiotique et le tout est incubé toute la nuit à 37°C. Après incubation, les géloses contenant des colonies résistantes à l'antibiotique sont sélectionnées afin d'isoler ces colonies sur le même milieu toute la nuit à 37°C. Après incubation, ces géloses contiennent nos souches receveuses transduites que l'on peut conserver et utiliser.

2.7 MÉTHODES DE CROISSANCE DES SOUCHES

Afin d'étudier la production de biohydrogène, différentes méthodes de croissance ont été utilisées; soit les méthodes de croissance en lot («batch») et en continu.

2.7.1 Croissance anaérobie en lot («Batch»)

La croissance en lot («batch») en anaérobie des différentes souches (BW545, JW135, LJT545, LJT545, FJT545, FJT135, DJT545 et DJT135) afin de vérifier la production de biohydrogène est effectuée dans des vials de 10 ml. Les vials sont fermés à l'aide de bouchons de caoutchouc étanche afin de ne pas laisser pénétrer d'air. Les milieux de culture utilisés sont le Luria Bertani (LB) et le milieu minimal M9 avec et sans MES dans lesquels des quantités variables de glucose 2,25 à 176 μmol et de soufre de $1,0 \times 10^{-7}$ à $2,5 \times 10^{-6}$ moles (0,005 à 0,09% du volume total) sont incorporées afin d'en étudier les effets. Chaque vial est inoculé avec 100 μL d'une culture fraîche ayant crû en aérobie pendant 24h à 37°C dans un milieu minimal M9 ou dans un milieu Luria Bertani (LB). Ensuite, avant d'inoculer les vials, il faut récupérer les bactéries en les centrifugeant pendant 10 minutes à 10 000 rpm et les resuspendre dans du milieu minimal M9 sans glucose. Cette étape d'isolement de bactérie est effectuée afin d'enlever le milieu LB le cas échéant (la majorité du temps le milieu M9 fût utilisé afin de préparer les souches à inoculer et non le milieu LB). Une quantité de 2,3 ml de culture est incubée à chacun des essais et l'air des vials doit être remplacé par de l'argon afin d'avoir un environnement anaérobie. Les vials sont par la suite incubés à 37°C avec ou sans agitation sur une période de 72h à 96h. À tous les

24h, un prélèvement de 50 µl est effectué, à l'aide d'une seringue de verre d'une capacité de 50 µl, dans la partie gazeuse du vial afin d'y vérifier la quantité de biohydrogène produit. Les tests sont effectués en triplicata et la densité optique est également mesurée.

2.7.2 Croissance anaérobie en continu à l'aide d'un biofermenteur («Chemostat»)

La croissance en continu des souches (BW545, JW135, LJT545, LJT545, FJT545, FJT135, DJT545 et DJT135) est effectuée à l'aide d'un biofermenteur (chemostat) BioFlo® 110 New Brunswick Scientific Co. Inc. La quantité de culture étudiée est de 750 ml et la dilution varie de 0,01h⁻¹ à 3h⁻¹. L'environnement anaérobie est créé à l'aide d'argon à un débit allant de 5 ml à 6,5 ml par minute. La température de croissance doit être maintenue à 37°C et l'agitation de 250 à 300 rpm. Une solution basique de NaOH 10M est utilisée afin de maintenir automatiquement le pH à 6,40. L'échantillonnage d'hydrogène est effectué à tous les trois à quatre cycles (c'est-à-dire que si le débit est de 0,1h⁻¹, il faut attendre 30 à 40 heures avant de prendre un échantillon afin de laisser la souche s'adapter). Les échantillons d'hydrogène sont, comme les cultures en lot, pris à l'aide d'une seringue en verre de 50 µl. À chaque échantillonnage une quantité de culture venant du tube à déchet est récupérée afin d'en vérifier la densité optique (600nm). Chaque échantillonnage a été effectué en triplicata.

2.8 MÉTHODE D'ANALYSE DE LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE

Pour savoir s'il y a ou non production de biohydrogène, la quantité d'hydrogène émit de nos différentes souches doit être mesurée.

2.8.1 Étude par chromatographie en phase gazeuse

La quantité d'hydrogène est mesurée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC-8A et d'un enregistreur Linear. Un chromatographe sert en fait à étudier les gaz qu'il sépare selon le temps de rétention de chacun. Sachant que le temps de rétention de l'hydrogène est de 18s, il est possible

d'analyser la quantité d'hydrogène des échantillons. Une courbe standard est premièrement effectuée à l'aide de la loi des gaz parfaits ($pV = nRT$) afin de pouvoir déterminer le nombre de moles d'hydrogène contenu dans les échantillons. Les tests sont effectués avec une atténuation de 8, 16 ou 32. De plus, le gaz ventilant utilisé est de l'argon et la colonne est un tamis moléculaire de 5Å. Enfin, la température du détecteur est de 110°C tandis que celle de la colonne est de 60°C. Le courant est de 70mA et la vitesse de l'enregistreur de 1 cm/min.

2.9 MÉTHODE D'ANALYSE DES PRODUITS DE FERMENTATION

Un chromatographe à phase gazeuse a été utilisé afin d'étudier le biohydrogène. Cependant, pour étudier les produits de fermentation liquide, un appareil pouvant les mesurer (HPLC) a été utilisé.

2.9.1 Étude par HPLC

Afin de vérifier les différents produits de fermentation, qui sont en fait les acides organiques lactate, formiate, succinate, acétate ainsi que l'éthanol un chromatographe en phase liquide de haute-performance (HPLC) de la compagnie Varian (Varian HPLC system Model 1411) a été utilisé. La colonne utilisée est une colonne 300 x 7,8 mm Aminex[®] HPX-87H ion exclusion column de Bio Rad. Afin d'étudier les produits de fermentation, le contenu des vials a été transféré dans une éprouvette et le tout centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Cette étape consiste à enlever toutes traces de bactéries. Après centrifugation, le surnageant a été passé dans un filtre 0,22 µm stérile afin d'enlever toutes particules pouvant nuire à la lecture et conservé dans un eppendorf stérile. Par la suite, 50 µl fût injecté à l'aide d'une seringue dans le port d'injection et les données ont été analysés par le HPLC pendant 25 minutes, soit le temps de séparer tous les produits à étudier.

2.10 SPECTROPHOTOMÉTRIE

La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu CPS-260 UV-2101PC à longueur d'onde de 600nm pour tous les échantillons.

2.11 DOSAGE DE GLUCOSE

Afin de vérifier la quantité de glucose dans le milieu, une trousse de détection de la compagnie Invitrogen, le Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit, a été utilisée selon le protocole du manufacturier. Les tests ont été effectués sur une plaque de 96 puits et la densité optique a été mesurée à 570 nm par un lecteur optique de marque MR600 Microplate[®] Reader de la compagnie Dynatech Instruments, inc.

CHAPITRE III
RÉSULTATS

3.1 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'*ESCHÉRICHIA COLI* EN CROISSANCE EN LOTS

La production de biohydrogène, lorsque le milieu est limitant en carbone ou en soufre, a été étudiée avec des cultures en lots dans un milieu minimal M9. Tous les tests ont été effectués selon les conditions de croissance décrites au point 2.7 de la section procédures expérimentales et les expériences ont toutes été répétées **trois fois**.

3.1.1 Comparaison de la production de biohydrogène entre la souche BW545 et JW135 et les mutants dérivés

Tout d'abord, la production de biohydrogène a été comparée entre les souches d'*Escherichia coli* sauvage BW545 et JW135. JW135 est en fait une souche dérivée de la BW545 et contient en son génome deux mutations. Ces mutations, $\Delta hya-Km$ $\Delta hyb-Km$, ont comme effets d'inactiver les deux opérons codant pour les hydrogénases 1 et 2, donc les hydrogénases consommant l'hydrogène. De plus, il y a présence d'une résistance à la kanamycine. Le tableau suivant montre le nombre de μmol d'hydrogène produit après 48h par ces deux souches ensemencées dans un milieu M9 avec MES et 176 μmol de glucose comme source de carbone et pour un volume total de 1 ml en condition anaérobie.

Tableau VI : Comparaison de la quantité d'hydrogène produite, exprimée en μmol , par la souche d'*Escherichia coli* sauvage BW545 et la souche mutée JW135

	JW135	BW535
Quantité hydrogène	31,5 \pm 3,0	25,6 \pm 2,5

Le tableau montre que la souche JW135 produit environ 6 μmol d'hydrogène de plus que la souche BW545 non mutée et ce, dans les mêmes conditions de croissance.

3.1.2 Production de biohydrogène des différentes souches mutantes

Plusieurs souches mutantes ont été fabriquées afin d'étudier la production de biohydrogène par celles-ci. Les mutantes dérivent toutes des souches JW135 mutées pour les hydrogénases 1 et 2 ainsi que de la souche sauvage *Escherichia coli* BW545.

3.1.2.1 Mutation dans le gène *ldhA*

La première mutation effectuée fût l'inactivation de la voie de lactate déshydrogénase (*ldhA*) dans la fermentation acides mixtes. En effet, afin d'inactiver la voie de la lactate déshydrogénase, une mutation a été transférée à l'aide du phage P1 et de la souche SE1750 (*ldhA::Tn10*). La transduction a été confirmée par la résistance à la tétracycline et par l'étude des produits de fermentation à l'aide d'un HPLC. La production de biohydrogène a été étudiée entre la souche d'*E. coli* sauvage BW545, la souche JW135 ainsi que les mutantes pour la voie de la lactate déshydrogénase LJT135 et LJT545 (voir **Tableau III**). La **figure 6** nous montre la quantité des différents produits de fermentation tandis que la **figure 7** montre la comparaison en ce qui concerne la production de biohydrogène. Le milieu de culture utilisée a été du M9 avec MES contenant 176 μmol de glucose (mais 44 μmol pour la **figure 6**) et les résultats sont exprimés pour 1 ml de culture après 48h d'incubation en condition anaérobie.

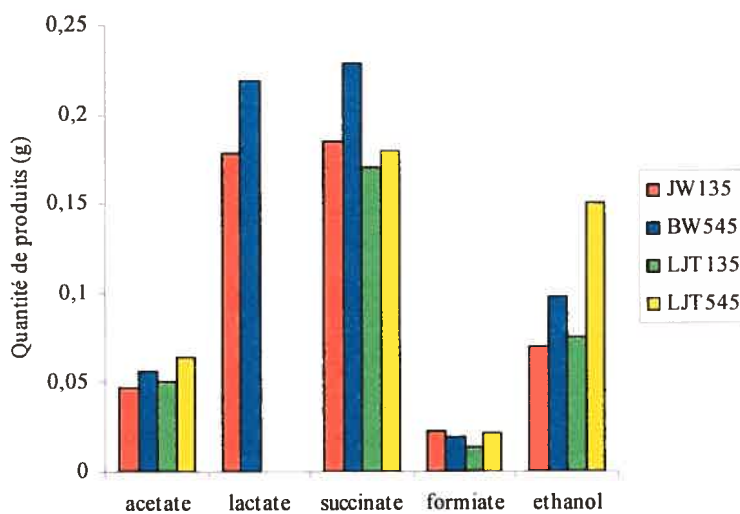


Figure 6 : Comparaison par HPLC des différents produits de fermentation (acétate, lactate, formiate, succinate et éthanol) exprimé en grammes pour les souches JW135, BW545, LJT135 et LJT545

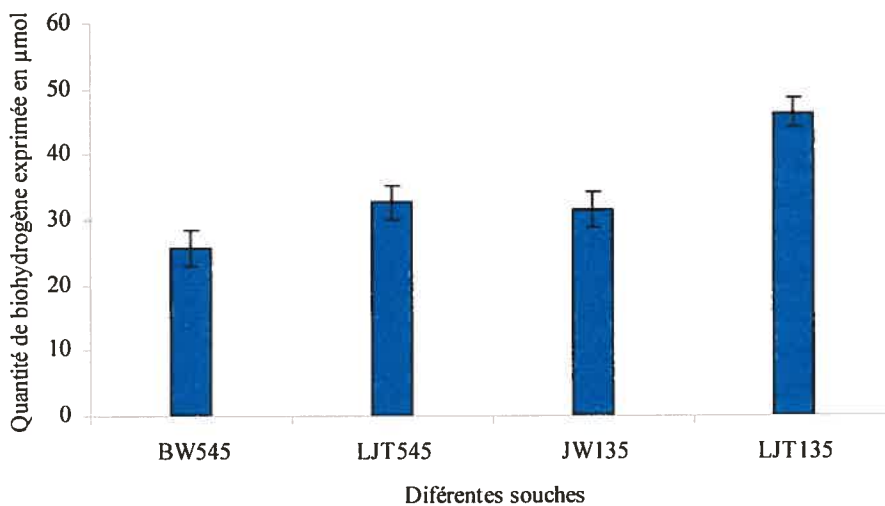


Figure 7 : Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d'*Escherichia coli* BW545, JW135, LJT135 et LJT545

La **figure 6** (ci-dessus) met en évidence l'absence de lactate comme produit de fermentation pour les souches LJT545 et LJT135 qui sont en fait les deux souches contenant les mutations dans le gène *ldhA*. En ce qui concerne la **figure 7**, la production de biohydrogène pour les souches mutées dans le gène *ldhA* est plus élevée comparativement aux souches non mutées. De plus, la souche LJT135 est celle qui produit le plus de biohydrogène parmi les quatre étudiées. Les expériences, comme mentionné plus tôt, ont été effectuées **3 fois**.

3.1.2.2 La protéine FhlA mutée

Les autres souches mutées comportent plutôt un plasmide qui confère aux souches l'ayant reçu une protéine FhlA indépendante de la quantité de formiate dans le milieu. En effet le plasmide pWS165 venant de la souche WS127 contient un gène codant pour une protéine FhlA indépendante du formiate c'est-à-dire que peu importe la quantité de formiate présent, la protéine FhlA va être active. Les souches d'*E. coli* BW545 et JW135 ont donc été transformées avec ce plasmide ce qui résulte aux souches FJT545 et FJT135 (voir **Tableau III**). La production de biohydrogène entre les différentes souches est illustrée à la **figure 8**. Le milieu de culture utilisée a été du M9 avec MES contenant 176 μmol de glucose et les résultats sont exprimés pour 1 ml de culture après 48h d'incubation en condition anaérobie.

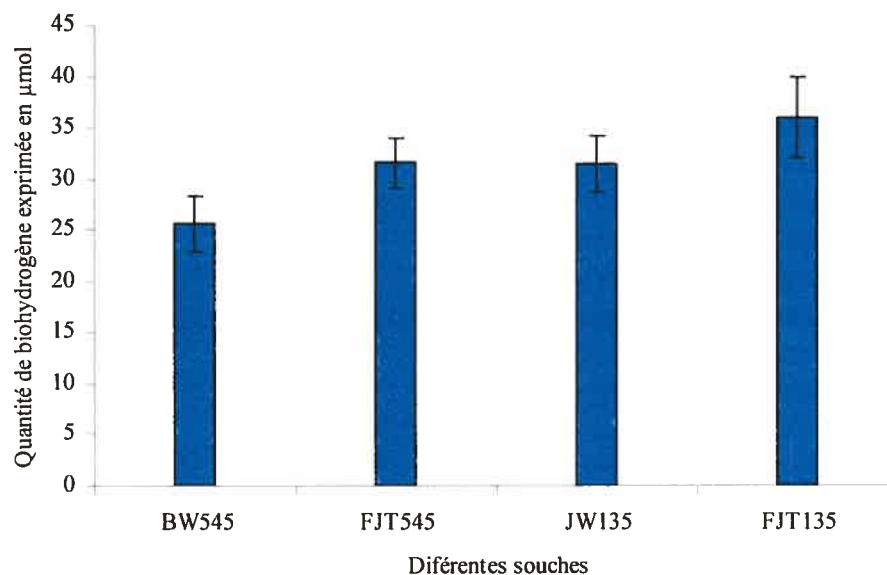


Figure 8 : Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d'*Escherichia coli* BW545, JW135, FJT135 et FJT545

La **figure 8** montre que les souches synthétisant une protéine FhlA indépendante de la quantité de formiate produisent plus de biohydrogène que les souches non mutées.

3.1.2.3 La double mutation (*ldhA* et FhlA)

La production de biohydrogène a été testée lorsque la voie de la lactate déshydrogénase était mutée et lorsque la souche contenait une protéine FhlA indépendante du formiate afin d'étudier les résultats des deux mutations mises ensemble. En effet, le gène *ldhA* a été muté chez la souche sauvage d'*E. coli* BW545 et chez la souche JW135 en plus de leur introduire également le plasmide pWS165 conférant une protéine FhlA indépendante du formiate. La production de biohydrogène de ses souches a été testée dans les mêmes conditions que pour les souches contenant une seule mutation (LJT135, LJT545, FJT135, FJT545). La **figure 9** représente donc la production de biohydrogène pour les souches d'*E. coli* BW545 et JW135 ainsi que leurs doubles mutantes, DJT545 et DJT135 (voir **Tableau III**).

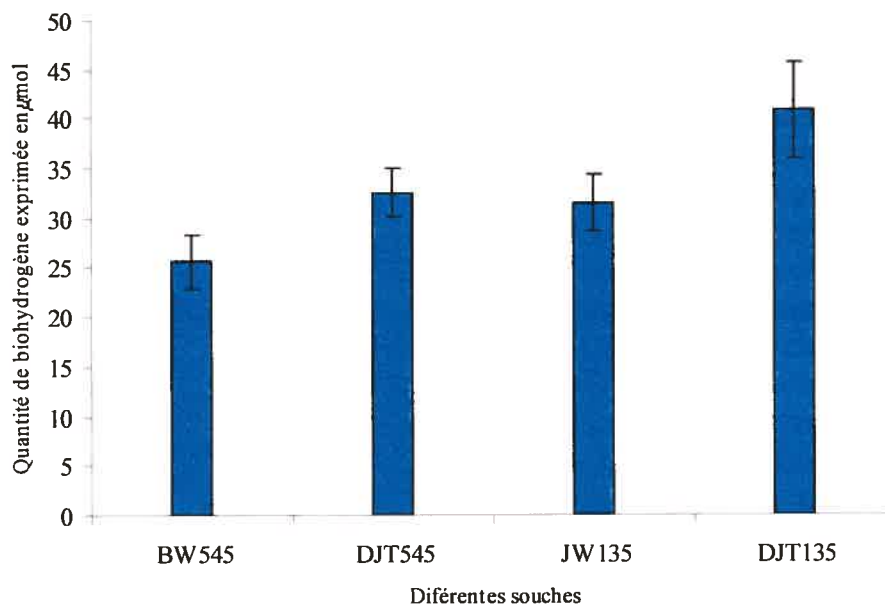


Figure 9 : Production de biohydrogène, exprimé en μmol , des souches d'*Escherichia coli* BW545, JW135, DJT135 et DJT545

La **figure 9** montre une production de biohydrogène pour les souches mutantes plus élevées que pour les souches ne contenant aucune mutation.

3.2 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* EN CONDITIONS LIMITANTES DE GLUCOSE

Après avoir testé les effets des différentes mutations effectuées sur la production de biohydrogène dans un milieu minimal mais non limitant, cette production a été testée, mais cette fois-ci dans des conditions limitantes de glucose.

3.2.1 Concentration de glucose limitante pour la croissance

Les souches d'*E. coli* BW545, JW135, LJT545, LJT135, FLT545, FJT135, DJT545 et DJT135 ont été étudiées lorsque celles-ci se trouvaient en conditions limitantes de nutriments, ici le carbone (glucose), afin de voir l'impact sur la production de biohydrogène. Premièrement, des tests ont été effectués afin de déterminer la concentration de glucose où l'on dénote une certaine limitation de croissance. Pour déterminer cette concentration, plusieurs quantités de glucose ont

été testées allant de 2,25 à 176 μmol et la densité optique (DO_{600}) a été mesurée afin de voir à quelle concentration la croissance de la bactérie était affectée.

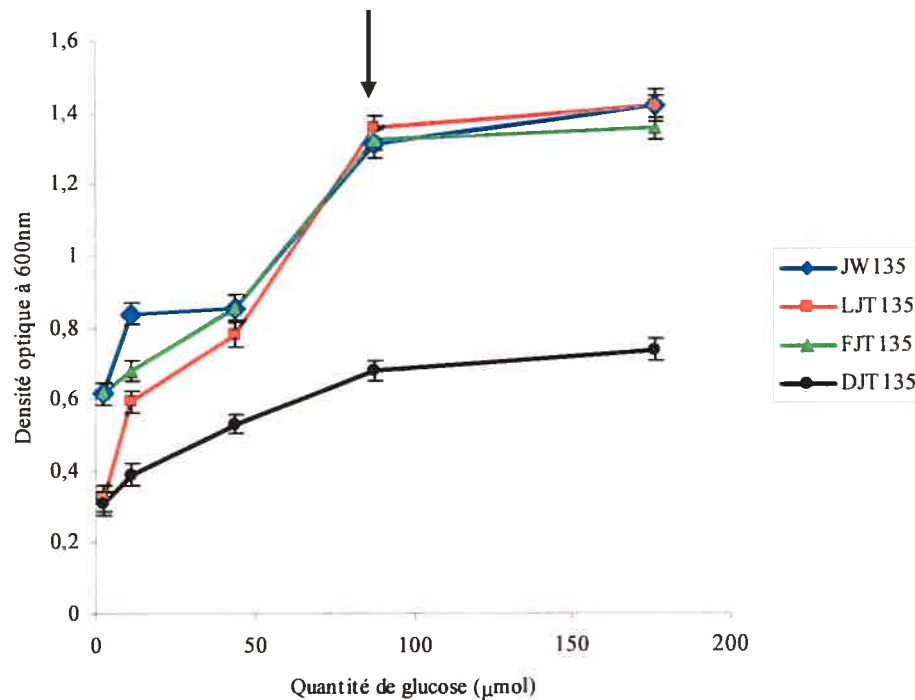


Figure 10 : Comparaison de la densité optique (DO_{600}) pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose

La **figure 10** indique la quantité de glucose où il y a un effet limitant pour la croissance. La flèche qui correspond à 88 μmol de glucose indique la concentration où il y a une baisse de la densité optique.

En ce qui concerne la densité optique pour la souche sauvage *E. coli* BW545 (résultats non montrés) et les mutants dérivés (LJT545, FJT545 et DJT545), les valeurs sont sensiblement les mêmes que les résultats montrés à la **figure 10**.

3.2.2 Production de biohydrogène en condition limitante de glucose

La production de biohydrogène a été étudiée chez toutes les souches d'*E. coli* dérivées de BW545 afin de voir les effets d'une limitation en nutriments, tel que le glucose, sur la production de biohydrogène. Les résultats ont été séparés en deux graphiques afin d'en alléger le contenu. Dans la première figure (**Figure 11**), les résultats pour les souches BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 sont décrits tandis que dans la seconde figure (**Figure 12**), ce sont les résultats pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 qui y sont montrés. Dans les deux cas les souches ont crû dans un milieu minimal M9 (M9 dilué dans un tampon MES) avec des concentrations de glucose variant de 2,25 à 176 μmol . Il faut mentionner que la quantité de culture dans les vials est de 2,3 ml (en tenant compte de la quantité de cellules) donc les résultats sont exprimés pour cette quantité de culture après 48h d'incubation.

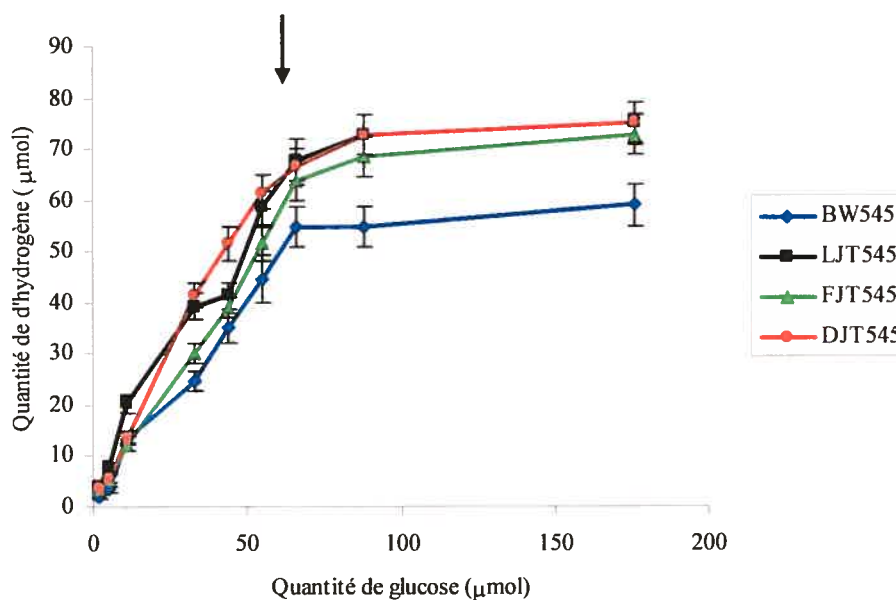


Figure 11 : Comparaison des résultats de production de biohydrogène, exprimés en μmol , pour les 4 souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose

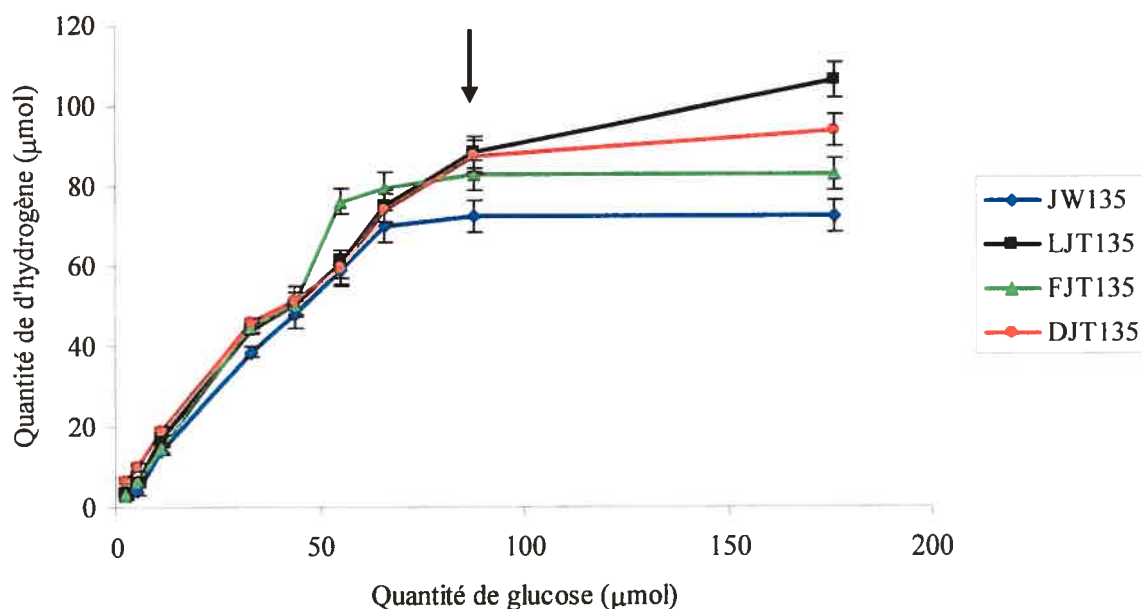


Figure 12 : Comparaison des résultats de production de biohydrogène, exprimés en μmol , pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de glucose

La **figure 11** et la **figure 12** indiquent la production de biohydrogène pour des quantités variables de glucose. La flèche dans les deux cas indique l'endroit où la production se stabilise, où il y a un plateau. À la **figure 12**, en ce qui concerne la souche DJT135, il faut tenir compte du fait qu'il a été montré à la **figure 10** qu'elle avait plus de difficulté à croître que les autres.

3.2.3 Rendement de conversion du glucose en hydrogène

La production de biohydrogène en conditions limitantes de nutriments amène à calculer le rendement de conversion du glucose en hydrogène afin de voir combien de moles d'hydrogène sont produites par mole de glucose consommée. Le rendement pour toutes les souches d'*E. coli* différentes est montré dans les deux graphiques suivants. La **figure 13** montre le rendement de production pour les souches JW135,

LJT135, FJT135 et DJT135 et la **figure 14** comprend les souches BW545, LJT545, FJT545 et DJT545.

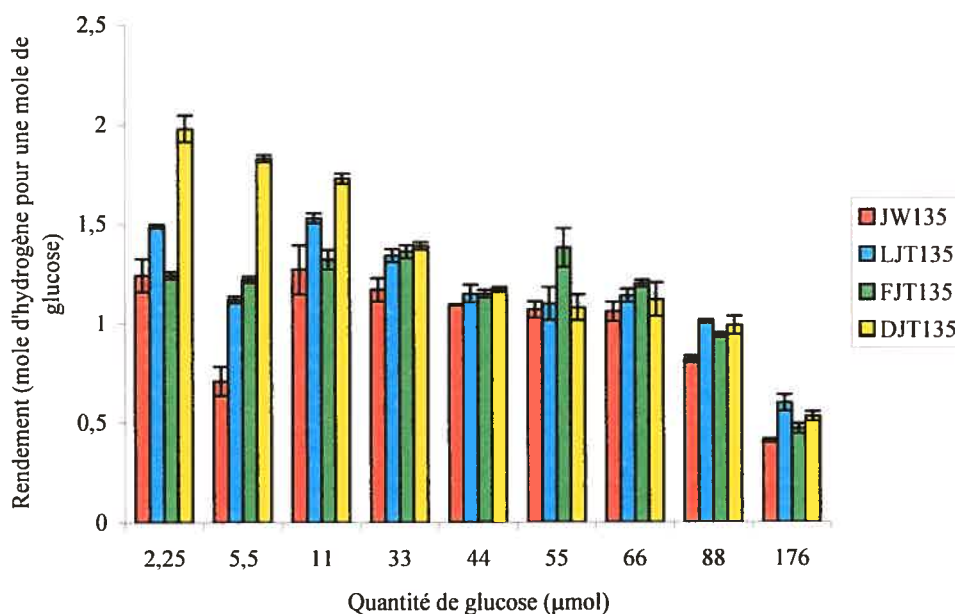


Figure 13 : Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 pour des quantités de glucose variant de 2,25 à 176 μmol

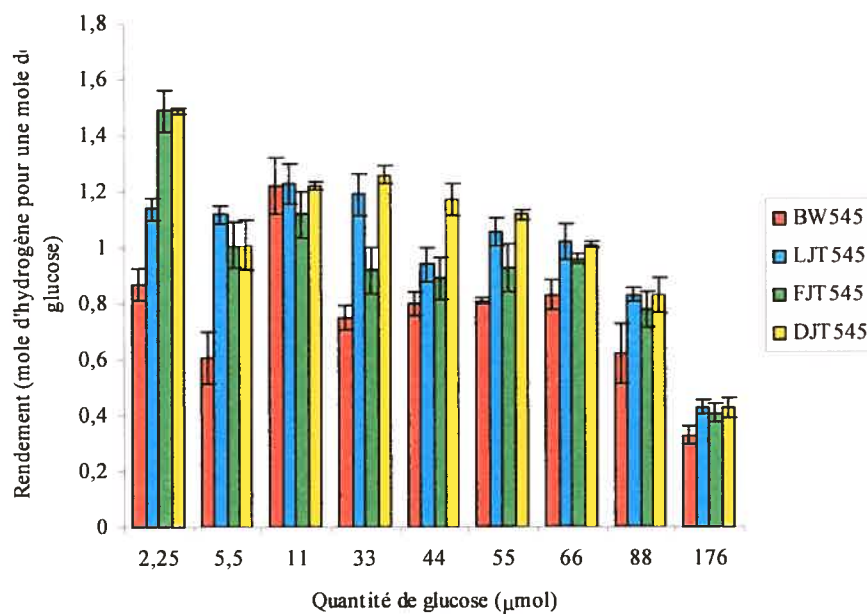


Figure 14 : Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 pour des quantités de glucose variant de 2,25 à 176 μmol

Comme les **figures 13** et **14** comprennent les calculs concernant le rendement de conversion du glucose en hydrogène, il faut tenir compte de la quantité restante de glucose (**Annexe 1**). Le rendement a donc été calculé en soustrayant la quantité de glucose qu'il restait dans le milieu après fermentation. Cependant, la quantité restante étant très minime, le rendement n'a été que très peu changé par rapport au rendement calculé sans tenir compte du glucose restant.

3.3 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* EN CONDITIONS LIMITANTES DE SOUFRE

Les mêmes expériences que celles effectuées pour une limitation de carbone ont été effectuées en conditions limitantes de soufre. C'est-à-dire que l'étude de la densité optique afin de déterminer la quantité limitante, l'étude de la production de biohydrogène en carence de soufre et les calculs de rendement de conversion du glucose en hydrogène ont été effectués.

3.3.1 Concentration de soufre limitante pour la croissance

Afin de déterminer la quantité de soufre étant limitante pour la croissance de nos souches d'*E. coli*, la densité optique à une longueur d'onde de 600nm a été mesurée. Les bactéries ont crû dans un milieu minimal M9 contenant du MES avec des quantités de soufre allant de $1,0 \times 10^{-7}$ à $2,5 \times 10^{-6}$ (0,005% à 0,09%). La quantité de glucose était, quant à elle, non limitante (88 μmol). La **figure 15** montre les résultats pour les différentes souches d'*E. coli* JW135 et ses mutantes. Les résultats pour les souches BW545 et les mutants dérivés, dont les résultats n'apparaissent pas, sont pratiquement semblables.

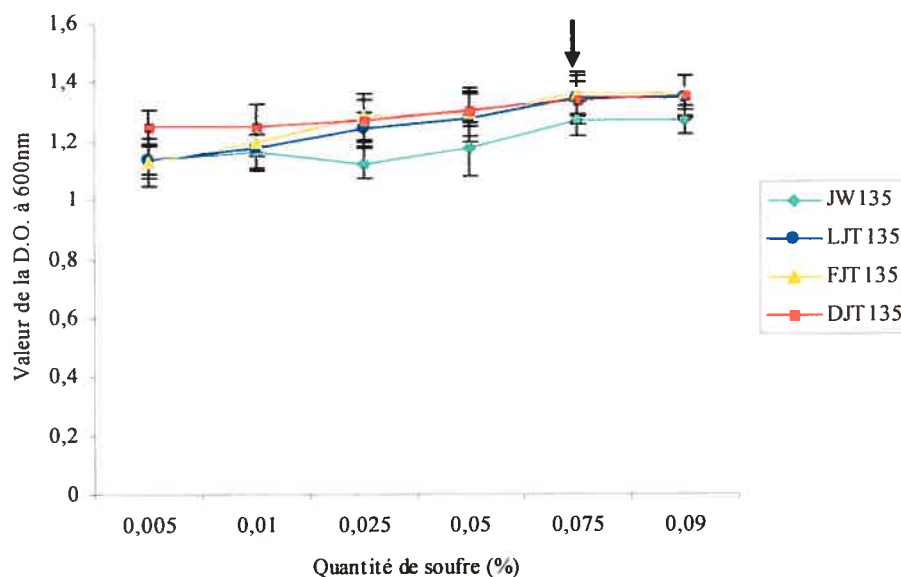


Figure 15 : Comparaison des densités optiques à une longueur d'onde de 600nm pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre

La figure ci-dessus ne montre pas de chute considérable de la densité optique lorsque la quantité de soufre est réduite comparativement aux tests avec glucose (voir **figure 10**). Cependant, en dessous de $1,5 \times 10^{-6}$ moles (0,075%), il y a une légère baisse indiquée par la flèche.

3.3.2 Production de biohydrogène en condition limitante de soufre

La production de biohydrogène en conditions limitantes pour le soufre a également été mesurée. Comme pour le glucose, la concentration de soufre fût variable dans le milieu afin d'y voir les effets sur la production de biohydrogène. Le même milieu de culture, soit le milieu minimal M9 (concentration de soufre allant de $1,0 \times 10^{-7}$ à $2,5 \times 10^{-6}$ moles et 88 μmol de glucose) avec du MES, a été utilisé et le tout incubé en anaérobie pendant 48h. La quantité de culture, comme pour les tests de glucose, a été de 2,3 ml par vial.

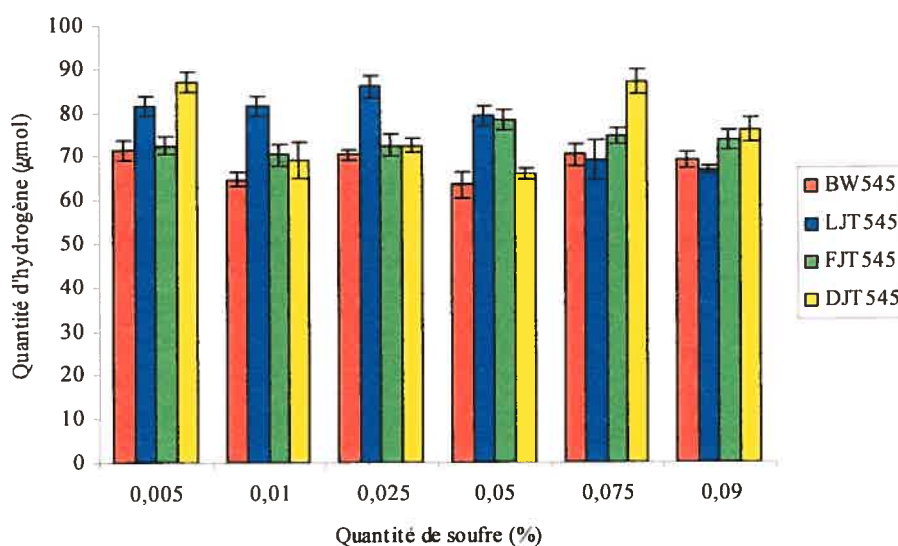


Figure 16 : Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimés en μmol) pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre

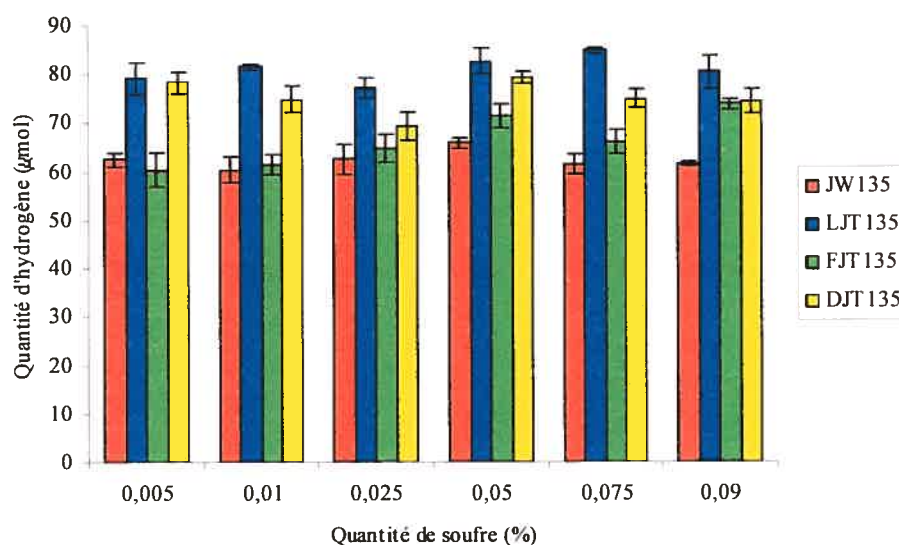


Figure 17 : Comparaison des résultats de production de biohydrogène (exprimés en μmol) pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 après 48h d'incubation avec concentrations variables de soufre

Les deux figures ci-dessus (16 et 17) ne montrent aucunes variations significatives en ce qui concerne la production de biohydrogène par rapport à la

quantité de soufre dans le milieu. Il y a plutôt apparence d'un plateau de production même en limitation de soufre.

3.3.3 Rendement de conversion du glucose en hydrogène

Comme pour les expériences en conditions limitante de glucose, le rendement de conversion d'une mole de glucose en mole d'hydrogène a été calculé. Les figures 18 et 19 représentent donc les rendements premièrement pour les souches d'*E. coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 et deuxièmement pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135.

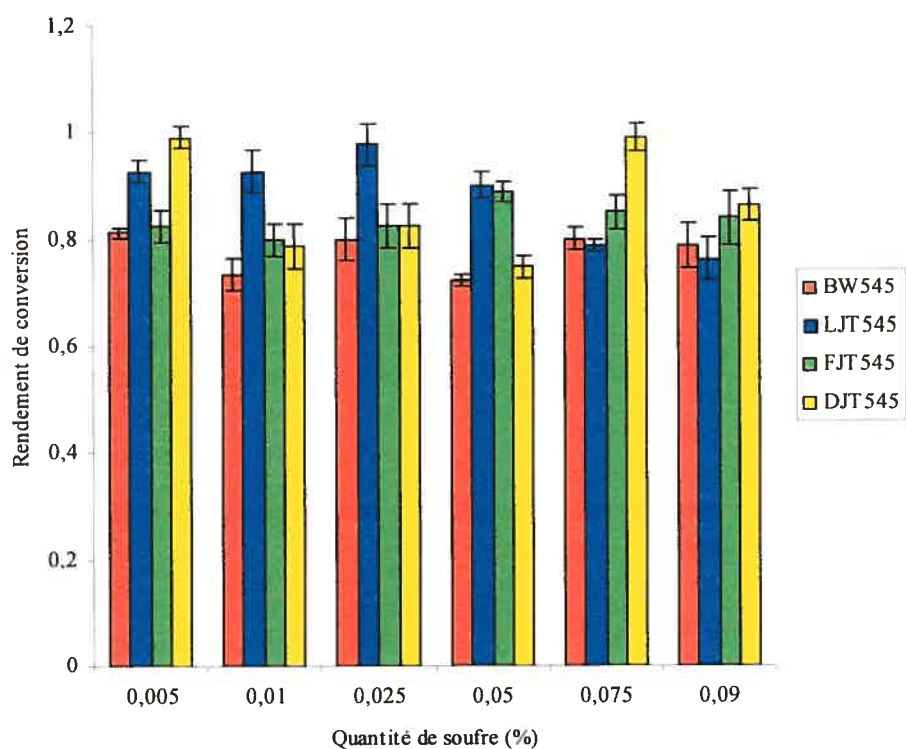


Figure 18 : Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* BW545, LJT545, FJT545 et DJT545 pour des quantités de soufre variant de 0,005 à 0,09%

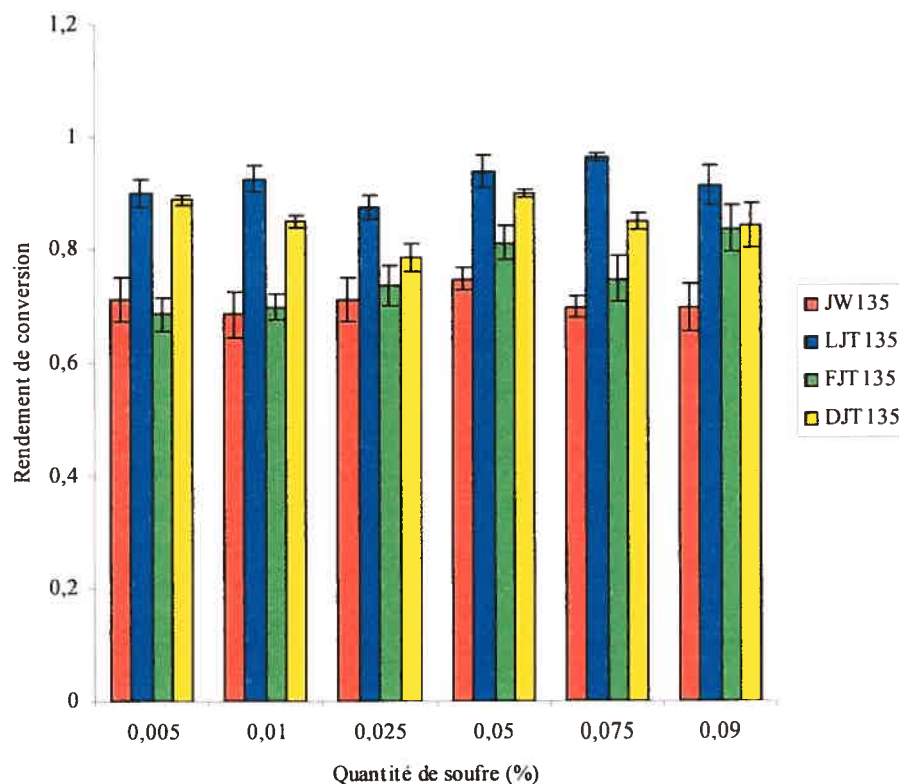


Figure 19 : Rendement de conversion du glucose en biohydrogène pour les souches d'*Escherichia coli* JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 pour des quantités de soufre variant de 0,005 à 0,09%

Comme pour la production de biohydrogène aux figures 16 et 17, aucune variation marquante n'est visible. Il y a, pour les figures 18 et 19 un plateau entre les différentes quantités de soufre en ce qui concerne le rendement de conversion du glucose en hydrogène contrairement à ce qui en est pour les expériences en limitation de glucose. Il est important de mentionner que la quantité de glucose restante après fermentation a été soustraite afin de calculer les rendements (**Annexe 1**).

3.4 PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE POUR DIFFÉRENTES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* EN CROISSANCE EN CONTINU

La production de biohydrogène, lorsque le milieu est limitant en carbone et en soufre, a été étudiée préalablement avec des cultures en lots. Ensuite, nos différentes souches ont été étudiées à l'aide d'un biofermenteur BioFlo[®] 110 de New Brunswick Scientific afin de comparer la production de biohydrogène lorsque les bactéries sont soumises, en conditions limitantes de nutriments, à une régénération du milieu de culture. Tous les tests ont été effectués selon les conditions de croissance décrites au point 2.7.2 de la section procédures expérimentales. Le comportement de la bactérie *E. coli* JW135 et ses dérivées mutantes ont été les seules bactéries étudiées car en lot ce sont ces bactéries qui produisaient le plus de biohydrogène.

3.4.1 La limitation en glucose

La croissance des bactéries a été effectuée en employant 44 μmol de glucose dans le milieu afin d'avoir une quantité limitante de carbone qui donne à la fois une bonne production de biohydrogène et un bon rendement de conversion. Le milieu de culture utilisé a encore une fois été le milieu minimal M9 (avec tampon MES). L'étude de production a été effectuée en faisant varier le taux de dilution du milieu de $0,01\text{h}^{-1}$ (pratiquement sans régénération du milieu) à $0,3\text{h}^{-1}$. Chaque échantillon, comme expliqué au point 2.7.2, ont été pris après 3 à 4 cycles et seulement les résultats pour les dilutions $0,1\text{h}^{-1}$, $0,2\text{h}^{-1}$ et $0,3\text{h}^{-1}$ sont illustrés (les résultats complets sont illustrés à l'Annexe 2 et à l'Annexe 3 pour les tests en limitation de glucose et de soufre). Le **tableau VII** montre donc la production d'hydrogène (exprimé en mmol) et le rendement de conversion (mole d'hydrogène par mole de glucose) pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135. Les résultats comprennent la production de biohydrogène pour une quantité de 750 ml de culture et ils sont calculés par rapport à la quantité d'hydrogène que produirait le fermenteur en 48h.

Tableau VII : Production d'hydrogène et rendement de conversion pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 en conditions limitantes de glucose pour différentes dilutions

Souches	Différentes dilutions					
	0,1h ⁻¹		0,2 ⁻¹		0,3h ⁻¹	
	Production (mmol)	Rendement	Production (mmol)	Rendement	Production (mmol)	Rendement
JW135	16,7 ± 5,2	0,24 ± 0,07	55,6 ± 4,0	0,40 ± 0,03	24,0 ± 5,4	0,12 ± 0,03
LJT135	150,7 ± 8,5	2,19 ± 0,12	73,3 ± 7,5	0,53 ± 0,05	60,7 ± 8,5	0,30 ± 0,04
FJT135	91,8 ± 9,0	1,33 ± 0,13	100,6 ± 7,0	0,73 ± 0,05	104,1 ± 10	0,52 ± 0,05
DJT135	175,6 ± 7,0	2,55 ± 0,10	168,1 ± 9,0	1,22 ± 0,06	155,6 ± 11	0,78 ± 0,06

3.4.2 La limitation en soufre

Tout comme pour le glucose, le soufre a été limiter afin d'affecter la croissance des bactéries. Une quantité de 1×10^{-6} moles du volume total de soufre a été utilisée dans le milieu de culture. La quantité de glucose 88 μmol n'était pas limitante pour la croissance. Les conditions de croissance (voir 2.7.2) ont été les mêmes que pour les tests avec le glucose et les résultats de production d'hydrogène sont également exprimés pour une quantité de culture de 750 ml.

Tableau VIII : Production d'hydrogène et rendement de conversion pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 en conditions limitantes de soufre pour différentes dilutions

Souches	Différentes dilutions					
	0,1h ⁻¹		0,2 ⁻¹		0,3h ⁻¹	
	Production (mmol)	Rendement	Production (mmol)	Rendement	Production (mmol)	Rendement
JW135	42,0 ± 5,0	0,31 ± 0,04	43,7 ± 5,0	0,21 ± 0,03	45,1 ± 4,0	0,16 ± 0,02
LJT135	73,9 ± 6,0	0,54 ± 0,04	70,0 ± 6,0	0,34 ± 0,03	70,9 ± 3,0	0,26 ± 0,01
FJT135	70,0 ± 7,0	0,51 ± 0,05	67,2 ± 9,0	0,33 ± 0,05	71,3 ± 10	0,26 ± 0,04
DJT135	62,5 ± 9,0	0,45 ± 0,07	66,8 ± 10	0,32 ± 0,05	72,2 ± 8,0	0,26 ± 0,03

3.4.3 Synthèse de la production d'hydrogène et du rendement de conversion

Nous avons fait un tableau synthèse comparatif afin de voir les différences de production entre les souches pour une croissance en « batch » et une croissance en continu. Ce tableau comprend uniquement la production et le rendement de conversion pour les souches dérivant de la souche mutée pour les hydrogénases 1 et 2 (JW135, LJT135, FJT135 et DJT135) sur une période de 48h. La production de glucose est exprimée en mmol et le rendement est exprimé par mole d'hydrogène pour une mole de glucose. Les résultats sont exprimés pour 1 ml de culture pour faciliter la comparaison. Donc les résultats des cultures en « batch » qui étaient exprimés pour une quantité de 2,3 ml et ceux en continu pour une quantité de 750 ml ont été ramenés pour une quantité de **1 ml**. Nous avons choisi la dilution $0,1h^{-1}$ puisque c'est à cette dilution que nous avons les meilleurs résultats.

Tableau IX : Comparaison de la production (exprimé en mmol) et du rendement (moles par mole de glucose) pour les souches JW135, LJT135, FJT135 et DJT135 dans des conditions limitantes pour le glucose ($44 \mu\text{mol}$) et le soufre (1×10^{-6} moles) pour les études en « batch » et à l'aide d'un fermenteur (dilution $0,1h^{-1}$)

Souches	Limitation en glucose				Limitation en soufre			
	Production (mmol)		Rendement		Production (mmol)		Rendement	
	Continu	lot	Continu	lot	Continu	lot	Continu	lot
JW135	0,02	0,020	0,24	1,09	0,06	0,028	0,31	0,75
LJT135	0,20	0,025	2,19	1,15	0,10	0,035	0,54	0,94
FJT135	0,12	0,025	1,33	1,15	0,09	0,031	0,51	0,81
DJT135	0,23	0,022	2,55	1,17	0,08	0,034	0,45	0,90

Le tableau ci-dessus montre donc que la production d'hydrogène à l'aide d'un fermenteur est beaucoup plus élevée que les cultures en « batch ».

3.5 HYDROGÉNASE I DE *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM*

La fabrication d'un plasmide contenant le gène de l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum* ainsi que la transformation d'une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) par ce plasmide ont été effectuées.

3.5.1 Clonage de l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum*

Afin d'amplifier et d'insérer les sites de restrictions NcoI et BamHI aux extrémités du gène de l'hydrogénase 1 de *C. pasteurianum*, les amorces Sechyd2NcoI et Sechyd4BamHI (**Tableau IV**) ont été utilisées. La **figure 20** montre le gène de 1750Kb amplifié.

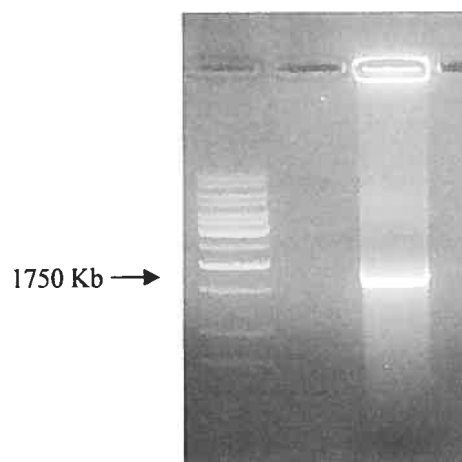


Figure 20 : Résultats du PCR de l'hydrogénase 1 de *Clostridium pasteurianum*

Par la suite, le gène a été digéré avec les enzymes de restrictions NcoI et BamHI et cloné dans le plasmide pMR101. Le plasmide pMR101 est en fait un vecteur d'expression sous contrôle d'un promoteur T7. Le nouveau plasmide, pJT2 a été introduit dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) donnant ainsi la nouvelle souche JTHYD1 (**Tableau III**). Cette souche (*E. coli* BL21 (DE3)) a été choisie car elle a la capacité d'exprimer la T7 ARN polymérase.

Afin de s'assurer de la réussite du clonage, une analyse de restriction a été faite sur un clone et la **figure 21** ci-dessous montre le résultat de la digestion qui est en fait le plasmide et l'insert (1750Kb).

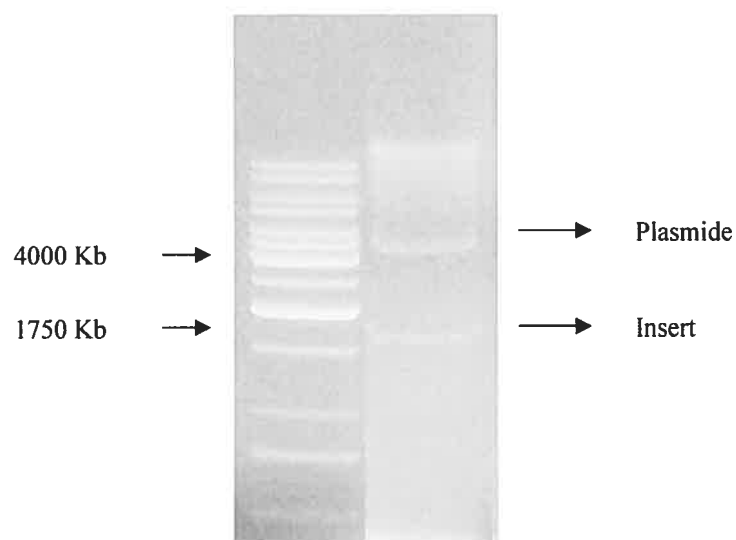


Figure 21 : Analyse de restriction sur le plasmide pJT2 digéré par les enzymes NcoI et BamHI

À partir de ce point nous avons introduit un second plasmide, pMS475, qui confère à la cellule l'ayant reçu, les enzymes nécessaires à la fabrication des centres fer-soufre. Il est important de mentionner que le plasmide pJT2 dérivant de pMR101 contient une origine de réplication p15A étant donc compatible avec le second plasmide inséré, pMS475 qui lui contient une origine ColE1. Ce nouveau plasmide, pMS475 contient un gène de résistance à l'ampicilline ce qui fait en sorte qu'avec le plasmide pJT2, résistant à la kanamycine, la nouvelle souche contenant ces deux plasmides, JTHYD2, est résistante à la kanamycine et à l'ampicilline.

Nous avons donc par la suite testé la production de biohydrogène par chromatographie en comparant la souche BL21 (DE3), JTHYD1 et JTHYD2 afin de voir les effets des différents plasmides. Les résultats ne sont pas illustrés puisqu'il n'y avait aucune différence entre les deux souches. En effet, la production de biohydrogène s'est avérée identique et de l'ordre de 30 $\mu\text{mol/ml}$ pour les deux souches après 48h.

CHAPITRE IV
DISCUSSION

Des études concernant l'adaptation des microorganismes à des milieux pauvres en nutriments ont été menées depuis bien longtemps et sous bien des conditions. Des conditions comme la limitation en carbone, en phosphate, en soufre, en oxygène et bien d'autres ont été testées avec plusieurs microorganismes en croissance en « batch » et en continu. Des réactions de divers gènes ont été testées, comme par exemple les gènes *mgl* ou *gal* (Death et al. 1994) pour ne nommer que ceux-la. Toutefois, la production de biohydrogène des bactéries tels que l'entérobactérie *Escherichia coli* n'a pratiquement jamais été testée en conditions limitantes de nutriments tels que le glucose ou le soufre.

Parallèlement, comme expliqué auparavant, la fermentation s'avère la nouvelle voie de production de biohydrogène comme source d'énergie pouvant être utilisée remplaçant ainsi des techniques comme la biophotolyse par exemple. Cependant, les rendements de conversion du glucose en biohydrogène sont très bas donnant au plus 2 moles d'hydrogène par mole de glucose pour une bactérie anaérobie facultative comme *Escherichia coli* (Nath et al. 2004). C'est pourquoi, nous avons essayé d'optimiser la production de biohydrogène en étudiant l'effet des limitations en glucose ou en soufre sur la production d'hydrogène en plus de l'effet de deux mutations, une dans le gène *ldhA* et une autre concernant la protéine FhlA. Donc, nos expériences rejoignent deux buts qui sont en fait de voir les effets d'une limitation en nutriments sur la production de biohydrogène et de tester quelques mutations afin d'augmenter le rendement de conversion du glucose en hydrogène.

Lors de nos études, nous avons travaillé avec des souches d'*Escherichia coli* toutes dérivées de la souche BW545 (**Tableau III**). La première expérience consistait à comparer la souche BW545 et la souche JW135 afin de voir les effets de l'inactivation des hydrogénases 1 et 2 sur la production de biohydrogène. Nous avons premièrement mesuré la densité optique pour vérifier si les mutations avaient un effet négatif sur la croissance et tout s'est avéré normal puisque les densités étaient pratiquement identiques (résultats non illustrés). En ce qui concerne la production de biohydrogène, nous pouvons voir une augmentation de 23% chez la souche JW135. Ce résultat était en fait attendu puisqu'il a été démontré que les hydrogénases 1 et 2 consomment de l'hydrogène (Menon et al. 1994). Donc une fois ces hydrogénases inactivées, il est logique d'avoir une plus

grande quantité de biohydrogène produit. De plus, avec une meilleure production et aucun effet négatif, il est intéressant de travailler avec une souche mutée plutôt qu'une souche non mutée.

Nous avons ensuite introduit un gène *ldhA* muté dans la souche sauvage BW545 et dans la souche JW135 par transduction à l'aide du phage P1. Cette mutation est en fait une inactivation de la voie de la lactate déshydrogénase produisant le lactate lors de la fermentation acides mixtes. Nous pensons pouvoir récupérer le pyruvate perdu lors de la production de lactate. Comme il a déjà été démontré que l'inactivation de cette voie n'affectait pas la croissance (Mat-Jan et al. 1989), nous avons pu tester la production de biohydrogène sans problème. Nous avons premièrement analysé les produits de fermentation afin d'y voir l'effet de cette inactivation. De cette analyse, nous remarquons qu'il n'y a plus de trace de lactate, confirmant que la mutation a fonctionné. De plus, nous voyons une faible quantité d'acétate et de formiate. Le peu de formiate présent s'explique par le fait que la production d'hydrogène vient justement de l'acide formique (**Figure 2**), donc plus il y a d'hydrogène de produit, moins il y a d'acide formique dans le milieu. Concernant la faible quantité d'acétate, ce résultat est normal et a déjà été démontré par Holms et al. en 1989. En effet, cette équipe a démontré que lorsque les cellules sont mises dans un milieu où il y a un excès de glucose, les bactéries produisent beaucoup d'acétate mais cependant, lorsque l'on met ces dernières dans un milieu limitant en carbone, elles diminuent la production d'acétate et fait un équilibre entre l'entrée de glucose et la production de biomasse.

En ce qui concerne la relation entre la mutation dans *ldhA* et la production de biohydrogène, nous pouvons voir, à la **figure 7**, une augmentation pour les souches LJT545 et LJT135 qui sont les deux souches mutées (mutée *ldhA::Tn10*). Ce résultat confirme donc qu'il y a perte inutile de pyruvate (donc de formiate) lors de la production de lactate. En fait, en se référant à la fermentation acides mixtes (**Figure 2**), nous remarquons que le pyruvate peut soit être converti en lactate, soit être converti en acide formique et en acétyl-CoA par la pyruvate formiate lyase. Donc, comme la mutation résulte en une inactivation de la voie de la lactate déshydrogénase, le pyruvate servant normalement à la production d'acide lactique est récupéré, augmentant ainsi la quantité de formiate qui

engendre par le fait même une augmentation de biohydrogène produit. Et comme l'inactivation de cette voie n'affecte pas la croissance de la souche, il est d'autant plus intéressant de la muter afin d'avoir une plus grande quantité de biohydrogène.

Une seconde expérience consistait à insérer un plasmide dans les deux mêmes souches, BW545 et JW135 en plus des souche mutées LJT545 et LJT135. Ce plasmide, pWS165, possédant un gène codant pour une protéine FhIA indépendante du formiate et du molybdène procure à la cellule l'ayant reçu, une plus haute expression de l'opéron *hyc* (Self et al. 2001). La production de biohydrogène n'ayant jamais été testée, nous pensions qu'une fois le plasmide incorporé, l'analyse de la production d'hydrogène allait démontrer que les souches ayant le plasmide produisent plus d'hydrogène. Comme attendu, les souches ayant reçu le plasmide produisaient plus d'hydrogène que les souches ne l'ayant pas reçu (**Figure 8**). Ceci démontre que si l'opéron *hyc* est surexprimé, la production de biohydrogène est augmentée.

Concernant les souches LJT135 et LJT545 contenant déjà la mutation dans *ldhA* et dans lesquelles nous avons inséré le plasmide pWS165 donnant ainsi les souches doubles mutantes DJT135 et DJT545, nous remarquons que la production de biohydrogène (**Figure 9**) n'est pas plus élevée que la simple mutation *ldhA*. Cependant, nous avons vérifié la densité optique et nous avons remarqué que la souche DJT135 avaient une D.O. d'environ 50% plus faible que les autres souches. Ceci expliquerait donc pourquoi cette souche ne produit pas autant de biohydrogène que ce à quoi nous nous attendions.

Avant d'étudier l'effet de la limitation en glucose sur la production de biohydrogène, il fallait déterminer la concentration à laquelle la croissance était limitée. Nous avons donc analysé plusieurs concentrations de glucose et mesuré la densité optique afin de trouver celle à laquelle la D.O. allait chuter considérablement, considérant ainsi cette concentration de limitante. À la **figure 10**, la flèche indique la dernière concentration de glucose avant d'avoir une chute de croissance. En effet, en dessous de 88 μmol de glucose, la densité optique baisse d'environ 40% pour toutes les souches et un peu moins pour la souche DJT135. Nous avons donc conclu qu'en dessous de 88 μmol , la quantité de

glucose était limitante pour la croissance. Par la suite, nous avons étudié chaque souche en « batch » avec différentes concentrations de glucose, limitantes et non limitantes, afin de voir l'effet sur la production de biohydrogène.

Les **figures 11** et **12** représentent la production de biohydrogène en conditions limitantes de glucose pour la souche BW545 et ses mutantes (**Figure 11**) et pour JW135 et ses mutantes (**Figure 12**). Comme ce que nous envisagions, la quantité d'hydrogène baisse considérablement une fois passé sous la concentration 88 μmol et ce, pour toutes les souches. Il faut également tenir compte que la souche DJT135 croît beaucoup moins bien en « batch » que les autres, c'est pourquoi nous observons une production beaucoup moins élevée pour cette souche. Il faut aussi noter le fait que plus nous limitons la quantité de glucose dans le milieu, plus la quantité de cellules diminue donc, par le fait même, plus la quantité de biohydrogène produit va être faible. C'est pourquoi il est de mise d'étudier le rendement de conversion de glucose en hydrogène pour voir si la limitation joue un réel rôle sur la production d'hydrogène. En effet, nous avons calculé le nombre de moles d'hydrogène produites par mole de glucose. De plus, pour avoir un calcul de rendement plus précis, nous avons fait un dosage de glucose à l'aide d'une trousse de détection afin de voir la quantité de glucose restante après la fermentation (**Annexe 1**).

Les **figures 13** et **14** représentent les rendements premièrement, pour la souche JW135 et les mutants dérivés, et deuxièmement pour la souche BW545 et les mutants dérivés. Si nous comparons les deux figures, nous voyons que le rendement est meilleur pour les souches dérivées de JW135 que pour les souches dérivées de BW545. Ceci s'explique par le fait que la souche JW135 est mutée pour les deux hydrogénases consommant de l'hydrogène. Cependant, si nous regardons les rendements de toutes les souches, nous remarquons qu'ils meilleurs en condition limitante de glucose. Le rendement de conversion atteint même 1,98 moles d'hydrogène pour une mole de glucose à très faible concentration de sucre dans le milieu (2,25 μmol) pour la souche DJT135. Ce résultat suggère donc que lorsque les cellules sont dans un environnement non idéal, elles utilisent les sources de carbone pour la fermentation acides mixtes plutôt que pour les voies métaboliques superflues. Elles délaissent donc les voies non essentielles afin de se concentrer sur leur survie, donc sur la fermentation.

Nous avons ensuite refait les mêmes tests, mais cette fois-ci en limitant le soufre. Nous avons donc essayé de trouver la concentration de soufre à laquelle il y avait une baisse de densité optique, donc la quantité limitante pour la croissance. La **figure 15** illustre cette expérience et bien que la carence en soufre ne semble pas affecter énormément la croissance bactérienne, nous pouvons voir une légère baisse de densité optique en dessous de 0,075% de soufre dans le milieu. Cependant, cette baisse de densité optique n'est pas aussi marquante que pour la limitation en glucose, et ce résultat se reflète sur les études de production de biohydrogène (**Figures 16 et 17**). En effet, aucune tendance n'est présente. De plus, lorsque nous regardons les rendements de production (**Figures 18 et 19**), nous n'y voyons aucune particularité et le rendement atteint en moyenne environ 0,8 mole d'hydrogène par mole de glucose. Evidemment, il faudrait étudier tous les gènes impliqués dans la production d'hydrogène afin de voir si la carence en soufre a ou non un effet. Il est fort possible qu'il y ait un effet non détectable par chromatographie pour les cultures en « batch » et que les effets d'un manque de soufre ne se concrétisent que sur certains gènes ou protéines de régulation par exemple. Nous pensons donc que des études plus poussées pourraient nous aider à mieux comprendre la limitation en soufre. De plus, il est également possible que la quantité de soufre requise pour limiter la croissance soit très minime et que le soufre venant de l'inoculum de départ soit suffisant pour combler le besoin en soufre des cellules, donc que nos cellules ne sont en fait pas en condition limitante de croissance. Ceci expliquerait donc pourquoi nous n'arrivons pas à voir un effet considérable même en petite quantité de soufre (0,005%).

Cette première partie constituait les études en « batch ». Nous voulions également voir les effets en croissance en continu. Des études à l'aide d'un biofermenteur ont donc été effectuées avec les souches JW135 et ses mutants dérivés en condition, premièrement limitante de glucose (44 μmol) et deuxièmement avec une faible quantité de soufre (0,05%). Avec ces études nous voulions voir le comportement des souches lorsque le milieu est régénéré comparativement aux études en « batch ».

Si nous regardons tout d'abord les études en limitation de glucose, nous avons résumé la production de biohydrogène ainsi que le rendement de

conversion pour les principales dilutions étudiées $0,1h^{-1}$, $0,2h^{-1}$ et $0,3h^{-1}$ (**Tableau VII**). Cependant, concernant la production d'hydrogène, chaque bactérie agit différemment. Nous nous attendions à voir une certaine normalisation entre les différentes souches, chose qui n'est pas présente. En effet, il y a de grande variation entre les souches. Par contre, comme nous l'avons déjà démontré en culture en « batch », les souches mutées LJT135, FJT135 et DJT135 produisent plus d'hydrogène que la souche JW135 ce qui est logique puisque nous récupérons l'hydrogène perdu par la voie de la lactate déshydrogénase (LJT135 et DJT135) et parce que la protéine FhIA est toujours active (FJT135 et DJT135). Concernant le rendement de conversion, nous pouvons voir que pour la souche LJT135 et DJT135 nous atteignons respectivement des rendements de 2,19 et 2,55 ce qui confirme que la croissance à l'aide d'un biofermenteur est plus propice à la production de biohydrogène que la croissance en « batch » et que la limitation en glucose ainsi que les mutations dans le gène *ldhA* et *fhlA* ont des effets bénéfiques sur la production et le rendement. Par surcroît, si nous comparons nos rendements de conversion en fermenteur (2,55 avec la souche DJT135) avec d'autres expériences similaires, nous nous rendons compte qu'il sont nettement plus élevés que des souches comme *Enterobacter aerogenes* st. E.82005 dont les rendements ne sont que d'une mole d'hydrogène pour une mole de glucose (Tanisho et al. 1998) ou bien des bactéries comme *Clostridium* sp. qui n'arrivent qu'à avoir des rendements de 1,61 à 2,36 par mole de xylose en fermentation en continu (Taguchi et al. 1995) ou encore d'autres expériences de cultures mixtes avec prédominance de *Clostridium* sp. avec le glucose comme substrat où les rendements assez bas ne dépassent pas 1,43 (Mizuno et al. 2000).

De plus, si nous comparons la production entre les cultures en « batch » et en continu, nous voyons au **tableau IX** que la quantité d'hydrogène est nettement plus élevée lorsque les cellules sont mises dans un fermenteur. Concernant les rendements, mise à part la souche JW135, ils sont également meilleurs en croissance en continu atteignant même plus du double pour la souche DJT135. En fait, il est logique de penser que le fait d'avoir le même milieu de culture pendant plus de 48h (« batch ») fait en sorte qu'il y a une forte accumulation de déchets et surtout d'acide dans le milieu dû aux produits de la fermentation. Donc, comme l'hydrogénase produit de l'hydrogène à pH légèrement acide, une chute drastique du pH en croissance en « batch » inhibe la production de biohydrogène ce qui

explique le fait que la production d'hydrogène est supérieure dans un fermenteur où le pH est contrôlé à 6,40 (Oh et al. 2002). De plus, il est possible que la production d'hydrogène soit meilleure lorsque la bactérie est dans un milieu où elle a une croissance équilibrée (chemostat).

En ce qui concerne les études en limitation de soufre (**Tableau VIII**), nous remarquons que la production d'hydrogène est d'environ la moitié de ce que nous observons pour la limitation en glucose pour une densité optique sensiblement identique. Ce résultat suggère donc que le soufre a peut-être un effet négatif sur la production d'hydrogène. En effet, comme la quantité de glucose dans le milieu est non limitante (88 μmol) nous aurions dû avoir une production d'hydrogène beaucoup plus élevée que pour la limitation en glucose. Ce résultat confirme qu'une faible quantité de soufre n'augmente pas la production d'hydrogène comme nous le pensions, mais la réduit considérablement. Les rendements de conversion sont également très bas et si nous regardons le **Tableau IX**, nous remarquons que les rendements sont plus bas que pour les cultures en « batch ».

À la lumière de nos expériences, nous pouvons affirmer que la croissance en limitation de glucose à l'aide d'un fermenteur avec des souches contenant des mutations favorables à la production d'hydrogène (*ldhA* et *fhlA*) s'avère une très bonne méthode de production avec des rendements atteignant 2,55 ce qui est au-dessus de la moyenne de bien des études faites avec des bactéries anaérobies facultatives ou strictes (Nath et al. 2004). Cependant, des études plus poussées, à l'aide de biopuces par exemple, nous aideraient à mieux comprendre les phénomènes entourant la limitation en nutriments et la production de biohydrogène. En effet, comme le génome d'*Escherichia coli* est séquencé depuis 1997 (Blattner et al. 1997), il serait bon d'analyser la transcription des gènes avant et après avoir mis la souche dans le fermenteur afin de voir quels sont ceux qui sont exprimés ou pas lors d'une limitation en glucose par exemple. Toutes ces études futures nous permettraient de mieux comprendre les phénomènes qui se produisent concernant la production de biohydrogène lorsque les cellules sont mises dans un environnement de stress comme la limitation en nutriments. De plus, afin d'augmenter la production et par surcroît les rendements, une expérience intéressante pour les cultures en lots uniquement serait d'imiter ce qui a

été fait par Tanisho et al. en 1998 qui ont démontré qu'en enlevant le CO₂ du milieu de culture en plus de donner une plus grande quantité d'azote, le rendement était plus élevé passant de 0,52 à 1,58 mole d'hydrogène par mole de glucose. En effet, en enlevant le CO₂, celui-ci est moins disponible pour la fabrication de produits de fermentation comme le succinate, et le NADH récupéré peut servir à augmenter la production d'hydrogène et par le fait même, le rendement (Tanisho et al. 1998).

Nous avons également un autre but qui consistait d'exprimer l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum* (hydrogénase Fe) dans une souche d'*Escherichia coli* afin d'avoir une plus grande production d'hydrogène par cette dernière. Nous sommes donc parti d'une souche d'*Escherichia coli* SMC361 contenant le plasmide pSM654 qui lui contient un gène codant pour l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum*. Nous voulions l'exprimer à l'aide d'un vecteur compatible ColE1 afin d'y insérer un autre plasmide, pSM675, contenant des gènes codant pour les enzymes responsables de la production des centres fer-soufre, peut-être utiles à l'hydrogénase. Nous avons donc cloné par PCR le gène dans pMR101 aux sites BamHI et NcoI. Le résultat du PCR est illustré à la **figure 20** et montre bien le fragment de 1750 Kb amplifié. Le tout a été cloné dans pMR101 devenant ainsi pJT2. Comme le plasmide pMR101 contient un promoteur T7, nous avons transformé la souche BL21 (DE3) avec le plasmide car cette souche d'*Escherichia coli* code pour la T7 ARN polymérase. Nous avons par la suite extrait le plasmide de la souche BL21 (DE3) transformée (JTHYD1) et vérifié le clonage par une étude à l'aide d'enzymes de restriction. La **figure 21** montre que le fragment est bel et bien présent.

Nous avons ensuite vérifié la production de biohydrogène de la souche JTHYD2 contenant le plasmide pJT2 et pSM475. Nous avons comparé la production d'hydrogène de cette souche avec la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) et nous n'y avons vu aucune différence ce qui laisse croire que la protéine pourrait ne pas être exprimée ou bien qu'elle est non fonctionnelle dans une souche d'*E. coli*. Cependant, comme nous avons un plasmide multi copies, nous aurions dû voir la protéine surexprimée sur un gel SDS ce qui n'a pas été le cas. Il est certain qu'afin de bien vérifier toutes les possibilités, il faudrait produire des anticorps spécifiques à l'hydrogénase afin de vérifier si elle est bel et bien exprimée. À

partir de ce point, de meilleures conclusions pourront être tirées. Pour l'instant, nous avons fait que fabriquer la souche et tester la production d'hydrogène. Il suffira, dans des études futures, de purifier l'hydrogénase, de faire des anticorps spécifiques et de voir si elle est exprimée et si c'est le cas, essayer de savoir pourquoi elle n'est pas fonctionnelle.

CONCLUSION

En conclusion, nos études nous ont permis de démontrer que les rendements de conversion du glucose en hydrogène sont meilleurs lorsque les cellules sont dans un environnement limitant pour le glucose et lorsqu'elles sont en croissance en continu plutôt qu'en croissance en «batch». Nous avons également démontré que des mutations dans les gènes *ldhA* et *fhlA* avaient des effets positifs sur la production d'hydrogène mais que la limitation en soufre n'apportait pas les résultats escomptés. De plus, nous n'avons rien noté de concluant en ce qui concerne la production d'hydrogène par l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum*. Par contre, des études futures pourraient être effectuées sur cette hydrogénase puisque ce n'est que le commencement d'une expérience qui pourrait s'avérer très intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, M.W.W. (1990) The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys Acta* **1020**: 115-145.

Andrews, S.C., Berks, B.C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M.A., Golby, P., et Guest, J.R. (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Journal of Bacteriology* **143**: 3633-3647.

Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., et Bronsted, L. (1997) Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *Journal of Bacteriology* **179**: 2141-2146.

Axley, M.J., Grahame, D.D., et Stadtman, T.C. (1990) *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* **265**: 18213-18218.

Bagramyan, K., Mnatsakanyan, N., Poladian, A., Vassilian, A., et Trchounian, A. (2002) The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F_0F_1 -ATPase, in H_2 production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. *FEBS letters* **516**: 172-178.

Bagramyan, K., Mnatsakanyan, N., et Trchounian, A. (2003) Formate increases the F_0F_1 -ATPase activity in *Escherichia coli* growing on glucose under anaerobic conditions at slightly alkaline pH. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **306**: 361-365.

Ballantine, S.P., et Boxer, D.H. (1986) Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **156**: 277-284.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K, Mayhey, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., et Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.

Blokesch, M., et Bock, A. (2002) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *Journal of Molecular Biology* **324**: 287-296.

Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C., et Sun, P.D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science*. **275**: 1305-1308.

Brondsted, L., et Atlung, T. (1994) Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**: 5423-5428.

Bunch, P.K., Mat-Jan, F., Lee, N. et Clark, D.P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 187-195.

Carlson, R., et Srienc, F. (2004) Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: identification of reactions. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 1-19.

Clark, D.P. (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* **63**: 223-234.

Conradt, H., Hohmann-Berger, M., Hohmann, H-P., Blaschkowski, H.P., et Knappe, J. (1984) Pyruvate formate-lyase (inactive form) and pyruvate formate-lyase activating enzyme of *Escherichia coli*: isolation and structural properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1**: 133-142.

Death, A., et Ferenci, T. (1994) Between feast and famine. Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *Journal of Bacteriology* **176**: 5101-5107.

Evans, D.J., et Pickett, C.J. (2003) Chemistry and the hydrogenases. *Chem. Soc. Rev.* **32**: 268-275.

Ferenci, T. (1999) Regulation by nutrient limitation. *Current opinion in Microbiology* **2**: 208-213.

Hasona, A., Self, W.T., Ray, R.M., et Shanmugam, K.T. (1998) Molybdate-dependent transcription of *hyc* and *nar* operons of *Escherichia coli* requires MoeE protein and ModE-molybdate. *FEMS Microbiology letters.* **169**: 111-116.

Hallenbeck, P.C., et Benemann, J.R. (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* **27**: 1185-1193.

Haugaard, N. (1959) D- and L-lactic acid oxidases of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **31**: 222-271.

Holms, WH., et El-Mansi, EM. (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2875-2883.

Hopper, S., Babst, M., Schlensog, V, Fisher, H.M., Hennecke, H., et Bock, A. (1994) Regulated expression in vitro of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 19597-19604.

Hube, M., Blokesch, M., et Bock A. (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *Journal of Bacteriology* **184**: 3879-3885.

Ingledeu, W.J., et Poole, R.K. (1984) The respiratory chain of *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **48**: 222-271.

Jacobi, A., Rossmann, R., et Bock, A. (1992) The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzyme in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **158**: 444-451.

Jiang, G.R., Nikolova, S., et Clark, D.P. (2001) Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**: 2437-2446.

Jormakka, M., Byrne, B., et Iwata, So. (2003) Formate dehydrogenase – a versatile enzyme in changing environments. *Current opinion in structural biology.* **13**: 418-423.

King, P.W., et Przybyla, A.E. (1999) Response of *hya* expression to external pH in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 5250-5256.

Kline, E.S., et Mahler, E.R. (1965) The lactic acid dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **119**: 905-917.

Knappe, J., Schacht, J., Möckel, W., Höpner, Th., Vetter, H., et Edenharder, R. (1969) Pyruvate formate-lyase reaction in *Escherichia coli*: The enzymatic system converting an inactive form of the lyase into the catalytically active enzyme. *European J. Biochem* **11**: 316-327.

Knappe, J., et Schmitt, T. (1976) A novel reaction of S-adenosyl-L-methionine correlated with the activation of pyruvate formate-lyase. *Biochemical and biophysical research communications* **71**: 1110-1117.

Lendenmann, U., Snozzi, M., et Egli, T. (2000) Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture. *Can. J. Microbiol.* **46**: 72-80.

Lengeler, J.W. (1993) Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? *Antonie van Leeuwenhoek* **63**: 271-288.

Leonhartsberger, S., Ehrenreich, A., et Bock, A. (2000) Analysis of the domain structure and the DNA binding site of the transcriptional activator FhlA. *European Journal of Biochemistry* **267**: 3672-3684.

Levin, D.B., Pitt, L., et Love, M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* **29**: 173-185.

Maier, T., Binder, U., et Bock, A. (1996) Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: two genes (*hydN* and *hypF*) involved in formate and hydrogen metabolism. *Arch Microbiol.* **165**: 333-341.

Manché, K., Notley-McRobb, L., et Ferenci, T. (1999) Mutational adaptation of *Escherichia coli* to glucose limitation involves distinct evolutionary pathways in aerobic and oxygen-limited environments. *Genetics* **153**: 5-12.

Mat-Jan, F., Alam, K.Y., et Clark, D.P. (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* **171**: 342-348.

Maupin, J.A., et Shanmugam, K.T. (1990) Genetic regulation of formate hydrogenlyase of *Escherichia coli*: role of the *fhlA* gene product as a transcriptional activator for a new regulatory gene, *fhlB*. *Journal of Bacteriology.* **172**: 4798-4806.

Menon, N.K., Chatelus, C.Y, Dervartanian, M., Wendt, J.C., Shanmugam, K.T., Peck, H.D., et Przybyla, A.E. (1994) Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *Journal of Bacteriology* **176**: 4416-4423.

Menon, N.K., Robbins, J., Peck, H.D., Chatelus, C.Y., Choi, E.S. et Przybyla, A.E. (1990) Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe] hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. *Journal of Bacteriology* **173**: 1969-1977.

Menon, N.K., Robbins, J., Wendt, J.C., Shanmugam, K.T., et Przybyla, A.E. (1991) Mutational analysis and characterization of the *Escherichia coli* *hya* operon, which encodes [NiFe] hydrogenase 1. *Journal of Bacteriology* **173**: 4851-4861.

Mertens, R., et Lieses, A. (2004) Biotechnological applications of hydrogenases. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 343-348.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., et Noike, T. (2000) Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* **73**: 59-65.

Natarajan, A., et Srienc, F. (2000) Glucose uptake rates of single *E.coli* cells grown in glucose-limited chemostat cultures. *Journal of Microbiological Methods* **42**: 87-96.

Nath, K., et Das, D. (2004) Improvement of fermentative hydrogen production : various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65** : 520-529.

Oh, Y-K., Seol, E-H., Weol Lee, E., et Park, S. (2002) Fermentative hydrogen production by a new chemolithotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. *International Journal of Hydrogen Energy* **27**: 1373-1379.

Ordal, E.J., et Halvorson H.O. (1939) A comparison of hydrogen production from sugars and formic acid by normal and variant strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **38**: 199-220.

Penfold, D.W., Forster, C.F., et Macaskie, L.E. (2003) Increased hydrogen production by *Escherichia coli* strain HD701 in comparison with the wild-type parent strain MC4100. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 185-189.

Prescott, K., Harley, P., et Klein, H. (1995) Microbiology, 2nd edition. W.C. Brown Communication, Inc, États-Unis.

Przybyla, A.E., Robbins, J., Menon, N., et Peck, H.D. (1992) Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev.* **8**: 109-135.

Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F., et Bock, A. (1994) Maturation of the large subunit (HYCE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.* **220**: 73-76.

Rossmann, R., Sawers G., et Bock, A. (1991) Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol. Microbiol.* **11**: 2807-2814.

Sankar, P., Lee, J.H., et Shanmugam, K.T. (1988) Gene-Product Relationships of *fhLA* and *fdv* Genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**: 5440-5445.

Sauter, M., Böhm, R., et Bock, A. (1992) Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1523-1532.

Sawers, G. (1994) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Kluwer Academic Publishers* **66**: 57-88.

Sawers, G. et Bock, A. (1988) Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **170**: 5330-5336.

Sawers, R.G., et Boxer, D.H. (1986) Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **156**: 265-275.

Sawers, R.G., Ballantine, S.P., et Boxer, D.H. (1985) Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. *Journal of Bacteriology* **164**: 1324-1331.

Schlenso, V., Lutz, S., et Bock, A. (1994) Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 19590-19596

Sekowska, A., Kung, H-F., et Danchin, A. (2000) Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* **2**: 145-177.

Self, W.T., Grunden, A.M., Hasona, A., et Shanmugam, K.T. (1999) Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon if a secondary transcriptional activator for *hyc* and *nar* operons. *Microbiology* **145**: 41-55.

Self, W.T., Hasona, A., et Shanmugam, K.T. (2001) N-terminal truncations in the FhlA protein result in formate- and MoeA-independent expression of the *hyc* (formate hydrogenlyase) operon of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**: 3093-3104.

Self, W.T., Hasona, A., et Shanmugam, K.T. (2004) Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**: 580-587.

Self, W.T., et Shanmugam, K.T. (2000) Isolation and characterization of mutated FhlA proteins which activate transcription of the *hyc* operon (formate hydrogenlyase) of *Escherichia coli* in the absence of molybdate. *FEMS Microbiology Letters* **184**: 47-52.

Skibinski, D.A.G., Golby, P., Chang, Y., Sargent, F., Hoffman, R., Harper, R., Guest, J.R., Attwood, M.M., Berks, B.C., et Andrews, S.C. (2002) Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the σ^{54} -dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *Journal of Bacteriology* **184**: 6642-6653.

Stephenson, M., et Stickland, L.H. (1931) Hydrogenase: A bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzymes. *Biochem. J.* **25**: 203-214.

Taguchi, F., Mikukami, N., Saito-Taki, T., et Hasegawa, K. (1995) Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. Strain No. 2. *Can J Microbiol* **41**: 536-540.

Tanisho, S., Kuromoto, M., et Kadokura, N. (1998) Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* **23**: 559-563.

Yang, Y-T., et San, K-Y. (1999) Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion. *Metabolic Engineering* **1**: 141-152.

ANNEXE 1

Tableau 1 : Principales valeurs du dosage de glucose pour les souches ayant crû en fermenteur en limitation de glucose ou de soufre dans le fermenteur

Limitation en glucose (1)			Limitation en soufre (2)		
Souche	JW135	nmole de glucose restant	Souche	JW135	nmole de glucose restant
Différentes dilutions effectuées	.1	14.08	Différentes dilutions effectuées	.1	19.17
	.2	45.62		.2	48.3
	.3	40.63		.3	43.70
Souche	LJT135		Souche	LJT135	
Différentes dilutions effectuées	.1	24.08	Différentes dilutions effectuées	.1	24.92
	.2	41.02		.2	41.78
	.3	48.30		.3	41.02
Souche	FJT135		Souche	FJT135	
Différentes dilutions effectuées	.1	17.67	Différentes dilutions effectuées	.1	16.13
	.2	55.97		.2	62.60
	.3	43.45		.3	46.77
Souche	DJT135		Souche	DJT135	
Différentes dilutions effectuées	.1	15.52	Différentes dilutions effectuées	.1	20.50
	.2	29.52		.2	44.08
	.3	48.30		.3	42.93

(1) La quantité de glucose utilisée est de 44000 nmole ou 0.4% du volume total

(2) La quantité de glucose utilisée est de 88000 nmole ou 0.8% du volume total (quantité de glucose non limitante)

Tableau 2 : Principales valeurs du dosage de glucose pour les souches ayant crû en condition limitantes de glucose ou de soufre dans des vials de 10 ml

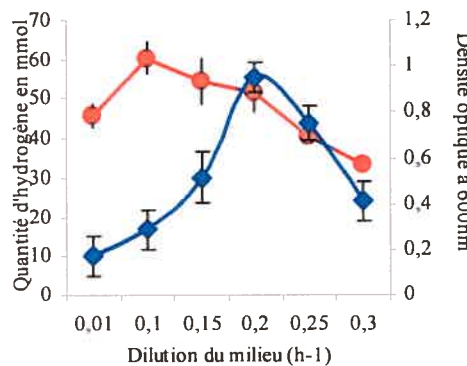
Limitation en glucose			Limitation en soufre (1)		
Souche	JW135	nmole de glucose restant	Souche	JW135	nmole de glucose restant
Quantité de glucose (nmole)	2500 (0.025%)	0	Quantité de soufre (% du volume total)	0.01%	13.03
	11000 (0.1%)	0		0.05%	17.63
	44000 (0.4%)	1.92		0.075%	19.58
	176000 (1.6%)	43.7		0.09%	19.90
Souche	LJT135		Souche	LJT135	
Quantité de glucose (nmole)	2500	0	Quantité de soufre (% du volume total)	0.01%	25.68
	11000	0.77		0.05%	33.18
	44000	1.53		0.075%	44.47
	176000	53.28		0.09%	25.68
Souche	FJT135		Souche	FJT135	
Quantité de glucose (nmole)	2500	0	Quantité de soufre (% du volume total)	0.01%	17.25
	11000	0		0.05%	31.05
	44000	3.07		0.075%	24.22
	176000	42.93		0.09%	19.17
Souche	DJT135		Souche	DJT135	
Quantité de glucose (nmole)	2500	1.92	Quantité de soufre (% du volume total)	0.01%	29.9
	11000	2.3		0.05%	21.88
	44000	6.52		0.075%	26.07
	176000	55.97		0.09%	21.50

(1) : La quantité de glucose au départ pour les limitations de soufre est de 88000 nmole soit 0,8% du volume total

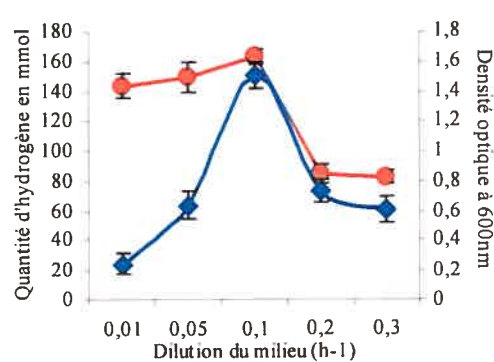
ANNEXE 2

Graphiques représentant la production de biohydrogène (courbe bleue) ainsi que la densité optique (courbe rouge) pour les 4 souches d'*Escherichia coli* étudiées en croissance en continu en conditions limitantes de glucose (44 $\mu\text{mol } \%$). Les dilutions varient de $0,01\text{h}^{-1}$ à $0,3\text{h}^{-1}$ et les résultats sont exprimés en mmol pour 48h de production.

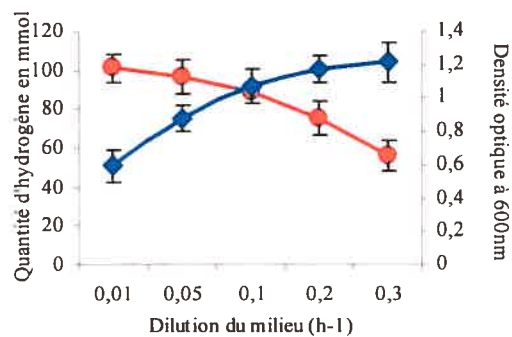
JW135



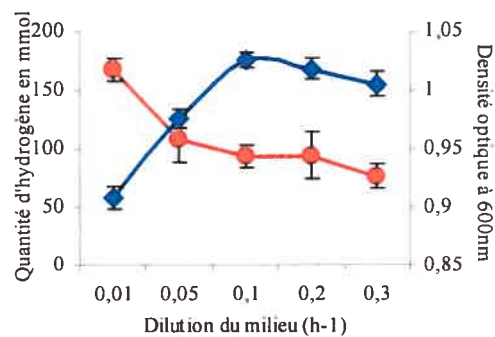
LJT135



FJT135



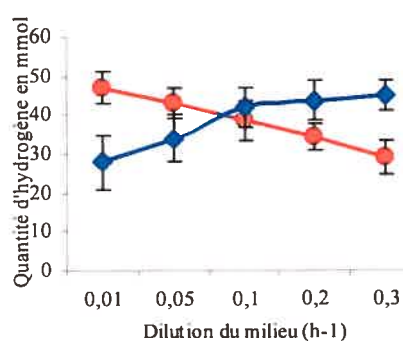
DJT135



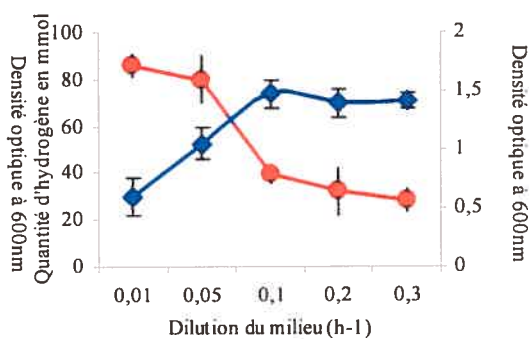
ANNEXE 3

Graphiques représentant la production de biohydrogène (courbe bleue) ainsi que la densité optique (courbe rouge) pour les 4 souches d'*Escherichia coli* étudiées en croissance en continu en conditions limitantes de soufre (0,05 %) et non limitantes de glucose (88 μmol). Les dilutions varient de $0,01\text{h}^{-1}$ à $0,3\text{h}^{-1}$ et les résultats sont exprimés en mmol pour 48h de production.

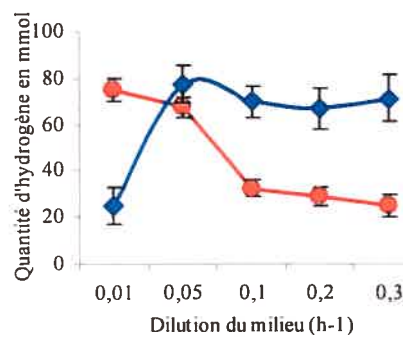
JW135



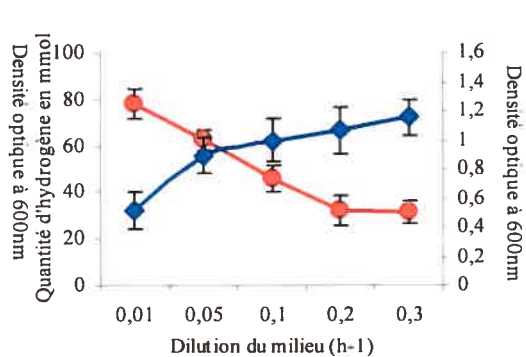
LJT135



FJT135



DJT135



REMERCIEMENTS

Je remercie premièrement mon directeur de recherche, Dr. Patrick C. Hallenbeck, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et supervisé tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier mes partenaires de travail : Amélie Pelletier, Ariane Bisailon et Pier-Luc Tremblay pour avoir créé une bonne ambiance de travail dans le laboratoire.

Je tiens également à remercier ma copine Julie ainsi que mes parents Noëlla et Gilles pour leur support moral tout au long de ma maîtrise.

