HAL
open science

Importance de l'enveloppe cellulaire dans la régulation de la production de glutamate par Corynebacterium glutamicum 2262 au cours d'un procédé thermo-induit

Kenza Amel Boulahya Brihmouche

To cite this version:

Kenza Amel Boulahya Brihmouche. Importance de l'enveloppe cellulaire dans la régulation de la production de glutamate par Corynebacterium glutamicum 2262 au cours d'un procédé thermo-induit. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010. Français. NNT : 2010INPL063N . tel-01748842

HAL Id: tel-01748842

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748842v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires (**ENSAIA**)
Ecole doctorale **R**essources **P**rocédés **P**roduits **E**nvironnement (**RP$_2$E)**
Laboratoire **R**éactions et **G**énie des **P**rocédés (**LRGP**)

THESE

Présentée à l'INPL par

Kenza Amel BOULAHYA-BRIHMOUCHE

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Importance de l'enveloppe cellulaire dans la régulation de la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours d'un procédé thermo-induit

---

Soutenue publiquement le 08 novembre 2010 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mr P. Gervais Professeur à AgroSup Dijon-Université de Bourgogne
Mr A. Guyonvarch Professeur à l'Université Paris-Sud 11

Examinateurs :

Mme M. Tropis Maître de Conférences à l'UPS-IPBS (HDR) Toulouse
Mr J.L. Goergen Professeur à l'ENSAIA-INPL Nancy (directeur de thèse)
Mr S. Delaunay Maître de Conférences à l'ENSAIA-INPL Nancy (Co-directeur)
Mr E. Guedon Chargé de Recherche CNRS, LRGP, Nancy (Co-directeur)

Invité :
Mr J. Boudrant Directeur de Recherche CNRS, LRGP, Nancy

REMERCIEMENTS

Je débute mes remerciements par Monsieur Gabriel WILD directeur du Laboratoire LRGP, puis Madame Annie MARC et enfin Madame Isabelle CHEVALOT, responsables successives de notre équipe de m'avoir accueillie dans leurs locaux.

Je remercie les membres du Jury d'avoir pris le temps de lire cette thèse et d'avoir accepté de juger ce travail.

A mon directeur de thèse Jean-Louis GOERGEN, un grand Monsieur aussi bien physiquement qu'intellectuellement, très critique, très minutieux, très aimable, très compréhensible, très à l'écoute, très humain, très organisé, très pédagogue, très gentil. Un Professeur-chercheur modèle, et je peux continuer longtemps à vous complimenter. Merci de m'avoir accueillie, supportée et épaulée tout au long de mes quatre années passées dans vos locaux. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques ou autres, merci de m'avoir prêté votre bureau pour rédiger cette thèse dans le calme.

Emmanuel GUEDON et Stéphane DELAUNAY, vous êtes les deux piliers ayant porté à bien cette thèse tout au long de ces quatre ans, je vous remercie du fond du cœur du temps que vous m'avez accordée aussi bien sur le plan scientifique qu'humain, j'ai beaucoup appris à vos côtés et je ne vous oublierai jamais. J'ai toujours été fière d'avoir des encadrants avec une culture scientifique aussi diverse et variée.

Merci à Joseph BOUDRANT de m'avoir soutenue tout au long de ces années de thèse.

Je n'oublie pas ceux qui par leur travail ont contribué à consolider cette thèse: Tiphaine Lamant et Raksmey SOK Vong.

Merci aux enseignants : Emmanuel RONDAGS, Laurence MUNERET, Anne-Marie REVOL de m'avoir soutenue afin de mener à bien mon contrat de Monitorat.

Merci à Franck GRATTEPANCHE d'avoir participé à ce travail de thèse, à tes nombreux conseils et discussions scientifiques et surtout tes encouragements à distance.

Je tiens à remercier Monsieur Mamadou DAFFE et Marielle TROPIS de m'avoir accueillie dans leur équipe à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurales (IPBS), un grand merci à toute l'équipe accueillante, serviable et de très bonne

humeur. Un merci particulier à Emilie HUC pour son aide et aussi pour nos nombreuses discussions scientifiques.
Merci à mes collègues thésards du premier et deuxième étage pour tous les bons moments passés ensemble, merci à Françoise, Nazir, Tatiana, Layal, Mika, Mathilde, Caroline, Amel, Claudia, Fred, Arnaud et Marie-Francoise. Merci pour votre aide et discussion en tout genre. Un merci tout particulier à Marie-Françoise d'avoir partagé les moments de rédaction avec moi, d'avoir supporté mes moments de doute et surtout de m'avoir souvent réconfortée.
Je tiens à remercier Evelyne RONAT et Fabrice BLANCHARD pour leur dévouement sans cesse à résoudre les problèmes rencontrés et cela toujours avec un grand sourire. Merci pour votre sympathie et votre force de travail permanentes.
Merci aux femmes de ménages et à Paul pour leur sourire et joie de vivre au quotidien et qui m'ont permis de bien démarrer mes journées de travail.
Je tiens à remercier Stéphane GUILLOUET, enseignant à l'INSA de Toulouse et toute son équipe de m'avoir initiée à la recherche, de m'avoir fait confiance et encouragée tout au long de ma thèse.
Merci à tous les membres des laboratoires voisins que j'ai pu côtoyer de près ou de loin pour leur soutien pendant ces quatre années.
Enfin toutes mes pensées vont vers ma famille de France (Toulouse, Nancy, Martinique et Le Mans,) du Niger et d'Algérie qui m'a soutenue sans relâche tout au long de cette thèse. Merci à Rachida, Chrystelle, Prya, Gabi, Florence et Jean COIFFIER pour vos soutiens au quotidien.
Merci à Samir et Virginie de nous avoir comblés avec l'arrivée de la princesse Iness ; du haut de tes 2 ans tu as ramené la joie dans le cœur de ta tata.
Mes pensées vont également à toi, Nordine ; car cette thèse est aussi la tienne. Je n'oublie pas que tu as passé des nuits blanches avec moi afin de me soutenir, tu es le compagnon de tous les instants, tu m'as encouragée et soutenue pendant ces quatre années souvent chargées de doutes et de stress. Alors ces mots ne suffiront pas à te remercier pour tout ce que tu as fait et tous les compromis que tu as fait pour que je puisse finir ma thèse dans des bonnes conditions.

Enfin comme on dit le meilleur pour la fin, à vous chers parents, sans vous jamais cette thèse n'aurait pas eue lieu alors elle est pour vous.

«Un problème sans solution, est un problème mal posé»

(Albert Einstein)

«None of us got where we are solely by pulling ourselves up by our bootstraps, we got here because somebody bent down and helped us”

(Thurgood Marshal)

«Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement, et les mots pour le dire arrivent aisément»

(Boileau)

INTRODUCTION **12**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **17**

I. Historique de la production du glutamate et classification des micro-organismes utilisés 18

I.A. Historique de la production de glutamate 18

I.B. Classification des souches bactériennes utilisées pour la production du glutamate .. 19

I.C. Procédés de production du glutamate 21

I.C.1. Contraintes chimiques induisant la production d'acide glutamique 22

I.C.2. Facteur physique induisant la surproduction d'acide glutamique : la température 24

I.D. La pression osmotique: un facteur influançant la production du glutamate 25

II. La Voie de biosynthèse du glutamate et sa régulation 26

II.A Voie de biosynthèse 26

II.A.1. Entrée du sucre dans la cellule 26

II.A.2. La glycolyse 29

II.A.3. Le complexe de la Pyruvate Déshydrogénase 30

II.A.4. La voie des pentoses phosphates 31

II.A.5. Cycle de Krebs et voies anaplérotiques chez *C. glutamicum* 32

II.A.6. Synthèse du glutamate à partir de l'α-cétoglutarate 35

II.B. Régulation de la production du glutamate chez *C. glutamicum* 37

II.B.1. Implication des protéines sérine/thréonine kinases (STPK) et déphosphatases dans la régulation intracellulaire 37

II.B.2. Régulation de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) 39

II.B.3. Importance de la modification de l'activité ODH lors de la production de glutamate 41

III. L'enveloppe Cellulaire 42

III.A. L'enveloppe cellulaire des Procaryotes 42

III.A.1. Les bactéries à Gram-négatif 42

III.A.2. Les bactéries à Gram-positif 43

III.B. L'enveloppe des *Corynebacterineae* 44

III.B.1. Généralités 44

III.B.2. Ultrastructure de l'enveloppe des Corynébactéries : les données de microscopie électronique 45
III.B.3. Composition biochimique de l'enveloppe 46
III.B.4. Modèle de l'enveloppe des *Corynebacterineae* 57
III.C. Perméabilité et fluidité de l'enveloppe 59
III.C.1. Perméabilité de la membrane plasmique pour le passage des acides aminés ... 59
III.C.2. Fluidité de la membrane plasmique 63
III.C.3. Perméabilité de la mycomembrane 65
III.C.4. Variation de la fluidité de la mycomembrane lors des procédés de production du glutamate 68
IV. L'induction de la synthèse des HSP suite à un stress thermique 71
IV.A. Généralités 71
IV.B. Les HSP chez *C. glutamicum* 73

RESULTATS ET DISCUSSION 75

Chapitre I : Etude cinétique et métabolique de *C. glutamicum* 2262 et de son variant *C. glutamicum* 2262 NP au cours du procédé discontinu thermo-induit de production de glutamate. 76
I. Influence de l'amplitude de l'élévation de température sur la physiologie et le métabolisme de *C. glutamicum* 2262 76
I.A. Cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production du glutamate 76
I.A.1. Maintien de la température à 33°C 76
I.A.2. Elévation de la température de 33-36°C 77
I.A.3. Elévation de la température de 33 à 37°C 80
I.A.4. Elévation de la température de 33 à 39°C 82
I.B. Activités enzymatiques ODH et PDH 85
I.B.1. Maintien de la température à 33°C 85
I.B.2. Elévation de température de 33 à 36°C 86
I.B.3. Elévation de la température de 33 à 37°C 87
I.B.4. Elévation de la température de 33 à 39°C 88
I.C. Expression des protéines de stress 89

II. Influence de l'amplitude de l'élévation de température sur la physiologie et le métabolisme de *C. glutamicum* 2262 NP 92
II.A. Cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 NP 92
II.A.1. Maintien de la température à 33°C 92
II.A.2. Elévation de la température de 33 à 39°C 93
II.A.3. Elévation de température de 33 à 41°C 95
II.A.4. Elévation de la température de 33 à 43°C 97
II.A.5. Elévation de température de 33 à 45°C 99
II.B. Activités enzymatiques ODH et PDH 101
II. C. Expression des protéines de stress 103

Chapitre II : Effet de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI sur la régulation de l'activité ODH au cours du procédé thermo-induit de production de glutamate. 106
I. Cinétique de déphosphorylation d'OdhI au cours de différents procédés de production de glutamate avec *C. glutamicum* 106
II. Etat de phosphorylation d'OdhI chez *C. glutamicum 2262 pknG::kan* durant le procédé de production du glutamate en limitation de biotine 108
III. Etat de phosphorylation d'OdhI chez *C. glutamicum* 2262 NP suite à une élévation de température 110

Chapitre III : Rôle de la mycomembrane dans la capacité de *Corynebacterium glutamicum* 2262 à excréter du glutamate lors du procédé thermo-induit de production de glutamate 114
I. Importance de la bicouche mycolique lors du procédé thermo-induit de production de glutamate chez *C. glutamicum* 2262 114
II. Composition de l'enveloppe de *C. glutamicum* 2262 NP suite à une variation de température de 33 à 39°C 138
III. Conclusion 140

Chapitre IV : Caractérisation des porines localisées dans la mycomembrane de *C. glutamicum* 143
IV.A. Introduction 143
IV.B. Application de la technique d'extraction des porines à *C. glutamicum* 2262 144

IV.C. Analyse de l'expression des protéines PorB/PorC au cours du procédé thermo-induit de production du glutamate. 147
IV.D. Caractérisation métabolique du quadruple mutant *C. glutamicum* ATCC 13032Δ porABCH 150

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 154

MATERIELS ET METHODES 160
I. Souches utilisées et conditions de culture 161
I.A. Souches utilisées 161
I.A.1. Caractéristiques de la souche *C. glutamicum* 2262 161
I.A.2. Autres Souches de *C. glutamicum* 161
I.B. Conditions de culture 162
I.B.1 Composition des milieux de culture 162
I.B.2 Préparation du milieu de culture 162
I.B.3 Mise en culture des souches 162
II. Techniques de biologie moléculaire 165
II.A. Construction du mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* 165
II.B. Construction du mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* 169
III. Méthodes analytiques 171
III.A. Biomasse 171
III.B. Glucose et Lactate 171
III.C. Glutamate 172
IV. Dosages des activités enzymatiques 172
IV.A. Traitement des échantillons 172
IV.B. Mesure de l'activité pyruvate déshydrogénase (PDH) 173
IV.C. Mesure de l'activité l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) 174
IV.D. Dosage des protéines 175
IV.E. Calcul de l'activité enzymatique 175
V. Analyse de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI 176
V.A. Préparation de l'échantillon 176
V.B. Préparation des gels SDS-PAGE 177
VI. Analyse protéomique par gels d'électrophorèse bidimensionnelle (gel 2D) 177
VI.A. Préparation des échantillons 178

VI.B. Migration selon la première dimension 179
VI.C. Equilibration des strips (extemporanément) 179
VI.D. Migration selon la deuxième dimension 180
VII. Analyse des lipides de l'enveloppe 180
VII.A. Préparation des cellules 180
VII.B. Lipides extractibles 181
VII.C. Obtention des «lipides liés» 181
VII.D. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse 182
VIII. Extraction des porines de la mycomembrane 182
VIII.A. Préparation des cellules 182
VIII.B. Extraction des porines 182
VIII.C. Préparation des gels SDS-PAGE 10% tricine 183

Annexes 184

Annexe I : Préparation des gels d'électrophorèse 185

Annexe II : Solutions et tampons utilisés 186

Annexe III : Solutions et tampons pour l'identification des porines 188

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 190

AccBC: acyl-CoA carboxylase sous-unités B et C
cMyts : corynomycoloyltransférases
GDH: glutamate déshydrogénase
GS/GOGAT: glutamine synthétase/glutamine amide α-cétoglutarate aminotransférase.
FAS : fatty acid synthase
LPD : lipoamide déshydrogénase
PDH: pyruvate déshydrogénase
PTS : phosphotransferase system
Pkn : protéine kinase
PPP : phospho-Ser/Thr phosphatase
PSTK : protéine sérine/thréonine kinase
PK: protéine kinase synthétase
ODH : α-cétoglutarate déshydrogénase

APADH : 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (forme réduite)
CoA: Coenzyme A
CMN: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*
DTT: dithiothréitol
DCMT: dicorynomycolate de tréhalose
DPH: 1,6**-**diphényl-1,3,5-hexatriène
EMP : voie d'Embden-Meyerhof
FADH: flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FHA: domaine forkhead-associate
G+C: guanine + cytosine
HMP: Hexose monophosphate
HSP: Heat Shock Protein
IEF: isoélectrofocalisation
INT-formazan: iodonitrotétrazolium-formazan
NAD(P) H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme réduite)
PI: point isoélectrique
TRP: tétratricopeptide
TMA-DPH: 1-(4-(triméthylammonium)-phényl) 6-phénylhexa-1,3,5-triène
TES: N-Tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthane sulfonate
PASTA: penicillin-binding protein and sérine/thréonine kinase-associated
PPG: polypropylène glycol

kDa: kilo Dalton
Osmol/kg: osmole par kilogramme
ATCC: American Type Culture Collection

Résumé

Lors de ce travail, une étude comparative entre trois souches de *C. glutamicum* a été réalisée. Celles-ci sont *C. glutamicum* 2262, une souche surproductrice de glutamate suite à l'élévation de température du milieu de culture de 33 à 39°C, *C. glutamicum* 2262 NP un variant incapable d'excréter du glutamate dans ces mêmes conditions et *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* un mutant dépourvu de bicouche mycolique externe. Un modèle métabolique original reprenant les différentes modifications physiologiques aboutissant à l'excrétion du glutamate au cours du procédé thermo-induit a été établi. La bicouche mycolique joue un rôle primordial puisque son absence affecte sévèrement la production du glutamate. Dans un premier temps, l'élévation de température serait ressentie au niveau de cette bicouche. Ce ressenti, visualisé par l'accumulation de protéines caractéristiques d'un stress thermique, est nécessaire pour que la bactérie soit en capacité de surproduire le glutamate. Par la suite, la production de glutamate est régulée au niveau de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) grâce à la phosphoprotéine OdhI. Suite au changement de température, celle-ci est déphosphorylée ce qui lui permet d'interagir avec ODH et de provoquer l'inhibition de cette dernière. Ceci se traduit par la redirection sur flux carboné vers la synthèse du glutamate. Aucun de ces évènements n'est observé chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Par ailleurs, l'élévation de température induit une modification de la composition de l'enveloppe cellulaire qui semble intervenir dans le processus physiologique aboutissant à l'excrétion du glutamate puisque très peu de changements sont observés chez *C. glutamicum* 2262 NP.

MOTS CLES:

C. glutamicum, acides corynomycoliques, α-cétoglutarate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, protéines de stress, OdhI.

Introduction

La production du glutamate n'a cessé d'augmenter depuis la découverte de *Corynebacterium glutamicum*. Depuis cette découverte, l'amélioration génétique des souches de *C. glutamicum* a permis la production d'autres acides aminés tels que la L-lysine, la L-isoleucine, la L-thréonine, le L-aspartate, la L-valine et la L-alanine. Cependant l'obtention de L-glutamate représente la principale production d'acides aminés par cette bactérie et la production du L-glutamate atteint les 2 millions de tonnes par an à l'heure actuelle. Le L-glutamate est principalement produit par des sociétés asiatiques telles que Ajinomoto, Kyowa Hakko Kogyo ou CJ Cheil Jedong. La consommation du L-glutamate est particulièrement importante dans les pays asiatiques puisque le glutamate est considéré par les japonais comme étant à l'origine du cinquième goût, le goût Umami.

En raison de son intérêt économique, de multiples études ont été menées sur la production d'acides aminés par *C. glutamicum*. Dans un premier temps, les recherches se sont essentiellement focalisées sur l'amélioration des procédés de production. Actuellement les recherches s'orientent plutôt vers la caractérisation et la compréhension du métabolisme de *C. glutamicum* au cours des procédés de production.

Bien que la production du glutamate par les Corynébactéries ait fait l'objet de nombreuses études, de nombreuses questions restent en suspens, notamment celles concernant les mécanismes d'induction de l'excrétion du glutamate du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire.

Le travail présenté dans ce manuscrit fait suite aux travaux de Delaunay (1999), Lapujade (2000) et de Uy (2003) sur l'étude cinétique et métabolique de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique en mode semi-continu et continu, menés au sein de notre laboratoire. Suite à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C, *C. glutamicum* 2262 est capable d'excréter le glutamate à hauteur de 85 $g.l^{-1}$ (Delaunay, 1999). Le rôle clé de deux complexes enzymatiques (la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH), qui possèdent une sous unité commune) a été mis en évidence. Lors de la production de glutamate par *C. glutamicum* 2262 au cours du procédé thermo-induit, l'inhibition de l'activité ODH est quasi-totale et le flux de carbone acheminé par le cycle de Krebs est alors dévié vers la synthèse du glutamate. Quant à l'activité PDH, elle est fortement ralentie (Uy *et al.*, 2003).

Ces travaux ont été complétés au cours de cette thèse par l'étude de la régulation de l'activité enzymatique ODH par OdhI, (une phosphoprotéine récemment mise en évidence) pendant les phases de croissance et de production du glutamate lors du procédé thermo-induit.

Afin de caractériser davantage cette régulation, l'étude a été poursuivie avec un variant de *C. glutamicum* non-producteur de glutamate (Uy *et al.*, 2003) ainsi qu'avec un mutant, *C. glutamicum* 2262 *Δpks13,* construit au cours de ce travail et incapable de synthétiser la membrane mycolique. Par ailleurs, le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::km* a également été construit afin de clarifier le rôle de la protéine PknG dans la phosphorylation de la protéine OdhI lors du procédé de production du glutamate thermo-induit .

D'après les données de la littérature, le ressenti d'un stress chez les micro-organismes se traduit inévitablement par une surexpression de protéines de stress intracellulaires (HSP). Cette réponse est dite universelle puisqu'elle a été conservée tout au long de l'évolution depuis la bactérie jusqu'à l'homme (Ang *et al.*, 1991). Nous nous sommes particulièrement intéressés au niveau d'expression de ces HSP lors du procédé de production du glutamate thermo-induit. Nous avons notamment cherché l'existence d'un lien entre le ressenti du stress thermique et la production du glutamate. Cette étude a été réalisée chez la souche de référence *C. glutamicum* 2262, le variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP et le mutant *C. glutamicum* 2262 *Δpks13*.

L'enveloppe des Corynébactéries joue un rôle clé dans l'excrétion des acides aminés. Elle représente une véritable barrière de perméabilité aux acides aminés en raison entre autre de la présence d'une mycomembrane formée par des acides mycoliques (Nakamura *et al.*, 2001; Tzvetkov *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2003). Ces auteurs rapportent une amélioration de la production des acides aminés tels que la L-lysine ou le L-glutamate suite à l'inactivation des gènes codant la synthèse du tréhalose ou des acides mycoliques. Dans le dernier volet de ce travail, nous nous sommes donc intéressés d'une part à l'enveloppe et en particulier à sa composition biochimique grâce à une collaboration avec l'équipe de M. Daffé (Institut de Pharmacologie et Biochimie Structurale, Toulouse). D'autre part, l'importance de la présence de la bicouche mycolique pour la production du glutamate et l'expression des porines lors du procédé thermo-induit de production du glutamate ont également été étudiées. En effet à l'heure actuelle, les porines représentent des candidats potentiels qui pourraient assurer le transport des acides aminés à travers la mycomembrane. Pour cela, la caractérisation d'un mutant dépourvu de toute porine, obtenu par l'équipe du Pr. Benz (Université de Würzburg, Allemagne), spécialisée dans l'étude biophysique des porines chez les *Corynebacterineae*, a été réalisée. L'objectif était de tenter d'établir un lien entre l'expression des porines et la sécrétion du glutamate.

La démarche suivie lors de ce travail est schématisée dans la figure 1. Au cours de cette thèse nous tenterons d'approfondir les points et les questions suivants :

Le comportement cinétique de *C. glutamicum* 2262 lors d'un procédé de production d'acide glutamique thermo-induit.

Comment les activités enzymatiques PDH et ODH évoluent-elles lors d'un procédé de production de glutamate thermo-induit en mode discontinu ?

Comment l'activité enzymatique ODH est-elle régulée lors d'un procédé de production de glutamate thermo-induit en mode discontinu ?

Quelles sont les conséquences de la délétion de la mycomembrane chez *C. glutamicum* 2262 lors d'un procédé de production de glutamate thermo-induit en mode discontinu ?

La mycomembrane renferme des porines. Quelles précisions peuvent-elles être apportées quant au rôle de ces dernières lors d'un procédé de production de glutamate thermo-induit en mode discontinu ?

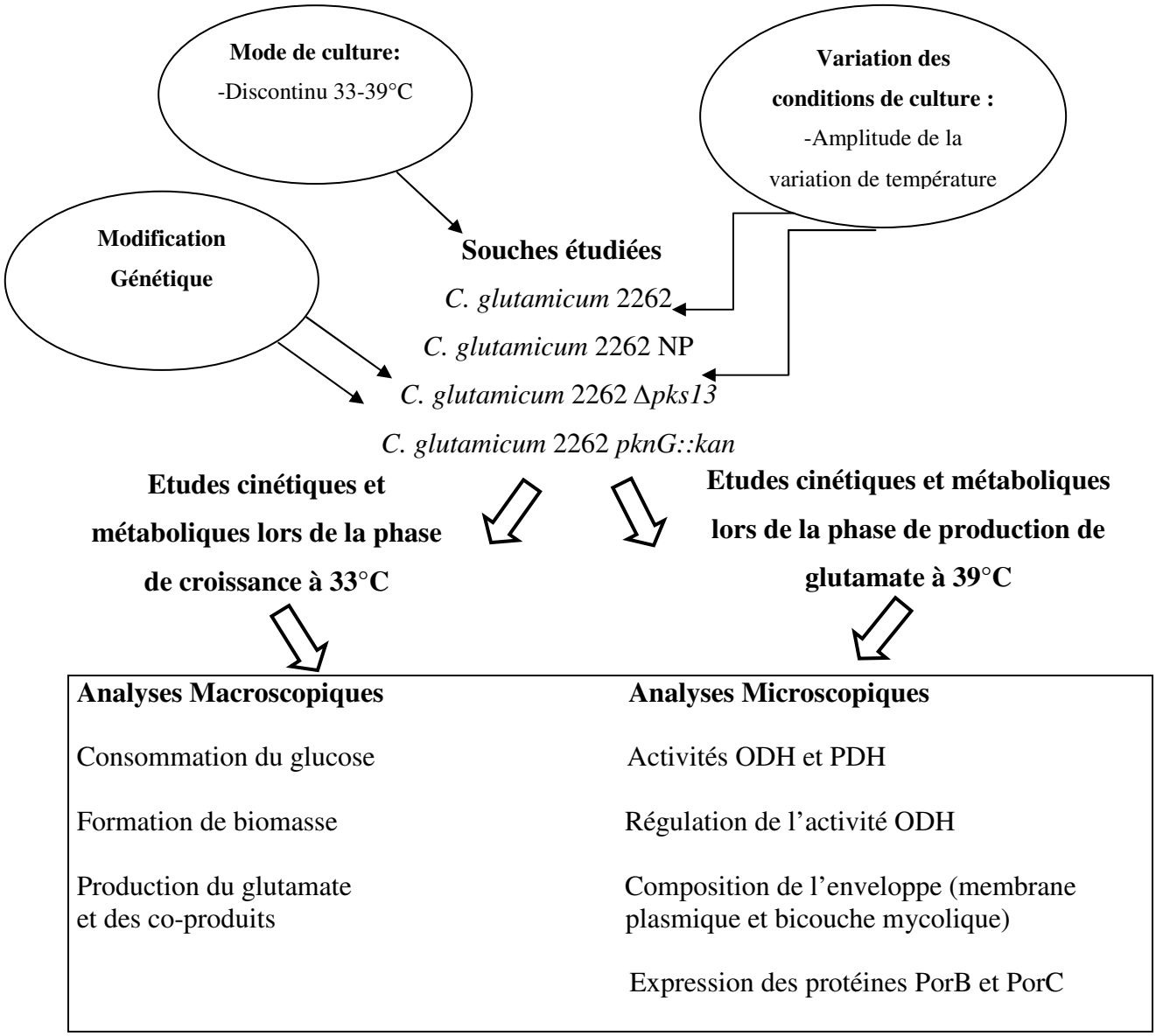


Figure 1 : Démarche suivie au cours de ce travail

Etude bibliographique

I. Historique de la production du glutamate et classification des micro-organismes utilisés

I.A. Historique de la production de glutamate

Le glutamate monosodique est une substance associée à un goût spécifique dit «Umami». Il est largement utilisé dans la cuisine asiatique. Il a été isolé pour la 1ère fois en 1908 par Kikunae Ikeda à partir d'hydrolysats d'algues brunes comestibles nommées «Konbu». Ikeda déclare en 1912 à un congrès international à Chicago: «An attentive taster will find out something common in the complicated taste of asparagus, tomatoes, cheese and meat, which is quite peculiar and cannot be classified under any of the well defined four taste qualities sweet, sour, salty and bitter». Il propose alors de nommer le 5éme goût, l'Umami.

Ajinomoto a été l'une des premières sociétés à produire le glutamate monosodique à l'échelle industrielle par extraction à partir d'hydrolysat de blé. Quelques années plus tard, en 1957, des chercheurs japonais de la société Kyowa Hakko Kogyo isolent dans un échantillon de sol provenant du zoo de Tokyo, une souche de *Corynebacterium glutamicum* initialement nommée *Micrococcus glutamicus* (Kinoshita *et al.*, 1957; Udaka, 1960). Cette même équipe développe alors une méthode de culture pour produire du glutamate à partir de sucre de canne, bon marché, et d'ammoniaque, permettant l'obtention d'une solution pure de L-glutamate exempte de D-glutamate neurotoxique. Actuellement, *C. glutamicum* est la souche la plus utilisée pour produire des acides aminés tels que le glutamate, la lysine, l'arginine, l'histidine et la valine (Eggeling and Sahm, 1999; Hermann, 2003; Ikeda, 2003; Kimura, 2003). Néanmoins, le plus grand marché de ces acides aminés reste celui du glutamate, puisque sa production annuelle a atteint 2 millions de tonnes en 2009 (Sano, 2009) suivie de près par celle de la lysine avec 800000 tonnes en 2007 (Anastassiadis, 2007). Il est employé principalement dans l'industrie alimentaire comme exhausteur de goût, mais aussi par les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Alors que l'amélioration des performances de la fermentation glutamique s'est faite essentiellement par pilotage du procédé, les outils moléculaires et le séquençage du génome ont également permis la production d'autres acides aminés tels que la L-lysine, la L-isoleucine, la L-thréonine, le L-aspartate, la L-valine et la L-alanine. Ces bactéries sont également utilisées en procédé fermentaire pour produire des nucléotides (Inosine ou guanine monophosphate). Ces derniers sont utilisés au Japon comme exhausteur de goût (en particulier en association avec le glutamate) et sont produits soit par fermentation (Ajonomoto, Kyowo Hakko Kogyo) soit par extraction à partir de l'acide

ribonucléique de levure (Asahi, Takeda), une production annuelle de 600 tonnes est obtenue (Kinoshita, 1987; Teshiba, 1989)

A part *C. glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium efficiens, Corynebacterium thermoaminogenes* et *Corynebacterium ammoniages* sont aussi utilisés au niveau industriel.

I.B. Classification des souches bactériennes utilisées pour la production du glutamate

C. glutamicum appartient au groupe supra-génique des *Corynebacterineae*, anciennement désigné «CMN» pour *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, et ce, malgré leur différence sur bien des aspects (Barksdale, 1970). Ils appartiennent à l'ordre des actinomycétales (Figure 2), sont caractérisés par un ADN génomique riche en guanine et en cytosine (% G+C : 53 à 58 %), et se distinguent des autres taxons bactériens par la présence dans leur enveloppe d'acides gras spécifiques, les acides mycoliques. Ces derniers sont des acides gras á-ramifiés et ß-hydroxylés dont la longueur des chaînes carbonées varie selon l'espèce considérée (22 à 90 atomes de carbones). Il est à noter qu'en raison de sa proximité phylogénétique et de sa non-pathogénicité, *C. glutamicum* est aujourd'hui, un modèle d'étude pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre les bactéries pathogènes telles que *Mycobacterium tuberculosis. C. glutamicum* est une bactérie aérobie facultative, à Gram-positif, ne formant pas de spore et est auxotrophe pour la biotine. *C. glutamicum* et d'autres bactéries capables d'excréter du glutamate telles que *Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum* et *Brevibacterium divaritacum* ont été classées en 1994 dans le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology dans le genre *Corynebacterium* et regroupées au sein de l'espèce *C. glutamicum.* Ceci fait suite à des études d'hybridation d'ADN qui ont montré des différences mineures entre les espèces *B. flavum, B. lactofermentum* et *C. glutamicum* (Liebl *et al.*, 1991).

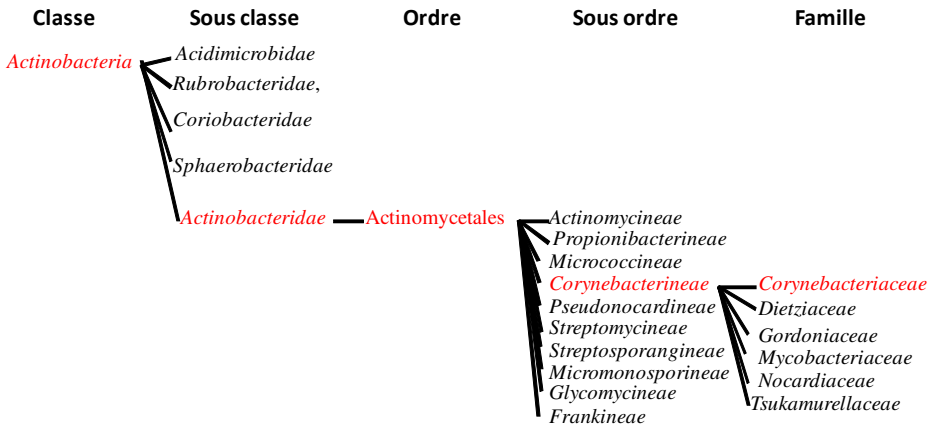


Figure 2 : Classification hiérarchique de la classe des Actinobactéries selon Stckebrandt *et al*. (1997).

Les bactéries du genre *Corynebacterium* se présentent sous forme de bâtonnets, non mobiles souvent de type massue (d'où le préfixe de coryné) et arrangés en V au cours de la division (Figure 3). Les caractéristiques majeures de ce genre sont la présence de l'arabinogalactane et de l'acide méso-diaminopimélique (méso-DAP) dans la paroi, la présence d'acides mycoliques (comportant de 22 à 36 atomes de carbone excepté chez *Corynebacterium amycolatum, Corynebacterium kroppenstedtii et Corynebacterium atypicum*). Elles sont catalase positives. Les ménaquinones (molécules liposolubles présentes dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique servant d'intermédiaires dans le transport des électrons entre les neuf déshydrogénases primaires et les oxydoréductases terminales) sont les seules quinones isoprénoïdes présentes chez *C. glutamicum*. La dihydro-ménaquinone-8 et la ménaquinone-9 sont des composants mineurs alors que la dihydroménaquinone-9 est la molécule majoritaire présente dans la chaîne respiratoire de *C. glutamicum* (Collins *et al.*, 1979; Collins *et al.*, 1977; Kanzaki *et al.*, 1974). La délétion ou la surexpression de gènes impliqués dans la chaîne respiratoire peut influer sur la production des acides aminés. Par exemple, la délétion du gène *shdA* codant la flavoprotéine succinate déshydrogénase (une des neuf déshydrogénases) chez *C. glutamicum* améliore la formation du glutamate (Pfefferle *et al.*, 2001). La surexpression du gène *glbO* codant une protéine capable de fixer l'oxygène a un effet positif sur la production de L-lysine (Möckel *et al.*, 2002).

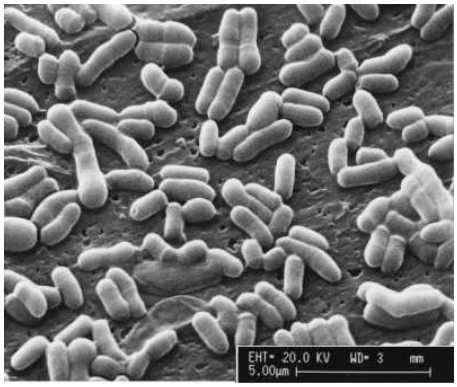


Figure 3 : Morphologie des cellules de *C. glutamicum* cultivées dans un milieu riche et observées au microscope électronique. **Dimension** 1,4 à 2 µm Wehrmann *et al.* (1998).

I.C. Procédés de production du glutamate

La production du L-glutamate par *C. glutamicum* résulte de l'application de contraintes (Figure 4). Initialement, le flux du carbone est utilisé pour la croissance puis une induction est appliquée de façon à faire excréter du glutamate par *C. glutamicum*. Quelle que soit la contrainte appliquée, l'objectif est d'acheminer le flux de carbone vers la production du glutamate. On distingue deux types de contraintes, les contraintes chimiques et les contraintes physiques.

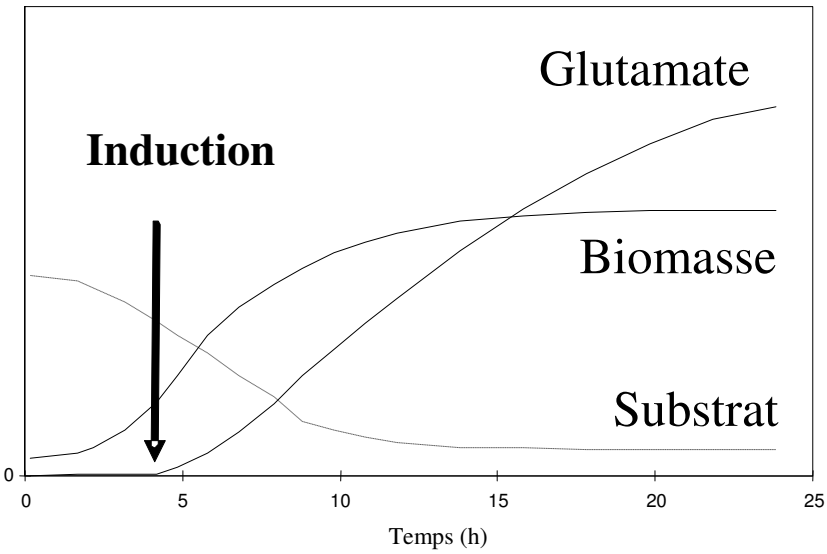


Figure 4 : Cinétique de production du glutamate au cours d'un procédé de production

I.C.1. Contraintes chimiques induisant la production d'acide glutamique

a) La limitation en biotine

C. glutamicum est une bactérie auxotrophe pour la biotine. La limitation en biotine est le premier mode d'induction décrit dans la littérature pour la production de glutamate. Cette auxotrophie à la biotine est probablement due à l'absence chez *C. glutamicum* du gène *bioF*, qui code la 7-céto-8-aminopelargonate synthétase responsable de l'une des étapes de synthèse de la biotine (Hatakeyama *et al.*, 1993a; Hatakeyama *et al.*, 1993b). La biotine est un cofacteur de l'acyl-CoA carboxylase impliquée dans la voie de biosynthèse des acides gras. Sa limitation pendant une fermentation glutamique provoquerait une diminution du taux de phospholipide au niveau de la membrane plasmique et une augmentation du rapport acides gras saturés/ acides gras insaturés qui serait à l'origine de l'excrétion du glutamate. Même si ce procédé reste le plus utilisé en fermentation industrielle, il présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, les performances de ce procédé en terme de concentration glutamate restent faibles. Selon les souches et substrats utilisés, entre 10 et 30 $g.l^{-1}$ d'acides aminés sont produits en culture discontinue (Bona and Moser, 1997; Hoischen and Krâmer, 1989; Takinami *et al.*, 1966). De plus, ce procédé ne permet pas l'utilisation directe de matières premières peu coûteuses, telles que les mélasses de canne puisque celles-ci sont riches en biotine.

b) Ajout de pénicilline

L'excrétion du glutamate est également possible par ajout d'antibiotiques tels que la pénicilline dans le milieu de culture. Le mode d'action de la pénicilline semble différent de celui des autres procédés. L'observation macroscopique d'une souche productrice de glutamate avec ce procédé montre un agrandissement de la taille cellulaire. En effet la pénicilline est un antibiotique qui inhibe la synthèse de la paroi des bactéries. Seule la synthèse du peptidoglycane est affectée mais l'antibiotique ne modifie ni la teneur en acides gras, ni la teneur en phospholipides membranaires (Shibukawa *et al.*, 1968). Ce procédé de production est intéressant, puisque des mélasses de canne peu coûteuses et riches en biotine peuvent être utilisées**.** En utilisant une souche de *B. lactofermentum* productrice de lysine, des concentrations de 57 $g.l^{-1}$ de glutamate et de 75 $g.l^{-1}$ de lysine ont pu être produites simultanément en fermentation semi-continue (Shiratsuchi *et al.*, 1995). Avec ce même procédé, les titres de glutamate atteints en fin de fermentation par *C. glutamicum* et *B.*

lactofermentum sont de 20 et 40 $g.l^{-1}$ respectivement (Kawahara *et al.*, 1997; Nunheimer *et al.*, 1970).

c) Ajout de tensioactif

Contrairement à la pénicilline, l'ajout de tensioactif diminue la quantité de phospholipides cellulaires de plus de 50% et le rapport acides gras saturés/ acides gras insaturés est augmenté (Huchenq *et al.*, 1984). Les protéines AccBC (acyl-CoA carboxylase sous-unités B et C) et DtsR1 peuvent former un complexe avec la biotine et ce complexe est essentiel pour la synthèse des acides gras chez les *Corynebacteriacea*. La répression du gène *dtsR1*, par l'ajout de tensioactif, provoque une modification de la synthèse des phospholipides (Kimura *et al.*, 1996) et donc la production du glutamate. L'ajout de tensioactifs tels que le polyéthylèneglycol stéarate, le polyéthylèneglycol palmitate ou la laurylamine permet d'obtenir un titre final en glutamate compris entre 80 et 100 $g.l^{-1}$ (Marquet *et al.*, 1986). Dans un milieu riche en biotine, l'ajout des détergents tels que le polyoxyéthylène sorbitane monopalmitate (Tween 40) ou le polyoxyéthylène sorbitane monostéarate (Tween 60) permet la production du glutamate (Duperray *et al.*, 1992; Takinami *et al.*, 1965). Des concentrations finales de 80 $g.l^{-1}$ et de 70 $g.l^{-1}$ en glutamate ont également été obtenues en utilisant le Tween 40 avec *C. glutamicum* et *B. lactofermentum* respectivement (Goergen *et al.*, 1997; Shiratsuchi *et al.*, 1995). De même, l'ajout de tensio-actifs acylés à la culture permet l'excrétion du glutamate chez *C. glutamicum,* cependant le titre de glutamate atteint seulement 2 à 4 $g.l^{-1}$ (Huchenq, 1983). Tous les détergents n'induisent pas l'excrétion du glutamate, par exemple l'ajout de Tween 20 (ester d'acide monolaurique) et 80 (ester d'acide mono-oléique) dans le milieu de culture ne permet pas l'excrétion du glutamate. Cette différence d'action des détergents de la même famille sur l'enveloppe des bactéries reste à ce jour inexpliquée.

d) Ajout d'anesthésique local

L'ajout d'un anesthésique local tel que la tétracaïne dans un milieu de culture riche en biotine provoque une excrétion du glutamate par *C. glutamicum* jusque 15 $g.l^{-1}$ (Lambert *et al.*, 1995). La tétracaïne provoque une altération physique de la membrane sans aucune modification de sa composition ni de ses propriétés biochimiques (peu de perte d'ATP et d'ions potassium, potentiel membranaire non affecté, concentration en glutamate intracellulaire constante). L'excrétion du glutamate par l'ajout d'anesthésique est liée à un

processus spécifique, il semble agir sur l'activité du système d'excrétion du glutamate (Lambert *et al.*, 1995).

e) Limitation en acide oléique et glycérol

Des souches de Corynébactéries auxotrophes pour le glycérol ou des acides gras (comme l'acide oléique) produisent du glutamate (Kanzaki *et al.*, 1967; Nakao *et al.*, 1970). En condition de limitation en acide oléique dans le milieu de culture, un titre de glutamate de 100 $g.l^{-1}$ a été atteint avec du glucose comme source de carbone (Miescher, 1975). L'équipe de Nakao s'est intéressée à *Corynebacterium alkanolyticum,* auxotrophe pour le glycérol. Quelle que soit la source de carbone utilisée, la carence en glycérol chez cette bactérie induit l'excrétion d'acide glutamique (Nakao *et al.*, 1970).

I.C.2. Facteur physique induisant la surproduction d'acide glutamique : la température

Lors de la production du glutamate par les différents procédés cités précédemment, la température reste généralement constante pendant toute la fermentation. Le changement de température est un moyen efficace pour limiter la croissance et dévier le flux du carbone vers la production du glutamate. Des souches de *B. lactofermentum* isolées après mutation aléatoire (Momose and Takagi, 1978) sont capables d'excréter du glutamate dans un milieu riche en biotine après augmentation de la température de culture. Une production de 20 $g.l^{-1}$ est obtenue à partir de mélasse de betterave suite à un choc thermique de 30°C à 40°C. Les auteurs n'ont pas déterminé le ou les gènes modifiés. Un procédé de production similaire a été utilisé avec d'autres mutants de *Corynebacterium crenatum* N1 sensibles à la température. Ces mutants produisent une concentration finale de 60 $g.l^{-1}$ de glutamate sur hydrolysat de riz en 26 h et en culture discontinue (Sun *et al.*, 1989)

D'autre part, de nombreuses études ont été réalisées sur la souche thermosensible *C. glutamicum* 2262. Chez cette bactérie, l'excrétion du glutamate est induite par une augmentation brutale de la température du milieu de culture de 33 à 39°C. Cette élévation de température permet une orientation du métabolisme vers une production du glutamate (production de 85 $g.l^{-1}$ de glutamate en 24 h et en mode semi continu) au détriment de la croissance (Delaunay, 1999). De même, l'augmentation de la température à 40°C pendant la phase de production de glutamate permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et de maintenir l'excrétion d'acide glutamique à un niveau plus élevé (Delaunay *et al.*, 2002; Goergen *et al.*, 1997). Ce procédé présente des potentialités très intéressantes puisque la

matière première peu coûteuse est issue des mélasses de canne ou de betterave. De plus, il apparaît très compétitif par rapport au procédé avec ajout de tensio-actifs de par sa simplicité et ses performances.

I.D. La pression osmotique: un facteur influançant la production du glutamate

Bien que la variation de la pression osmotique constitue un stress majeur, les Corynébactéries requièrent ce stress durant la fermentation glutamique. Ainsi pour atteindre une forte production, il est nécessaire d'avoir une pression osmotique suffisamment élevée au début de phase de production (1200 mosmole.kg^{-1}). Cette forte pression osmotique initiale permet un arrêt rapide de la croissance associé à une production élevée de glutamate. Lors de la phase de production, l'osmolarité du milieu augmente progressivement en raison de l'accumulation du glutamate et de l'ajout de NH_4^+. Cette augmentation peut contribuer à la baisse progressive de la productivité (Debay, 1997; Goergen *et al.*, 1997), du taux de croissance et du rendement en biomasse, en raison d'une redistribution du flux carboné vers les mécanismes de réponse au stress osmotique (Guillouet and Engasser, 1995, 1996). Ces mécanismes de réponse sont communs à de très nombreuses bactéries (Imhoff, 1986; Wood, 1999). Chez *C. glutamicum*, en situation de stress hypo-osmotique, pas moins de deux systèmes mécanosensibles sont activés. Ces canaux sont impliqués dans l'osmorégulation bactérienne. Alors qu'un stress hyper-osmotique permet l'activation d'une part d'un système à deux composants (MtrAB) et d'autre part un transporteur de la betaine glycine (Booth *et al.*, 2007; Kramer, 2009a, 2009b; Möker *et al.*, 2004; Nottebrock *et al.*, 2003).

Depuis la découverte de *C. glutamicum*, capable de produire des concentrations importantes d'acides aminés, de nombreux procédés de production d'acide glutamique ont été mis au point. Cependant des interrogations persistent quant aux mécanismes de déclenchement et de transport du glutamate. Pendant plusieurs années, seule l'enveloppe cellulaire des *Corynebacterianeae* pathogènes notamment chez les espèces du genre *Mycobacterium*, a été étudiée, depuis quelques années, l'étude de l'enveloppe de *C. glutamicum* et notamment d'une de ses composantes, la mycomembrane, s'est développée. Cependant de nombreuses zones d'ombres persistent concernant le rôle de cette mycomembrane au cours du processus de production des acides aminés.

II. La Voie de biosynthèse du glutamate et sa régulation

II.A Voie de biosynthèse

Le précurseur immédiat dans la synthèse du glutamate est l'α-cétoglutarate. De ce fait, la synthèse du glutamate emprunte les voies classiques du métabolisme central. Ces différentes voies sont schématisées dans la Figure 5. Une des caractéristiques du métabolisme des Corynébactéries est de posséder un nombre important d'enzymes anaplérotiques. La transformation de l'α-cétoglutarate en glutamate se fait essentiellement via la glutamate déshydrogénase.

Dans cette partie, nous allons décrire brièvement le métabolisme central des Corynébactéries en détaillant plus spécifiquement les étapes impliquées dans la biosynthèse du glutamate.

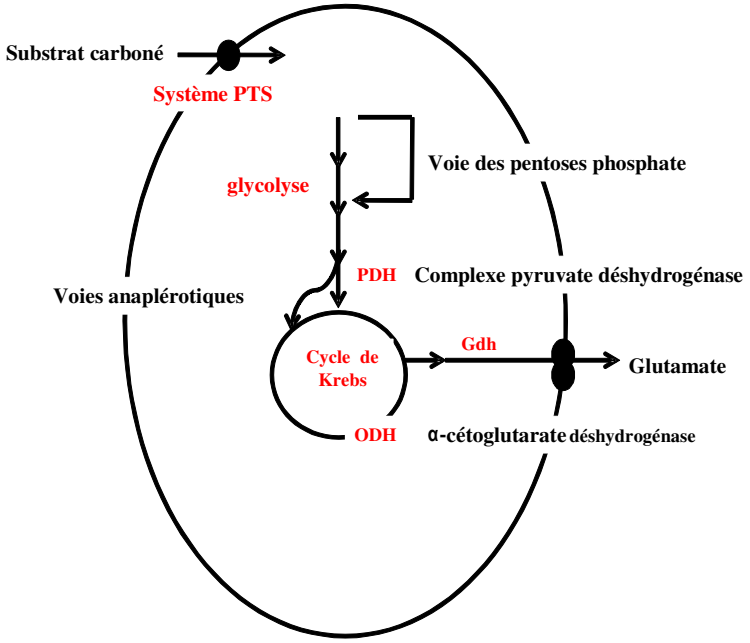


Figure 5 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du glutamate chez les Corynébactéries. PTS : système phosphotransférasique; **PDH** : pyruvate déshydrogénase; **ODH** : α-cétoglutarate déshydrogénase et **Gdh** : glutamate déshydrogénase.

II.A.1. Entrée du sucre dans la cellule

Le système de transport de type phosphotransférase (PTS) a pour particularité de transporter mais aussi de phosphoryler le substrat carboné d'où son nom (Figure 6). Il a été découvert dans un premier temps chez *E. coli* dans les années 1960 (Kundig *et al.*, 1966). Depuis, il a été mis en évidence chez de très nombreuses espèces, aussi bien parmi les

bactéries à Gram-négatif que parmi les bactéries à Gram-positif (Deutscher *et al.*, 2002; Lengeler and Jahreis, 1996; Lengeler *et al.*, 1990; Postma *et al.*, 1993; Saier and Reizer, 1994; Saier *et al.*, 1988). Cependant, les *Archae*, et les espèces *Lactococcus brevis* et *Lactococcus buchneri* ne possèdent pas de système PTS (Paulsen *et al.*, 2000; Reizer *et al.*, 1988).

Le PTS est constitué de plusieurs composants protéiques tels que EI, EII (A, B et C) et HPr. Certains composants protéiques sont dits généraux (EI et HPr), ils participent au transport de tous les sucres, et d'autres dits spécifiques (EII) d'un ou de plusieurs sucres. Les enzymes EI et HPr sont codées par les gènes *pts I* et *ptsH* (Parche *et al.*, 2001), alors que les gènes *ptsG, ptsS* codent respectivement l'enzyme II impliquée dans l'entrée du glucose ou du saccharose (Moon *et al.*, 2005; Parche *et al.*, 2001).

L'enzyme EI reçoit l'énergie et le groupement phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) et s'autophosphoryle. Elle transfère son groupement phosphate sur la position Histidine 15 de la protéine HPr qui à son tour transmet le phosphate à l'enzyme EII. Chaque enzyme EII est formée de trois domaines (IIA, IIB, IIC), deux cytoplasmiques (EIIA et EIIB) et le troisième membranaire (EIIC). La protéine EIIA accepte le phosphate provenant de HPr et le lègue à EIIB, qui à son tour phosphoryle le sucre transloqué par EIIC dans la cellule. Chez *C. glutamicum* trois composants de l'enzyme EII spécifiques du glucose, du fructose et du saccharose ont été identifiés. Un quatrième composant EII spécifique d'un autre substrat a été identifié chez *C. glutamicum* ATCC 13032 par des études génomiques, mais le substrat correspondant reste inconnu à ce jour (Moon *et al.*, 2007).

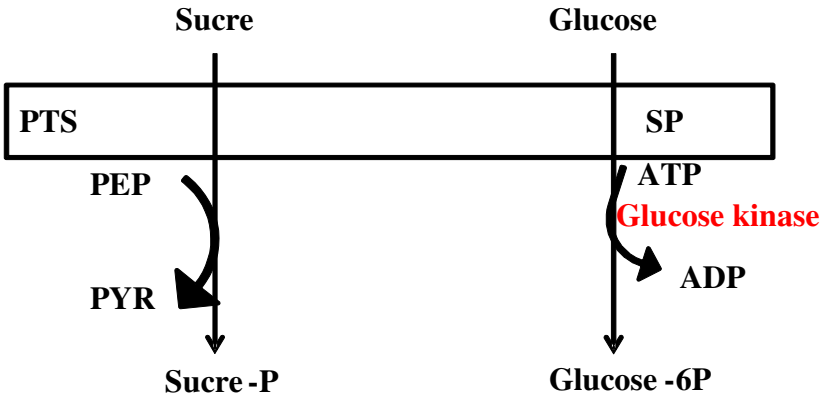


Figure 6 : Schéma général d'entrée des sucres chez *C. glutamicum*. PEP: phosphoénolpyruvate, **PYR** : pyruvate, **SP** : système perméase, **PTS** : système phosphotransférasique.

La plupart des bactéries disposent d'un système PTS directement lié au mécanisme de la répression catabolique. Il s'agit d'un mécanisme de régulation par lequel l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation d'une source de carbone secondaire est empêchée par la présence d'une source de carbone primaire ou préférentielle. Pour les bactéries à Gram-positif à faible pourcentage G+C, ce mécanisme implique la phosphorylation de la protéine HPr (Saier *et al.*, 1996). Cependant, il a été clairement montré que ce mécanisme n'est pas fonctionnel chez les bactéries à Gram-positif à fort pourcentage G+C telles que les Corynébactéries. L'absence de la protéine HPr kinase/phosphatase chez *C. glutamicum* suggère que le mécanisme de régulation du flux de carbone est différent de celui des bactéries à Gram- positif à faible pourcentage G+C.

Une récente étude sur la régulation du système PTS a mis en évidence un régulateur SugR qui réprime les gènes codant le système PTS. Des études complémentaires ont permis de montrer que SugR se fixe sur le promoteur des gènes 6-phosphofructokinase (*pfkA*), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (*fba*), énolase (*eno*), pyruvate kinase (*pyk*) et L-lactate déshydrogénase (*ldhA*) (Engels *et al.*, 2008). Donc la protéine SugR fonctionne comme un répresseur global des gènes du système PTS, de la glycolyse et de la L-lactate déshydrogénase chez *C. glutamicum* (Engels *et al.*, 2008). La répression des gènes codant le système PTS-fructose est observée durant la croissance sur glucose et fructose. La répression de SugR est principalement modulée par le fructose-1-phosphate (F-1-P). Ce dernier induit la répression à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cependant d'autres sucres phosphorylés peuvent lever la répression par SugR tels que le fructose-1,6-biphosphate (F-1,6-P) et le glucose-6-phosphate (G-6-P) mais à des concentrations plus importantes, de l'ordre du millimolaire (Gaigalat *et al.*, 2007).

Un autre système de transport du glucose a été découvert suite à la construction d'un mutant sans PTS, il s'agit de la perméase (Figure 6). Cette perméase de *C. glutamicum* a été caractérisée par Park et son équipe (Park *et al.*, 2000). L'activité perméase semble avoir une importance pour les applications industrielles (forte production du glutamate), puisque contrairement au système PTS, elle n'est pas inhibée par de fortes pressions osmotiques (Gourdon *et al.*, 2003). La perméase ne phosphorylant pas son substrat, il est phosphorylé après son entrée par une glucose kinase.

Enfin lorsque le sucre est transporté et phosphorylé, il ne peut plus ressortir de la cellule et est immédiatement pris en charge par la glycolyse

II.A.2. La glycolyse

La glycolyse est sans doute l'une des voies métaboliques les mieux conservées chez tous les organismes (Dandekar *et al.*, 1999). Elle fut l'une des premières connues car son étude a commencé au siècle dernier avec les travaux d'Embden et de Meyerhof. Comme le suggère son étymologie (glycos: sucre et lysis: dissolution), la glycolyse (Figure 7) est l'ensemble des réactions qui permettent le passage du glucose-6-phosphate au pyruvate dans le but de générer de l'énergie sous forme d'ATP et de coenzymes réduits (NADH). La glycolyse est localisée entièrement dans le cytoplasme. C'est la principale voie métabolique d'utilisation des sucres à 6 carbones, notamment le glucose et le fructose. Elle est divisée en deux parties, les réactions de la première partie permettent la conversion des hexoses-phosphates tels que le glucose-6-phosphate (G6P) en une molécule de dihydroxyacétone (DHAP) et une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (Gunsalus and Shuster, 1961). Dans la deuxième partie, les réactions permettent la conversion des trioses phosphate en pyruvate. Le cheminement du flux carboné vers la synthèse du glutamate se fait en partie par la voie de la glycolyse.

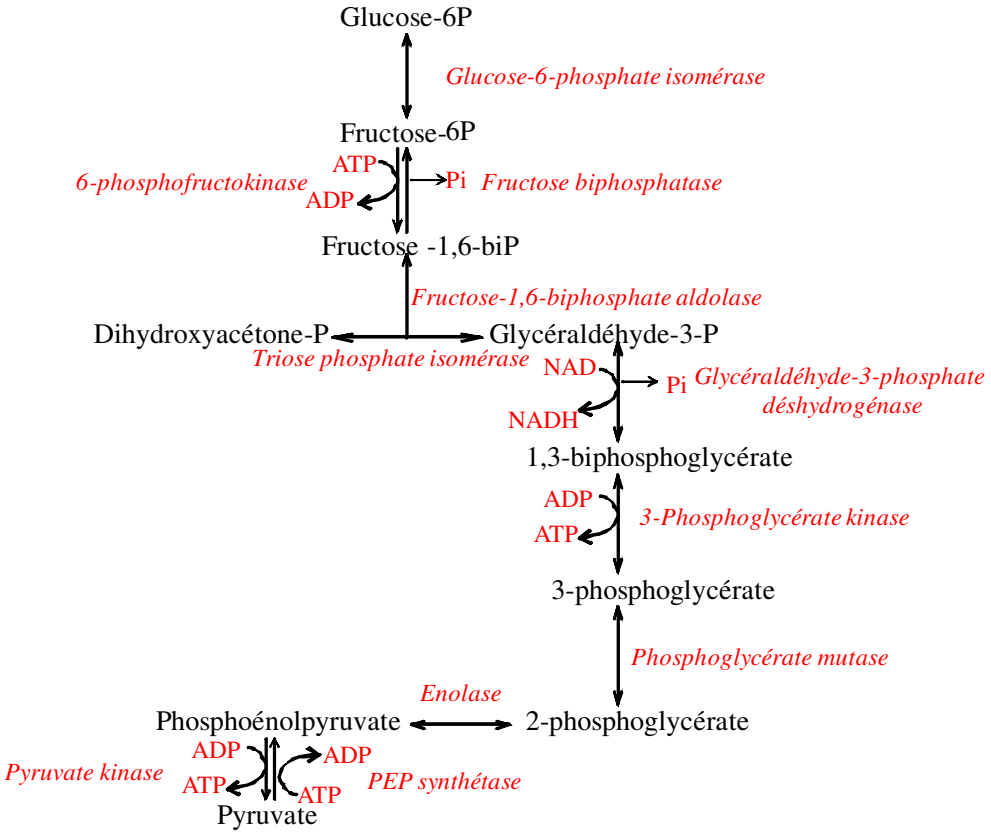


Figure 7 : Voie de la glycolyse chez *C. glutamicum*.

II.A.3. Le complexe de la Pyruvate Déshydrogénase

La pyruvate déshydrogénase (PDH) catalyse la production d'acétyl-CoA à partir du pyruvate. Elle permet la liaison entre la glycolyse et le cycle de Krebs. Elle se présente sous forme d'un complexe appartenant à une famille multi-enzymatique qui inclut le complexe α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) et le complexe 2-cétoacide déshydrogénase. Ce complexe multi-enzymatique de très grande taille est composé de trois enzymes différentes (deux spécifiques à la PDH et la 3ème commune à d'autres complexes), la pyruvate décarboxylase (E1p), la dihydrolipoamide acétyltransférase (E2p), et la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3) (Figure 8).

La dihydrolipoamide déshydrogénase (LPD) utilise le NAD^+ comme accepteur d'électron, son gène *lpd* a récemment été identifié chez *C. glutamicum* (Schwinde *et al.*, 2001). Il est décrit que ce gène *lpd* n'est pas localisé dans le même cluster que les autres gènes impliqués dans la synthèse des autres composants des complexes ODH et PDH. La surexpression de la protéine LPD chez *C. glutamicun* n'a pas permis une augmentation des activités PDH et ODH (Schwinde *et al.*, 2001). L'activité de l'enzyme PDH a été détectée chez différentes souches de *C. glutamicum* (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995; Schwinde *et al.*, 2001; Shiio *et al.*, 1984). Ce complexe PDH semble jouer un rôle important dans la voie de production des acides aminés : lors de la production du glutamate, l'activité PDH est diminuée et le flux de carbone acheminé du pyruvate vers l'acetyl-CoA est réduit (Hasegawa *et al.*, 2008; Uy *et al.*, 2003). Comme attendu, *C. glutamicum* délété du gène *aceE* codant la sous-unité E1p du complexe PDH, produit des concentrations élevées en pyruvate, L-alanine et L-valine à partir du glucose. Malgré le rôle crucial de l'activité de ce complexe, l'aspect structural ou moléculaire du complexe est encore mal connu. L'activité PDH est stimulée par la présence d'une faible concentration de $MgCl_2$, elle est améliorée par l'ajout de cystéine ou de dithiotréitol (DTT) dans le mélange réactionnel, mais est inhibée de façon compétitive par le pyruvate et par le â-fluoropyruvate (Ozaki and Shiio, 1983; Vallino and Stephanopoulos, 1994).

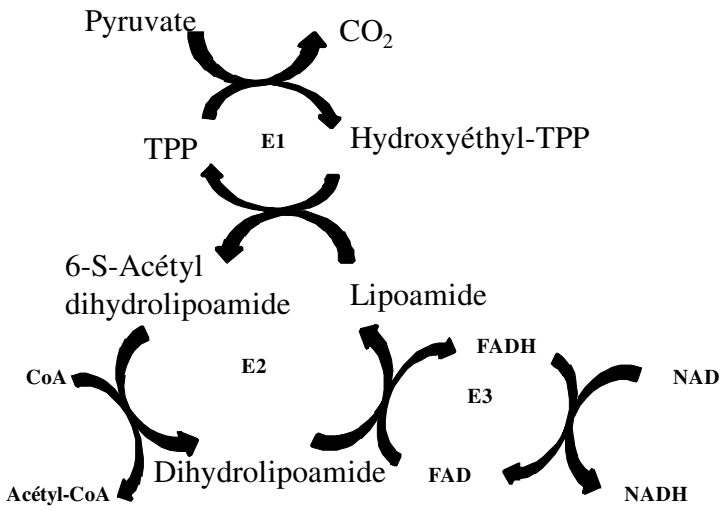


Figure 8 : Complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). Pyruvate déshydrogénase (**E1p**), dihydrolipoamide acétyl transférase (**E2p**) et dihydrolipoamide déshydrogénase (**E3**). **TPP** : thiamine pyrophosphate.

II.A.4. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (Figure 9) est constituée de sept enzymes interagissant avec la voie de la glycolyse. Elle ravitaille la glycolyse au niveau du fructose 6P et du glycéraldéhyde 3P. Les trois premières enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la 6-phosphogluconolactonase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase constituent une voie oxydative dans laquelle le glucose-6P est converti en ribulose-5-phosphate (Ru5P) avec la formation de 2 moles de NADPH par mole de Ru5P. Cette voie oxydative est irréversible. Les réactions suivantes, catalysées, par la transacétolase, la transaldolase et la ribose 5-P isomérase constituent une voie non oxydative et réversible. Le rôle général de la voie des pentoses phosphates est la synthèse de précurseurs des acides nucléotiques, tels que le ribose-5-phosphate, l'érythrose-4-phosphate, le NADPH, et de permettre l'utilisation des pentoses ou du gluconate comme source de carbone. Tous les gènes codant les enzymes de la voie des pentoses phosphates sont identifiés et localisés dans le génome de *C. glutamicum*. Chaque gène est présent en copie unique. Chez tous les *Corynebacterineae*, les gènes *tkt*, *tal*, *zwf*, *opcA* et *pgl* codant respectivement la transacétolase, la transaldolase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, et le 6-phosphogluconolactonase sont présents dans cet ordre sur le chromosome et forment probablement un opéron (Kamada *et al.*, 2001).

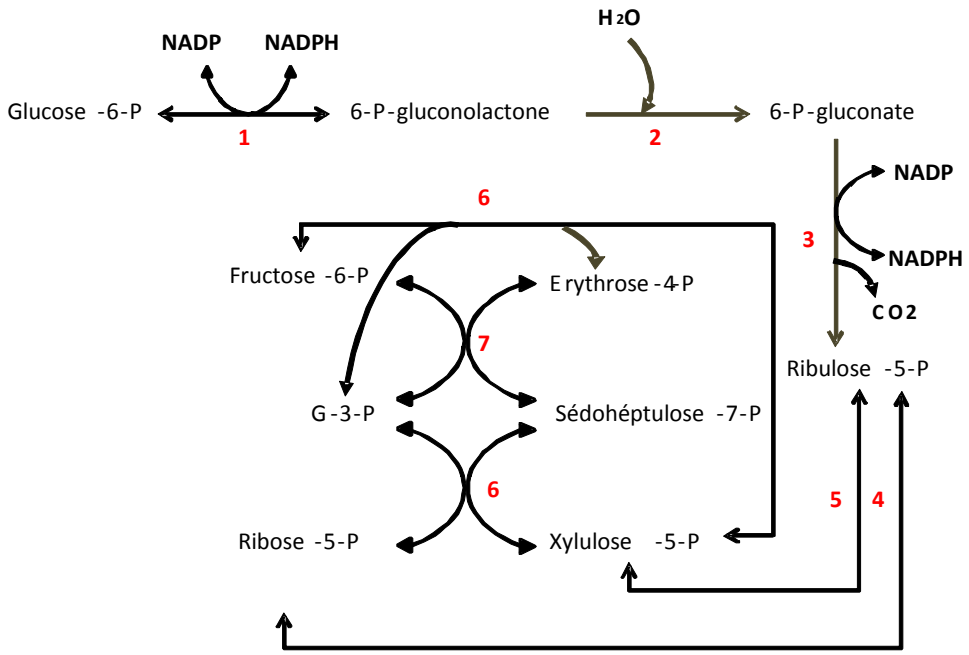


Figure 9 : Voies des pentoses phosphates chez *C. glutamicum*. (**1**) Glucose-6P déshydrogénase, (**2**) lactonase, (**3**) 6-phosphogluconate déshydrogénase, (**4**) ribose-5P isomérase, (**5**) ribose-5P épimérase, (**6**) transacétolase, (**7**) transadolase, **G3P**: glycéraldéhyde 3P.

II.A.5. Cycle de Krebs et voies anaplérotiques chez *C. glutamicum*

En général, l'approvisionnement du cycle de Krebs en acétyl-CoA provient du pyruvate quand les cellules poussent sur des sources de carbone à 5 ou 6 carbone ou sur du lactate.

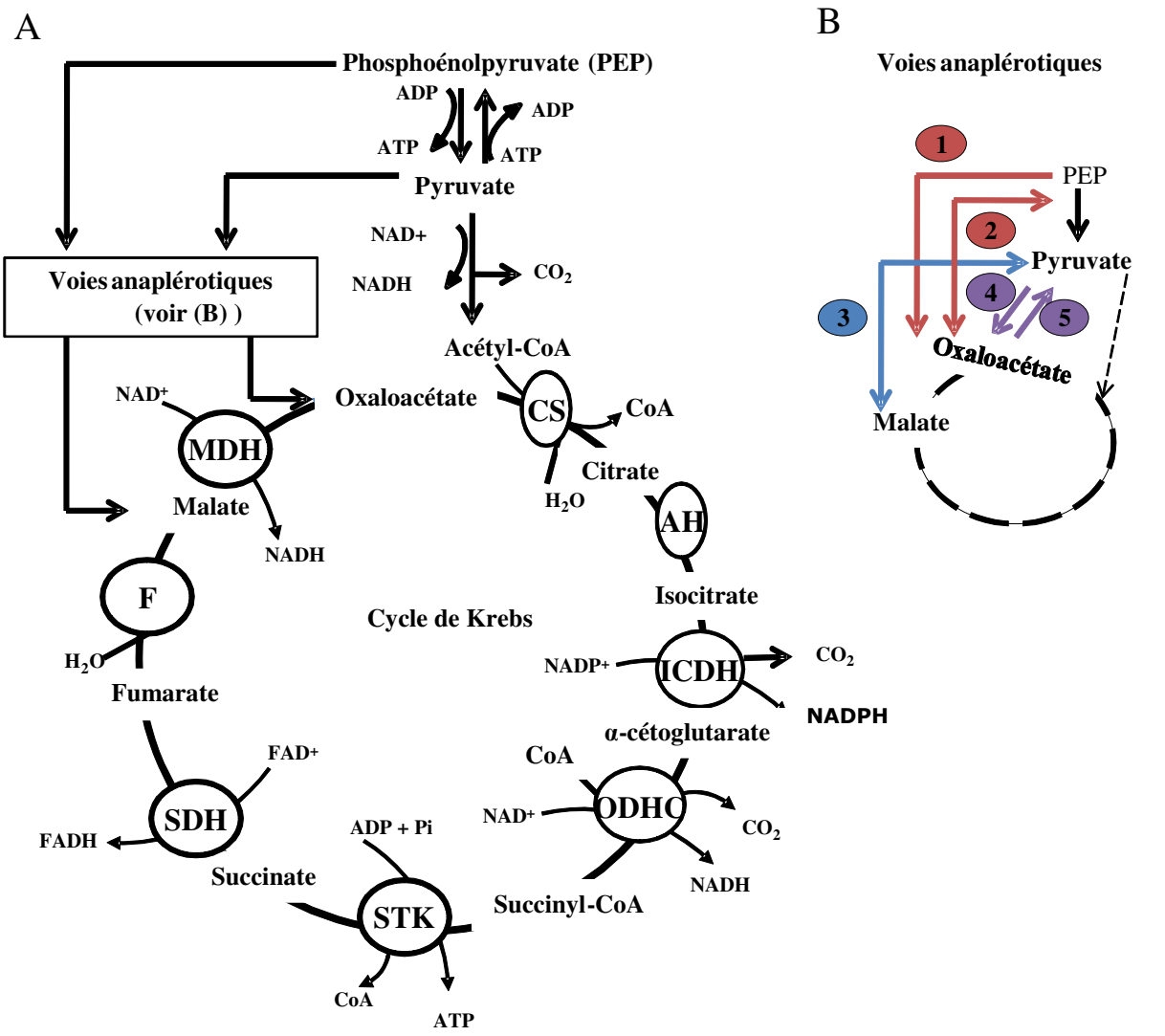


Figure 10 : Schéma du cycle de Krebs et des voies anaplérotiques chez *C. glutamicum* **(A)** Cycle de Krebs. **CS** : citrate synthase, **AH** : aconitate hydratase, **ICDH** : isocitrate déshydrogénase, **ODH** : α-cétoglutarate déshydrogénase, **STK**: succinate thiokinase, **SDH** : succinate déshydrogénase, **F** : fumarase, **MDH** : malate déshydrogénase. **(B)** Voies anaplérotiques (1): PEP carboxylase (2), PEP carboxykinase (3), enzyme malique (4), pyruvate carboxylase, (5) oxaloacétate décarboxylase.

En condition aérobie, la pyruvate déshydrogénase catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA chez *C. glutamicum*. Cependant lorsque *C. glutamicum* utilise l'acétate comme source de carbone, l'acétyl-CoA provient de deux activités combinées, l'acétate kinase (AK) et la phosphotransacétylase (PTA) (Reinscheid *et al.*, 1999; Shiio *et al.*, 1969). L'acétyl-CoA est condensé avec l'oxaloacétate pour former du citrate qui sera ensuite isomérisé en isocitrate. Au lieu d'être décarboxylé, isocitrate est clivé par l'isocitrate lyase en succinate et glyoxylate (shunt glyoxylique).

L'une des enzymes clés du cycle de krebs impliquée dans la production du glutamate est l'α-cétoglutarate déshydrogénase. Le complexe α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) est constitué (Figure 11) de trois sous unités (deux spécifiques à l'ODH et la 3ème commune à d'autres complexes), l'Eo1 (l'α-cétoglutarate déshydrogénase), l'Eo2 (la dihydrolipoamide-succinyl transférase) et le E3 (dihydrolipoamide déshydrogénase). L'α-cétoglutarate déshydrogénase catalyse la décarboxylation irréversible de l'α-cétoglutarate en succinyl-CoA avec libération d'une molécule de NADH. Les principales caractéristiques de l'ODH sont une forte spécificité et une forte affinité pour l'α-cétoglutarate, le NAD^+ et le CoA avec un K_m de 80, 86 et 61 µM respectivement, une forte inhibition par le cis-aconitate, le succinyl-CoA, le NADPH, le NADH, le pyruvate et l'oxaloacétate mais une activation par l'acétyl-CoA et le glutamate. Par ailleurs, au cours d'un procédé de production du glutamate et quelle que soit la condition d'induction (limitation en biotine, ajout de tensio-actifs, d'antibiotiques ou choc thermique), l'activité du complexe α-cétoglutarate déshydrogénase est fortement diminuée (Shiio and Ujigawa-Takeda, 1980; Uy *et al.*, 2003). Toutefois une diminution seule de l'activité ODH ne permet pas d'induire l'excrétion du glutamate (Kim *et al.*, 2009a). Les mécanismes de régulation de cette activité ont été trés largement étudiés ces dernières années (Niebisch *et al.*, 2006). Ils seront décrits plus loin dans ce travail.

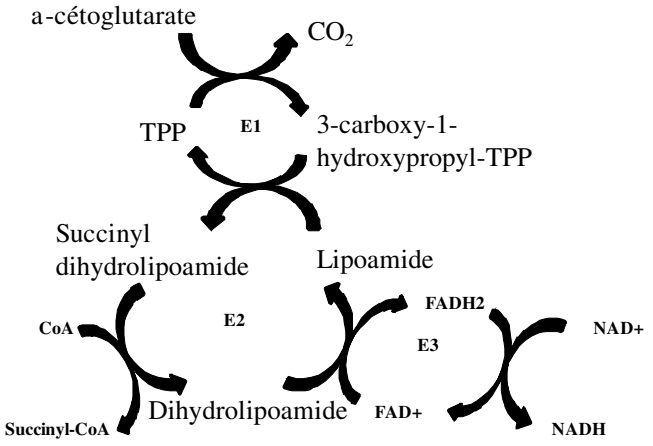


Figure 11 : Complexe α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH). Eo1: α-cétoglutarate déshydrogénase, **Eo2** : dihydrolipoamide-succinyl transférase et **E3** : dihydrolipoamide déshydrogénase, **TPP** : thiamine pyrophosphate. Uy *et al*. (2003).

Les voies anaplérotiques approvisionnent le cycle de Krebs en molécules à 4 carbones (oxaloacétate ou malate). Elles jouent un rôle important chez *C. glutamicum* puisque la synthèse du glutamate, notamment, nécessite un apport important d'oxaloacétate (OAA). Par exemple, lors de la production du glutamate sous limitation en biotine, un apport important

d'OAA est fourni par les réactions anaplérotiques via la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) et la pyruvate carboxylase (PC) (Figure 10 B). Parmi les 5 enzymes anaplérotiques, il semble que seules la PEPc et la PC aient réellement un rôle au cours du procédé de production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 (Delaunay, 1999; Delaunay *et al.*, 1999a). Des mesures des activités de ces deux enzymes, ont mis en évidence une augmentation de leur activité lorsque le glutamate s'accumule dans le milieu extracellulaire. Inversement, les autres enzymes anaplérotiques telles que l'enzyme malique semble peu impliquée. En phase de production de glutamate, en limitation de biotine ou par élévation de température chez *C. glutamicum* 2262, l'absence de l'enzyme malique ne modifie pas les performances de production de la souche, de ce fait, elle n'est donc pas indispensable à la production du glutamate (Gourdon, 1999).

II.A.6. Synthèse du glutamate à partir de l'α-cétoglutarate

Chez la plupart des bactéries, le glutamate est synthétisé par deux voies métaboliques différentes, soit par la glutamate déshydrogénase (Gdh), soit par la glutamine synthétase (GS) couplée avec la glutamate synthase (glutamine amide α-cétoglutarate amino transférase GOGAT) (Figure 12). Ces trois enzymes ont été mises en évidence et caractérisées chez *C. glutamicum*, *B. flavum* et *C. callunae* (Oshima *et al.*, 1964 ; Shiio et Ujigawa, 1978 ; Ertan, 1992 ; Jakoby *et al.*, 1997 ; Kanno *et al.*, 1997 ; Trotschel *et al.*, 2003). La biosynthèse du glutamate chez les bactéries du genre *Corynebacterium* est principalement dépendante de l'activité Gdh. Celle-ci catalyse la réaction réversible de la synthèse du glutamate et de $NADP^+$ à partir d'α-cétoglutarate, de NADPH et d'ammonium lorsque ce dernier est présent à de fortes concentrations (> 1 mM). Chez *C. glutamicum*, il est généralement admis que le coenzyme requis est le NADPH, en absence de ce coenzyme, ou en présence d'un autre coenzyme tel que NADH, la Gdh est complètement inactive (Ankri, 1991). L'activité Gdh est inhibée par le glutamate chez *B. flavum* (Shiio and Ozaki, 1970), chez *C. callunae* (Ertan, 1992) ou chez *C. glutamicum* (Ankri, 1991). Rosenberg et Brenchley (1983) avaient montré chez de nombreuses bactéries, que des mutants déficients en GOGAT ne peuvent croître dans un milieu limité en ammonium (concentration inférieure à 1 mM). Tandis que lors d'une culture continue de *C. glutamicum* ATCC 17965 en limitation d'ammonium, aucune diminution de l'activité Gdh n'a été observée par rapport à la même culture réalisée dans des conditions non limitantes en ammonium (Delaunay, 1995). Il semblerait que chez *C. glutamicum* la synthèse de Gdh soit effective en limitation en ammonium. Contrairement aux

autres microorganismes, chez *C. glutamicum* la concentration en ammonium n'est pas un facteur de régulation entre la Gdh et le système GS/GOGAT (Ankri, 1991; Delaunay, 1995).

L'activité Gdh est décrite comme l'activité principale dans la synthèse du glutamate, puisque son activité semble assurer entre 60 et 70% de la totalité du flux carbone aboutissant à la synthèse du glutamate chez *C. glutamicum* selon le milieu de croissance (Ankri, 1991; Delaunay, 1995). Cependant, la construction d'un mutant de *C. glutamicum* dépourvu d'activité Gdh n'altère pas la production de glutamate (Börmann-El Kholy *et al.*, 1993). Ces mêmes auteurs mettent en évidence l'augmentation de l'activité du système GS/GOGAT en absence du gène *gdh* codant la Gdh. Cependant, l'activité GS est une réaction indésirable lors de la fermentation glutamique puisqu'elle utilise une partie du glutamate en synthétisant la glutamine. Lors d'une fermentation glutamique, le contrôle du pH est primordial, car un pH faible favorise la production de la glutamine au détriment du glutamate (Nakanishi *et al.*, 1975).

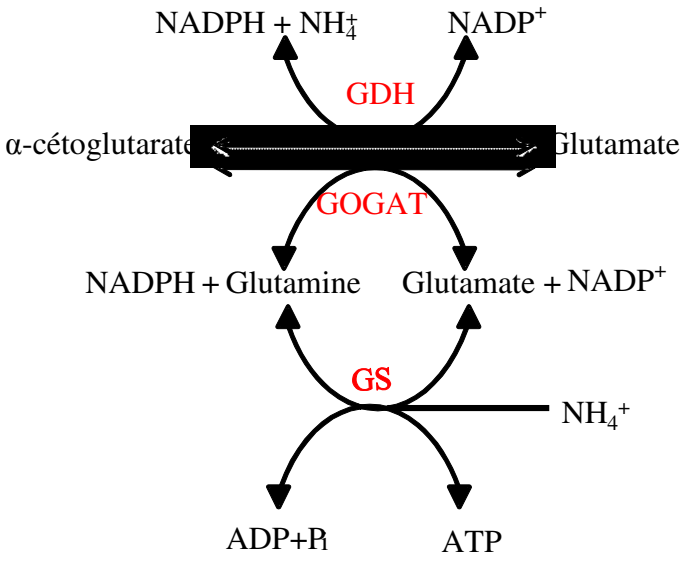


Figure 12 : voies de biosynthèse du glutamate. GDH : glutamate déshydrogénase, **GS** : glutamine synthétase, **GOGAT** : glutamate synthase.

II.B. Régulation de la production du glutamate chez *C. glutamicum*

II.B.1. Implication des protéines sérine/thréonine kinases (STPK) et déphosphatases dans la régulation intracellulaire

Le mécanisme de phosphorylation d'une protéine est un mécanisme biochimique par lequel des signaux extérieurs peuvent être transmis au milieu intracellulaire. L'activité d'une protéine peut être régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation. La phosphorylation est due à des protéines kinases spécifiques et la déphosphorylation à des protéines phosphatases (PPases). Ce mécanisme, mis en évidence chez les bactéries, est généralement constitué par un système à deux composants comprenant des senseurs histidines kinases et des régulateurs de réponses associés (Stock *et al.*, 1989). L'étude génomique de plusieurs espèces bactériennes a révélé la présence des protéines sérine/thréonine kinases (STPK) jusque là spécifiques aux Eucaryotes (Leonard *et al.*, 1998). Ces kinases semblent jouer un rôle important dans la transduction de signaux et les mécanismes de régulation chez plusieurs espèces bactériennes. Bien que dans la majorité des cas la fonction et la cible de ces kinases restent inconnues, les STPK sont impliquées dans le contrôle de la phase de latence, la sporulation, la production de métabolites secondaires, la survie d'un pathogène chez la cellule hôte (Walburger *et al.*, 2004) ou encore la régulation intracellulaire due à des stress environnementaux (Yang *et al.*, 1996).

Le séquençage du génome de *C. glutamicum* par Ikeda et Kalinowski (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003) a révélé la présence de 4 gènes codant des STPK; *cg0059* (PknA*)*, *cg0057* (PknB), *cg3046* (PknG) et *cg2388* (PknL) et un seul gène *cg0062* (PPP) codant une protéine phospho-Ser/Thr phosphatase PPP (Figure 13). Contrairement à *C. glutamicum*, *M. tuberculosis* compte plus de 11 gènes codant 11 protéines kinases et 4 gènes codant quatre protéines phosphatases (Castro *et al.*, 2008). Jusqu'à très récemment, la fonction et la cible de ces STPK était inconnues, mise à part la participation de la protéine kinase PknG dans l'utilisation de la glutamine (Niebisch *et al.*, 2006). Chez *C. glutamicum*, les gènes *pknA*, *pknB* et *ppp* sont localisés dans un opéron contenant cinq autres gènes. Deux gènes codent deux protéines possédant un domaine Forkhead associated (FHA) (*cg0063, cg0064*) dont le rôle sera décrit plus loin, deux gènes codant les protéines FtsW (*cg0061*) et FtsI (*cg0060*) et un gène codant une protéine membranaire (*cg0055*) (Schultz *et al.*, 2009). Le gène *pknL* est localisé en amont de deux gènes qui codent des protéines membranaires (Schultz *et al.*, 2009). Enfin *pknG* est localisé dans un opéron avec les gènes *glnX* et *glnH*

impliqués dans le métabolisme et le transport de la glutamine (Niebisch *et al.*, 2006). Chez *C. glutamicum*, les gènes *pknA*, *pknB*, *pknL* et *pknG* codent respectivement des protéines de 469, 646, 740 et 822 acides aminés avec une masse moléculaire de 50, 68, 79 et 91 kDa. De même, chez *M. tuberculosis*, les gènes *pknA* et *pknB* sont localisés dans un opéron contenant trois autres gènes (*pstP, rodA, pbp2B, pknA, et pknB*) (Kang *et al.*, 2005).

Seule PknG est une protéine soluble, PknA, PknB et PknL sont transmembranaires (Schultz *et al.*, 2009) (Figure 13). Le domaine extra cytoplasmique de ces STPK est normalement le domaine senseur, qui lorsqu'il se lie à son ligand, entraîne un changement de conformation qui déclenche une cascade de signalisation. Les kinases PknB et PknL possèdent dans le domaine C-terminal extracytoplasmique respectivement 4 et 5 domaines PASTA. Ce domaine PASTA est un domaine protéique qui se lie au noyau bêta-lactame de divers antibiotiques tels que la pénicilline. Il a été découvert pour la première fois par Yeats et son équipe et semble être similaire au domaine penicillin-binding-protein (PBP) et à un domaine des protéines kinases telles que PknB. Le terme PASTA est donc un acronyme de **P**BP et **S**erine/**T**hreonine kinase **A**ssociated domain (Yeats *et al.*, 2002) (Figure 13). Barth *et al* (2010) proposent un modèle de l'activitation de PknB basé sur la dimérisation de ce domaine PASTA qui semble être à l'origine de multiples voies de signalisation chez *M. tuberculosis* (Barthe *et al.*, 2010). Néanmoins la protéine kinase PknL chez *M. tuberculosis* est dépourvue du domaine PASTA (Canova *et al.*, 2008). De ce fait, on peut penser que PknL chez *C. glutamicum* répond à des signaux différents de ceux de son homologue mycobactérien.

Les travaux de Fiuza *et al*. (2008) rapportent que la délétion des gènes *pknL* ou *pknG* chez *C. glutamicum* ATCC 13869 n'a pas d'effet sur la morphologie et la vitesse de croissance cellulaire tandis que les gènes *pknB* et *pknA* jouent un rôle important dans la régulation de la morphologie cellulaire et sont tous deux essentiels à la croissance cellulaire chez *C. glutamicum* ATCC 13869. La délétion ou la surexpression de *pknA* ou *pknB* aboutissent respectivement à des mutants non viables ou à une forme cellulaire coccoïde (altération de la division cellulaire ou de la synthèse du peptidoglycane) (Fiuza *et al.*, 2008) .

Les travaux de Fiuza *et al* (2008) sont contredits par ceux de Schultz *et al*. (2009) qui rapportent le rôle non essentiel de toutes les STPK. Néanmoins, ils mettent en évidence que la délétion de deux ou trois kinases simultanément a un effet néfaste sur la croissance même lorsque le milieu de croissance est un milieu riche (Schultz *et al.*, 2009).

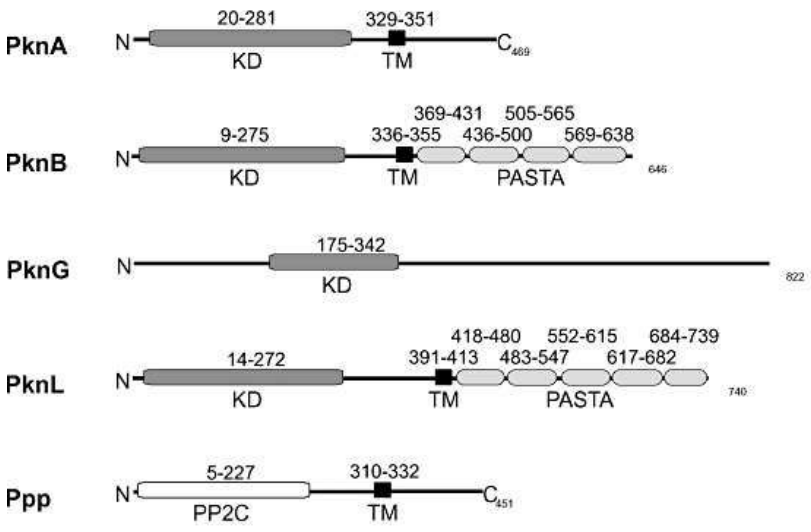


Figure 13 : **Organisation génétique des gènes *pknA*, *pknB, pknG pknL et ppp chez C. glutamicum.*** **KD** *:* domaine kinase*;* **TM** *:* domaine transmembranaire*;* **PP2** *:* domaine phosphatase*;* **PASTA** *:* penicillin-binding protein et domaine associé à la sérine/thréonine kinase. Schultz *et al*. (2009).

Pour que ces kinases soient fonctionelles, elles doivent être elles mêmes activées par phosphorylation suite à un stimuli extérieur. Fiuza *et al*. (2008) rapportent que toutes les STPK possèdent une activité autokinase, exceptée PknG, chez *C. glutamicum.* Celle-ci est activée uniquement en présence d'autres kinases telle que PknA. Alors que Niebich *et al.* (2006) rapportent plutôt une autophosphorylation de la protéine PknG chez *C. glutamicum* (Niebisch *et al.*, 2006).

II.B.2. Régulation de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH)

Très récemment un nouveau mécanisme de régulation du complexe enzymatique ODH a été mis en évidence (Niebisch *et al.*, 2006). Ce mécanisme est présent chez *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* et *M. tuberculosis*. Le mécanisme de régulation fait intervenir des protéines kinases mais aussi OdhI, une protéine soluble de 15 kDa avec un domaine FHA et une extension N-terminale contenant le motif conservé ETTS où la phosphorylation se produit. La protéine OdhI est homologue à GarA chez *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* et est hautement conservée chez les bactéries à Gram-positif avec un ADN riche en GC. Elle est le substrat de PknG et d'autres kinases. PknG phosphoryle OdhI sur la thréonine T14 du motif ETTS (Niebisch *et al.*, 2006) et les deux kinases PknA et PknB sont capables de phosphoryler OdhI

in vitro (Fiuza *et al.*, 2008). Les travaux rapportés par Barthe *et al.* (2009) confirment la phosphorylation d'OdhI par PknA et PknB sur la thréonine T15 du motif ETTS.

De même Schultz *et al.* (2009) ont observé que, *in vivo*, OdhI pourrait être phosphorylée non seulement par PknG, mais aussi par PknA, PknB et PknL, bien que de façon moins importante par les deux dernières (Figure 14).

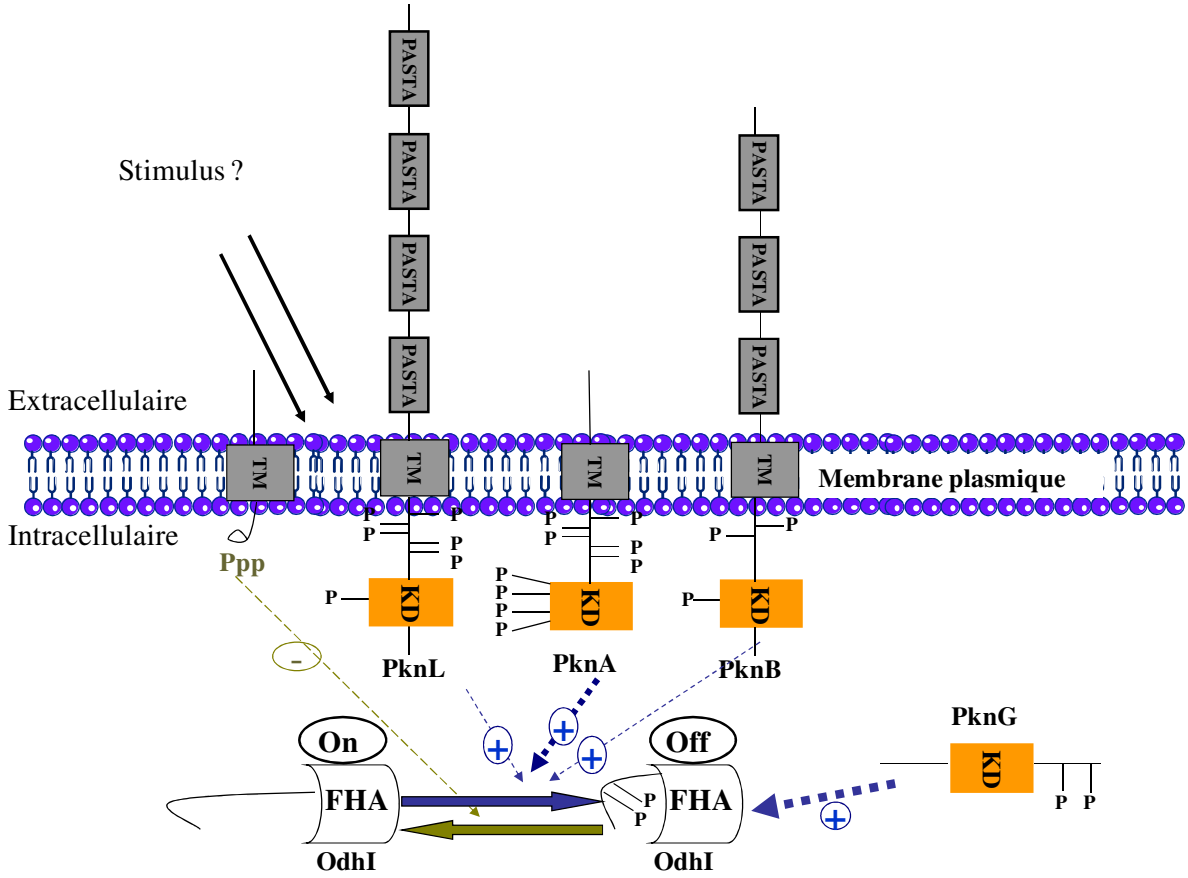


Figure 14 : Modèle de régulation de la protéine OdhI par un mécanisme de phosphorylation par les kinases PknG, PknB, PknA et PknL et de déphosphorylation par Ppp chez *C. glutamicum*. Schultz *et al.* (2009) **KD**: Domaine kinase **FHA** : Domaine forkhead-associated, **PASTA** : penicillin-binding protein and serine/thréonine kinase-associated, **TM** : domaine transmembranaire. Flèche pointillée épaisse : kinases préférentielles pour la phosphorylation d'OdhI. phosphorylation déphosphorylation.

Le domaine FHA de la protéine OdhI est essentiel à sa régulation. Il s'agit d'un domaine hautement spécifique aux phospho-thréonines qui participe à différents processus biologiques tels que la réparation de l'ADN ou la dégradation des protéines chez les Eucaryotes (Durocher and Jackson, 2002). Il est très conservé chez les actinomycètes, suggérant qu'il joue un rôle majeur dans la physiologie de ces organismes. Le domaine FHA

est décrit comme responsable du mécanisme de l'auto-inhibition de la protéine OdhI (Barthe *et al.*, 2009). En effet, la forme non phosphorylée de la protéine OdhI bloque le cycle de Krebs en se fixant sur ODH. En revanche, la forme phosphorylée d'OdhI reste inactive. Chez *M. tuberculosis*, GarA a été partiellement caractérisée, et présente 69% de similarité protéique (82% pour le domaine FHA) avec OdhI (Villarino *et al.*, 2005). Le mécanisme de l'auto-inhibition de la protéine par interaction entre les phospho-thréonines et le domaine FHA est également décrit pour Gar A (England *et al.*, 2009).

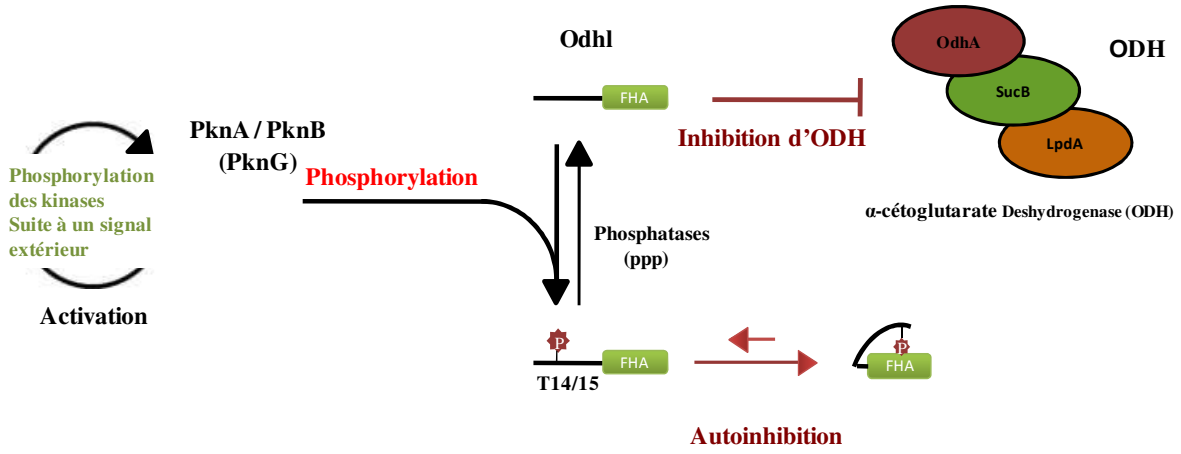


Figure 15 : Mécanisme de régulation d'ODH par OdhI chez *C. glutamicum*. La protéine OdhI est phosphorylée par des kinases. OdhI phosphorylée est sous forme inactive et n'est pas en mesure d'inactiver le complexe ODH. Par contre lorsqu'OdhI est déphosphorylée par la phosphatase PPP, elle devient active, et est en mesure d'inactiver le complexe ODH. Barthe *et al.* (2009).

II.B.3. Importance de la modification de l'activité ODH lors de la production de glutamate

Chez *E. coli*, lorsque l'ODH et/ou la succinyl-CoA synthétase sont inhibées, une surproduction de glutamate est observée (Lamhonwah *et al.*, 1986 ; Shiio *et al.*, 1961; Walker *et al.*, 1982). De même, *Brevibacterium sp.* voit son activité ODH chuter de 40 à 60% en limitation en biotine (Shingu and Terui, 1971). Des études similaires réalisées chez *C. glutamicum* ATCC 13032 ont montré que la production de glutamate après induction par une limitation en biotine s'accompagne d'une diminution de l'activité d'ODH de plus de 50% et que plus de 75% du flux carboné est dévié vers la synthèse de glutamate (Shiio and Ujigawa-Takeda, 1980; Shimizu, 2002).

Cependant, aucune étude n'a été capable d'expliquer le lien entre cette diminution de l'activité ODH et la production de glutamate jusqu'à la découverte d'OdhI en 2006. L'excrétion du glutamate nécessite la déphosphorylation d'OdhI. Chez *C. glutamicum*, la forme non phosphorylée de la protéine OdhI est capable de se fixer et de moduler l'activité de

la sous unité OdhA (aussi nommée Eo1) du complexe ODH (Figure 15). De la même manière, chez *M. tuberculosis*, GarA sous sa forme non phosphorylée interagit non seulement avec l'activité enzymatique KGD (homologue à OdhA chez les Corynébactéries) mais aussi avec la GDH (O'Hare *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la protéine OdhI est un régulateur clef de la production du glutamate chez les Corynébactéries. Ces résultats sont renforcés par le fait qu'un mutant de *C. glutamicum,* dépourvu du gène codant la protéine OdhI ne synthétise qu'entre 1 et 13% du glutamate produit par une souche de référence (Schultz *et al.*, 2007). Récemment, l'implication de la protéine OdhI dans la production du glutamate a été consolidée par l'équipe de Kim (2009b) qui a montré que la surexpression de la protéine OdhI chez *C. glutamicum* ATCC 31831, seule, résulte en une surproduction de glutamate sans qu'aucune induction ne soit nécessaire (Kim *et al.*, 2009b).

III. L'enveloppe Cellulaire

III.A. L'enveloppe cellulaire des Procaryotes

Les Procaryotes disposent d'une rigidité cellulaire due à l'existence d'une épaisse enveloppe. Depuis des décennies, la structure de cette enveloppe constitue un critère de classification des bactéries. La classification la plus ancienne et la plus couramment utilisée est celle associée à la coloration de Gram, identifiée et développée par Christian Gram (1883). Grâce à cette coloration, une différence fondamentale présente au niveau de l'organisation et de la composition de l'enveloppe a permis de distinguer deux types de bactéries (Salton, 1963), les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif.

III.A.1. Les bactéries à Gram-négatif

L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram-négatif est composée d'une membrane externe, en contact avec le milieu extérieur, et d'une membrane plasmique entourant le cytoplasme. L'espace délimité par ces deux membranes est appelé périplasme (Figure 16). La membrane externe est formée d'une bicouche de phospholipides, du côté extracellulaire cette bicouche est recouverte de lipopolysaccharides (LPS). Le LPS joue un rôle antigénique et pathogène. Des protéines intégrées dans la membrane externe sont également présentes, il s'agit de protéines de transport (porines). De même des lipoprotéines sont localisées entre le peptidoglycane et la membrane externe (lipoprotéines de Braun) et consolident la paroi bactérienne par leur présence. L'espace périplasmique est localisé entre la membrane externe et le peptidoglycane, il s'agit d'un espace de stockage de protéines chaperonnes nécessaires à

la sécrétion d'enzymes, de nutriments, de molécules osmoprotectrices telles que le tréhalose (Culham *et al.*, 1993; Hultgren *et al.*, 1991). Le peptidoglycane des bactéries à Gram-négatif est fin (3 à 5 nm). Il est constitué d'un polymère de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM) liés par des liaisons osidiques ß (1-4). Ce polymère est lié à des peptides courts. Ces peptides courts sont composés d'acide D-glutamique, de D-alanine et d'acide méso-diaminopimélique. L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram-négatif n'a pas d'acides gras ramifiés mais contient une large proportion de cyclopropane, d'acides gras saturés et (mono) insaturés (Lennarz, 1966).

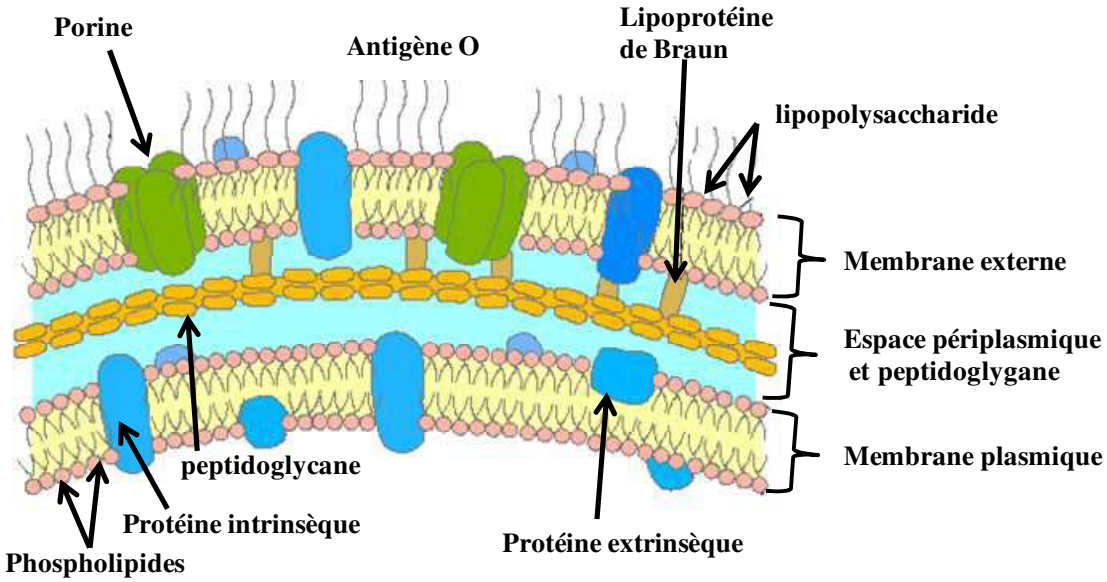


Figure 16 : Représentation schématique d'une enveloppe de bactérie à Gram-négatif. (http://www.ebiologie.fr/).

III.A.2. Les bactéries à Gram-positif

L'enveloppe des bactéries à Gram-positif est composée d'une seule membrane, la membrane plasmique. Celle-ci est recouverte par une paroi. Elle contient un large pourcentage d'acides gras ramifiés et non ramifiés, environ 50% des acides gras chez *Bacillus*, *Micrococcus* et *Staphylococcus* sont ramifiés, cependant elle contient un pourcentage faible d'acides gras insaturés (Lennarz, 1966). Le peptidoglycane est beaucoup plus épais que chez les bactéries à Gram-négatif (15 à 30 nm) et plus riche en liaison inter peptidique. Ce peptidoglycane est séparé de la membrane plasmique par un espace périplasmique. Il renferme des acides téichoïques au contact de la paroi. Ces acides téichoïques sont des lipides toujours fixés sur les N-acétyl-glucosamines qui jouent le rôle de récepteur. D'autres lipides complexes se fixent sur la membrane plasmique, tels que les acides lipotéichoïques (Figure 17).

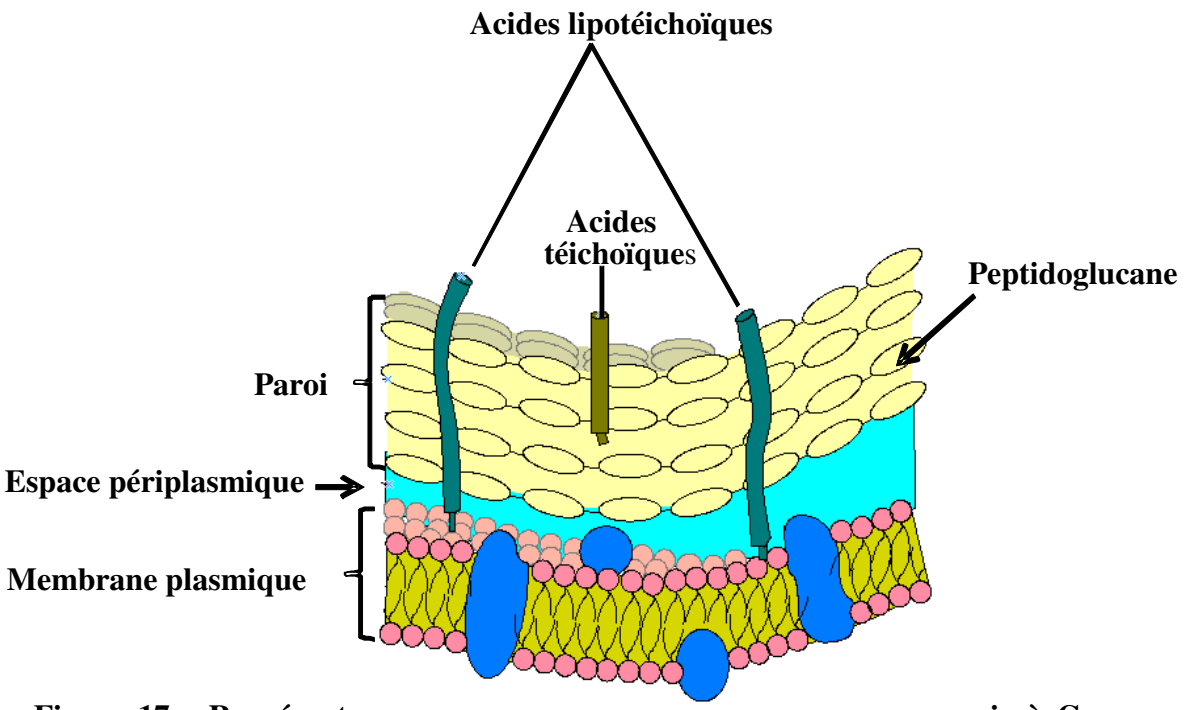


Figure 17 : Représentation schématique d'une enveloppe de bactérie à Gram-positif. (http://www.ebiologie.fr/).

III.B. L'enveloppe des *Corynebacterineae*

III.B.1. Généralités

Bien que les *Corynebacterineae* soient des bactéries à Gram-positif, elles possèdent une enveloppe qui les rapproche des bactéries à Gram-négatif (Figure 18). Le peptidoglycane est lié à un polymère d'arabinose et de galactose, l'arabinogalactane, lui-même lié à des acides mycoliques. Ce complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane forme le squelette de l'enveloppe. Outre les acides mycoliques liés au tréhalose, l'enveloppe des *Corynebacterineae* contient de nombreux autres lipides extractibles responsables du renforcement de l'hydrophobicité de celle-ci. La forte ressemblance de l'enveloppe de ces bactéries avec la membrane externe des bactéries à Gram-négatif est renforcée par la présence de porines. Ces porines sont bien connues chez les bactéries à Gram-négatif et leur présence a été confirmée chez les Mycobactéries, le genre *Nocardia* et les Corynébactéries (Lichtinger *et al.*, 1998; Riess *et al.*, 1998; Trias *et al.*, 1992). A ce jour, la localisation des différents composants de l'enveloppe n'est pas encore complètement élucidée. Parmi les bactéries appartenant au groupe (CMN) ou *Corynebacterineae*, l'enveloppe des Mycobactéries est la

plus étudiée car il s'agit des bactéries les plus impliquées dans de nombreuses pathologies humaines, comme la tuberculose (*M. tuberculosis*) ou la lèpre (*M. leprae*) (Daffe and Draper, 1998).

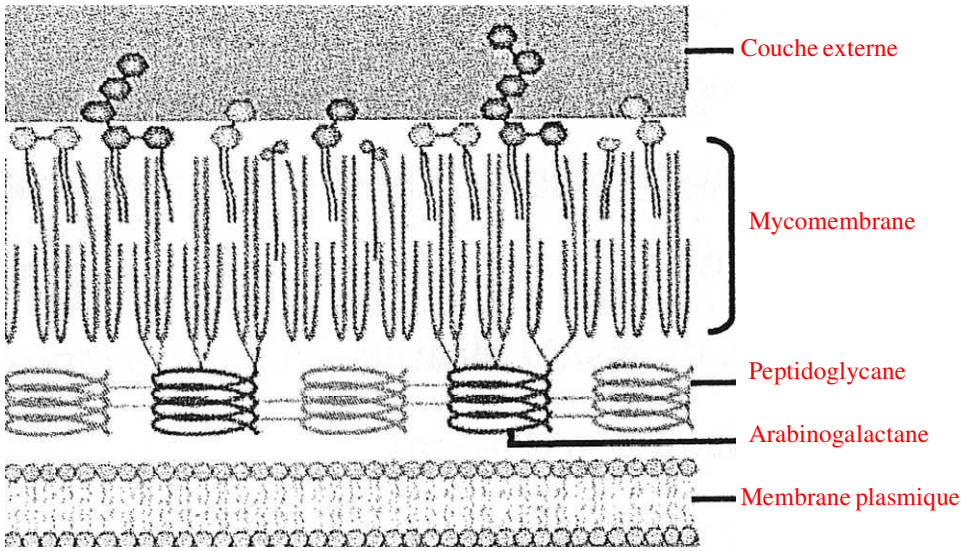


Figure 18 : Représentation schématique de l'enveloppe des *Corynebacterineae* d'après Abdallah *et al.* (2007).

III.B.2. Ultrastructure de l'enveloppe des Corynébactéries : les données de microscopie électronique

Une structure de l'enveloppe a été proposée grâce aux analyses effectuées par microscopie électronique. Cependant, bien des différences apparaissent selon la technique utilisée. Ces différences sont essentiellement dues à la préparation de l'échantillon ou au principe même de la technique utilisée. Trois techniques ont été employées pour étudier l'ultrastructure de l'enveloppe, la microscopie électronique à transmission sur coupe ultra-fine, la microscopie électronique à transmission par cryo-décapage et la cryo-microscopie électronique à transmission native (CEMOVIS). Ces trois techniques seront brièvement comparées entre elles dans ce chapitre. L'enveloppe de *C. glutamicum* visualisée par microscopie électronique à transmission sur coupe ultra-fine apparait assez épaisse, plus épaisse que celle des Mycobactéries bien que l'enveloppe des Mycobactéries soit plus complexe. L'épaisseur de l'enveloppe de *C. glutamicum* estimée par cette technique est comprise entre 30 et 38 nm (Marienfeld *et al.*, 1997; Puech *et al.*, 2001). Cette technique met également en évidence un peptidoglycane plus épais chez les Corynébactéries que chez les Mycobactéries, les rapprochant davantage des bactéries à Gram-positif (Paul and Beveridge, 1992). L'observation de l'enveloppe des Corynébactéries a également été réalisée par cryo

décapage. Cette technique qui permet de mettre en évidence les différentes bicouches lipidiques a été utilisée pour observer la mycomembrane des Corynébactéries (Chami *et al.*, 1995; Puech *et al.*, 2001). Avec cette technique, deux plans de fractures sont observés, un premier plan en profondeur de l'enveloppe caractéristique de la membrane plasmique et un deuxième plan majeur situé dans l'enveloppe et attribué à l'existence d'une structure en pseudo-bicouche. Cependant, cette technique a pour inconvénient de ne pas permettre la détermination de l'épaisseur des bicouches lipidiques observées. Enfin une autre technique a vu le jour très récemment, il s'agit de la cryo-microscopie électronique (CEMOVIS). Cette technique permet de conserver la structure de l'enveloppe très proche de son état natif. Elle démontre l'existence d'une membrane externe et confirme l'épaisseur de l'enveloppe plus importante chez les Corynébactéries (Zuber *et al.*, 2008). D'autres couches sont également identifiées comme la couche de faible densité ou la couche granuleuse qui correspondent respectivement à l'espace périplasmique et aux protéines associées à celle-ci. Cependant cette technique ne permet pas d'identifier la couche externe (couche S), lorsque celle-ci est présente à la surface des *Corynebacterineae.*

III.B.3. Composition biochimique de l'enveloppe

a) La membrane plasmique ou cytoplasmique

La membrane plasmique des Corynébactéries est similaire à celle des autres membranes biologiques (Kumar *et al.*, 1979). Elle est perméable à toutes les molécules non polaires, mais empêche le passage des molécules polaires (glucose) ou chargées (métal, ions). Cependant les molécules neutres telles que l'eau, le CO_2 et l'O_2 sont capables de traverser sélectivement la membrane. Les constituants majeurs des membranes plasmiques sont les phospholipides, mais aussi des protéines enchassées dans ces derniers. La synthèse des phospholipides nécessite plusieurs étapes à partir du glycérol et des acides gras (figure 19). La partie apolaire de ces phospholipides est constituée d'acides gras saturés et d'acides gras insaturés. Les acides gras majoritaires chez *C. glutamicum* sont l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1) (90% des acides gras totaux) alors que les acides gras mineurs sont l'acide stéarique (C18:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide pentadécanoïque (C15:0), l'acide palmitoléique (C16:1), l'acide 10 méthylstéarique et l'acide tuberculostéarique (acide 10-méthyl-octadécanoïque) (Collins *et al.*, 1982; Gourdon and Lindley, 1999; Minnikin and Goodfellow, 1978; Otsuka and Shiio, 1968; Puech *et al.*, 2002). Les phospholipides qui la composent sont le phosphatidylglycérol (PG) (80%), le diphosphatidylglycérol (DPG ou «cardiolipide»), le

phosphatidylinositol (PI) et les phosphatidylinositol dimannosides (PM2) en petite quantité (Hoischen and Kramer, 1990; Nampoothiri *et al.*, 2002; Puech *et al.*, 2001; Shibukawa *et al.*, 1970). Chez *C. glutamicum*, le PM2 se présente sous une forme diacylée ou triacylée mais la forme tétraacylée est inexistante, contrairement au genre *Mycobacterium* ou cette dernière forme est majoritaire (Brennan and Lehane, 1971). De même la phosphatidyléthanolamine (PE) présente chez *Mycobacterium,* est absente chez *C. glutamicum.* Certaines voies de biosynthèse des phospholipides chez *C. glutamicum* ont été élucidées (Figure 19) et la modification des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides tels que *plsC*, *cds*, *pgpC* ou *cls* provoque des changements dans la synthèse des phospholipides. Ceci a pour conséquence la modification de la sensibilité vis-à-vis de la température et du tensio-actif dans une optique de production de glutamate (Nampoothiri *et al.*, 2002). Il a été raporté que la surexpression du gène *plsC* avec un ajout de tensio-actif, permet une amélioration de l'accumulation du L- glutamate, sa concentration passant de 92 mM à 108 mM. Au contraire, la surexpression du gène *acp* a pour conséquence une réduction de l'accumulation de L-glutamate à 24 mM après ajout de tensio-actif ou suite à une élévation de température (Nampoothiri *et al.*, 2002).

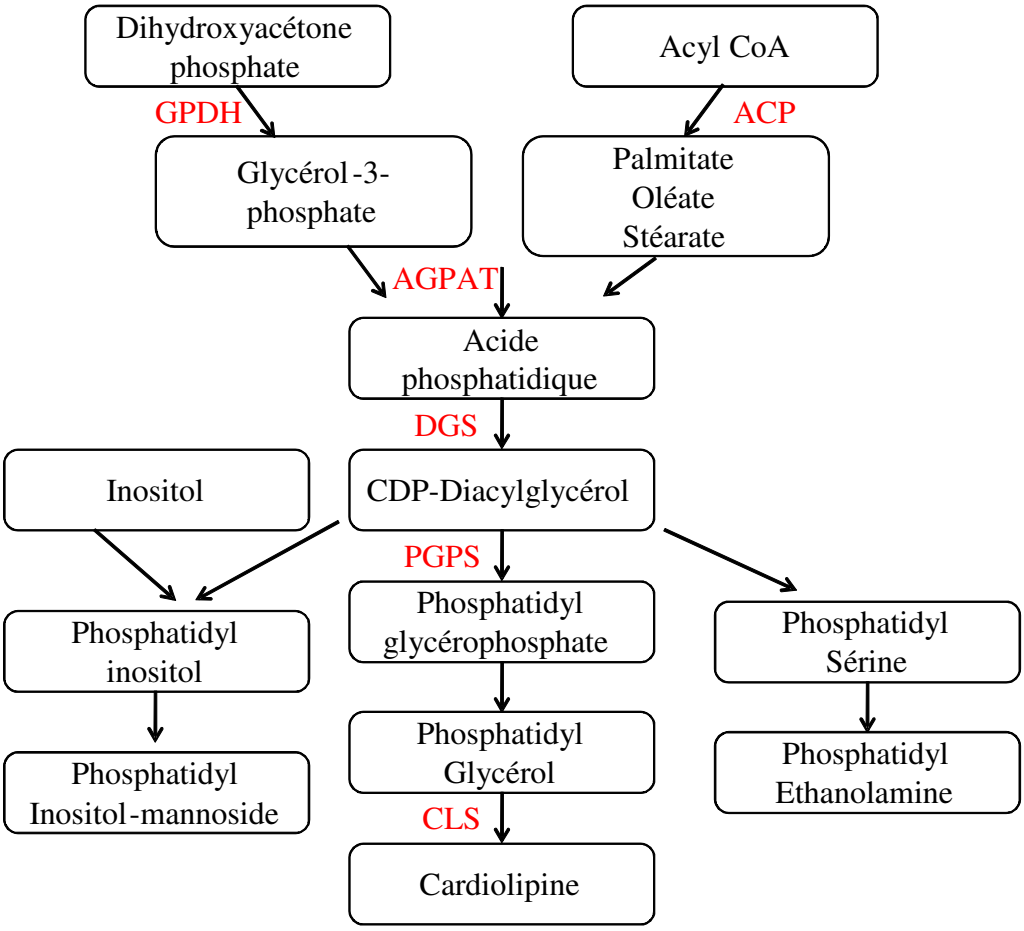


Figure 19 : Voies de biosynthèse des phospholipides d'après Nampoothiri *et al*. (2002). **ACP** : acyl carrier protein, **GPDH** : glycérol-3P-déshydrogénase, **AGPAT** : acyl-glycérol-3P-acyltransferase, **DGS** : CDP-diacylglycérol synthase, **PGPS** : phosphatidyl glycérophosphate synthase, **CLS** : cardiolipin synthase.

b) La paroi

La paroi est riche en lipides et en sucres. La structure chimique de la paroi des *Corynebacterianeae* a été essentiellement décrite par Daffé et Draper (1998). Le peptidoglycane est lié à l'arabinogalactane, lequel est à son tour estérifié par des acides mycoliques. Elle forme un large complexe mycoloyl-arabinogalactane-peptidoglycane. Chez les *Corynebacterineae,* des lipomannanes et lipoarabinomannanes sont également présents et sont dispersés dans la chaîne mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane, partiellement liés avec le phosphatidyl inositol-mannoside (Nikaido *et al.*, 1993).

b.1) Le Peptidoglycane

Chez *C. glutamicum*, le peptidoglycane est constitué d'une partie glucidique (il s'agit d'une alternance de N-acétylglucosamine et de N-acétylmuramique reliés par des liaisons osidique $ß_{1-4}$) et une partie peptidique (3 ou 4 acides aminés qui sont reliés par une liaison amide au niveau de la fonction acide carboxylique des acides muramiques) (Schleifer and Kandler, 1972). Les groupes carboxyles de l'acide muramique sont liés aux tri ou tétrapeptides. Les peptides liés sur l'acide muramique de *C. diphtheriae* sont des tétrapeptides (L-Ala-D-Glu-méso-diaminopimélique (DAP)-D-Ala) et des tripeptides (L-Ala-D-Glu-méso-DAP) (Kato *et al.*, 1968). Une liaison entre 2 résidus méso-DAP peut se produire ce qui est typique des Mycobactéries (Wietzerbin *et al.*, 1974). Contrairement aux Corynébactéries, les Mycobactéries analysées présentent de l'acide N-acétyl glycolyl-muramique au lieu de l'acide N-acétyl muramique (Adam *et al.*, 1969; Raymond *et al.*, 2005). Chez *C. glutamicum*, il existe trois voies de synthèse du méso-DAP, la voie de la déshydrogénase, la voie de la succinylase et la voie de l'acétylase. Cette dernière est comparable à la voie de la succinylase excepté que le groupement succinyle est remplacé par le groupement acétyle. Cependant, et pour des raisons inconnues, *C. glutamicum* utilise simultanément la voie de la succinylase et la voie de la déshydrogénase pour synthétiser du méso-DAP (Figure 20), alors que certains microorganismes possèdent uniquement la voie de la succinylase ou de la déshydrogénase (Wehrmann *et al.*, 1998).

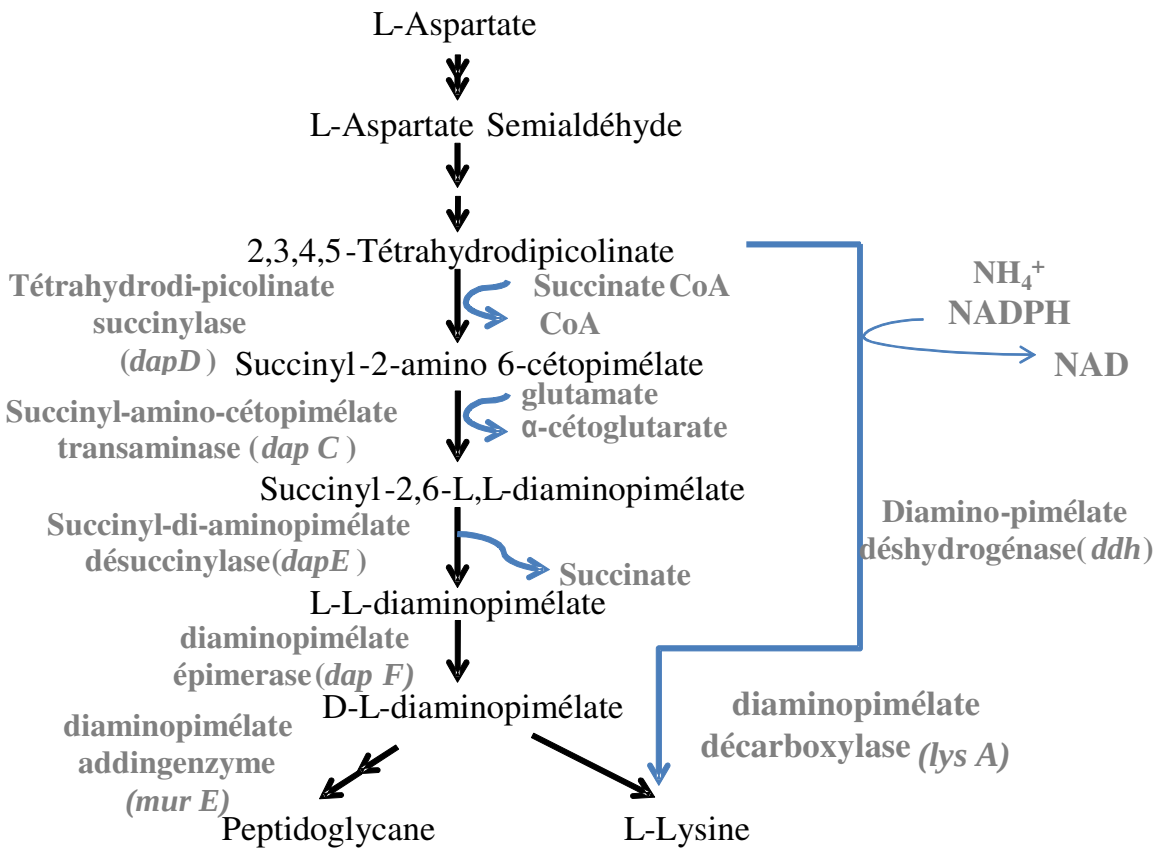


Figure 20 : Voies de synthèse de l'acide méso-diaminopimelique chez *C. glutamicum*. Wehrmann *et al.* (1998). CoA : Coenzyme A.

b.2) L'arabinogalactane

L'arabinogalactane est un hétéropolysaccharide, composé principalement de résidus D-arabinofuranosyles et de résidus D-galactofuranosyles. Chez les bactéries apparentées aux Mycobactéries, l'arabinogalactane est lié de façon covalente au peptidoglycane via une liaison phosphodiester, ce dernier est lui-même lié à du rhamnose et de la glucosamine (Figure 21) (Eggeling and Bott, 2005; McNeil *et al.*, 1990). Chez *M. tuberculosis* environ 10 à 12% des acides muramiques du peptidoglycane forment des liaisons phosphodiesters. Chez *C. glutamicum,*l'analyse de la composition glycosidique de l'arabinogalactane met en évidence un profil similaire à celui de *M. tuberculosis* (Puech *et al.*, 2001). Contrairement à *C. glutamicum*, l'arabinogalactane purifié de *C. diphtheriae, C. xerosis, C. amycolatum et C. hoffmanii* contient en plus de l'arabinose et du galactose soit du glucose ou du mannose (Abou-Zeid *et al.*, 1982). Un profil similaire a été observé pour les espèces des genres *Rhodococcus* et *Nocardia* (Daffe *et al.*, 1993).

Le core galactane de l'arabinogalatane est composée d'unités galactofuranosyles liées par une alternance de liaison $\beta_{1\text{-}5}$ et $\beta_{1\text{-}6}$ (Besra *et al.*, 1995). Cette colonne est connectée avec des unités arabinofuranosyles au niveau de l'á-D-arabinofuranosyle et permet une liberté maximale de mouvement entre les résidus sucrés. Bien que le mycoloylarabinoside ait été isolé chez *Corynebacterium sp*. (Lanéelle and Asselineau, 1977), la localisation précise du résidu mycoloyle sur le polysaccharide reste à découvrir. Du fait du peu d'acides mycoliques liés à l'arabinogalactane chez les Corynébactéries, il a été supposé que le résidu corynomycoloyle est localisé sur l'unité 5 ß-arabinosyle terminale (Figure 21). Cette position est probablement faite pour faciliter le mouvement et l'empilement des acides mycoliques.

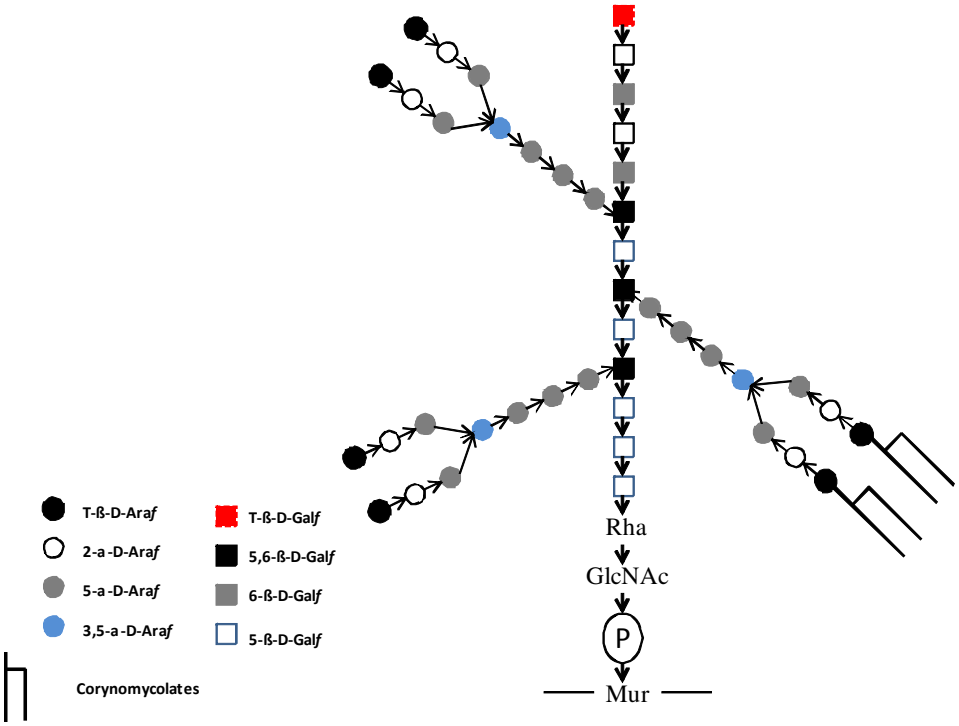


Figure 21 : Structure de l'arabinogalactane chez *C. glutamicum*. D-Araf: D-arabinofuranosyl; **D-Galf** : D-galactofuranosyl; **Mur** : acide muramique; **Rha** : rhamnose; **GlcNAc** : glucosamine. Eggeling et Bott (2005).

b.3) Les Acides mycoliques

b.3.1) Synthèse et structure des acides mycoliques

La structure des acides mycoliques a été caractérisée pour la première fois chez *C. diphteriae* (Lederer *et al.*, 1952). Il s'agit d'acides gras à longues chaînes á-ramifiés, ß-hydroxylés (Figure 22). Ils sont spécifiques des *Corynebacterineae*, cependant certaines

espèces appartenant au genre *Corynebacterium* telles que *C. amycolatum* sont dépourvues de ces acides mycoliques (Barreau *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1982).

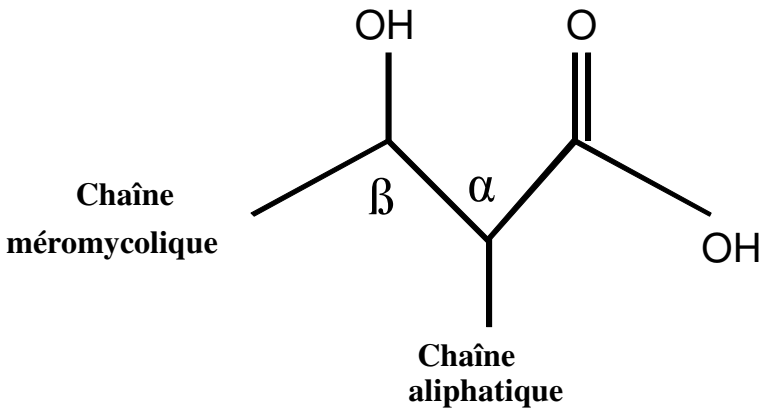


Figure 22 : **Structure d'un acide mycolique.** ß et á indiquent la position des carbones par rapport à la fonction carboxylique.

La structure de base des acides mycoliques, identique chez toutes les espèces, leur confère la propriété d'être clivable à haute température en aldéhyde et en acide. Le nombre d'atomes de carbone et le degré de saturation de ces acides mycoliques varient selon les familles et le genre considéré. Chez *M. tuberculosis,* la longueur de la chaîne aliphatique, peut atteindre 90 carbones (eumycolate), chez *Nocardia sp*. elle peut atteindre 50 carbones (nocardomycolate) et les chaînes les plus courtes (22 à 36 unités) ont été identifiées chez *Corynebacterium sp*. (corynomycolate) (Barreau *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1982). Chez *C. glutamicum*, les corynomycolates représentent entre 30 et 40% des lipides totaux, le degré de saturation de leur chaînes corynomycoliques varie entre 0 et 2 et les acides mycoliques majoritaires sont le $C_{32:0}$, le $C_{34:1}$ et le $C_{36:2}$ (Figure 23 A) (Collins *et al.*, 1982; Gailly *et al.*, 1982; Huchenq, 1983; Puech *et al.*, 2001). Chez les Mycobactéries, les acides mycoliques peuvent être classés en deux groupes, les á-mycolates et les mycolates oxygénés. Ces derniers ne sont pas observés chez les *Corynebacteriaceae.*

Avant de synthétiser les acides mycoliques, la cellule produit d'abord des acides gras. Ces acides gras issus de l'acétyl-CoA sont utilisés pour la synthèse des phospholipides et des acides mycoliques. Chez les Corynébactéries, le mécanisme de synthèse des acides mycoliques n'est pas connu. Il est supposé que les acides mycoliques résultent de la condensation de deux acides gras. La synthèse de ces acides gras fait intervenir le système Fas I (Fatty acid synthase I). Ce système contient deux protéines codées par *fas A* (Fas I A) et par *fas B* (Fas I B) chez *Brevibacterium ammoniagenes* et *C. glutamicum*, alors que *M.*

tuberculosis et *C. diphtheriae*, possèdent uniquement le gène *fas-I*. Chez *C. glutamicum, fas A* est essentiel à la croissance, alors que *fas B* ne l'est pas (Cole *et al.*, 1998; Radmacher *et al.*, 2005a; Stuible *et al.*, 1996).

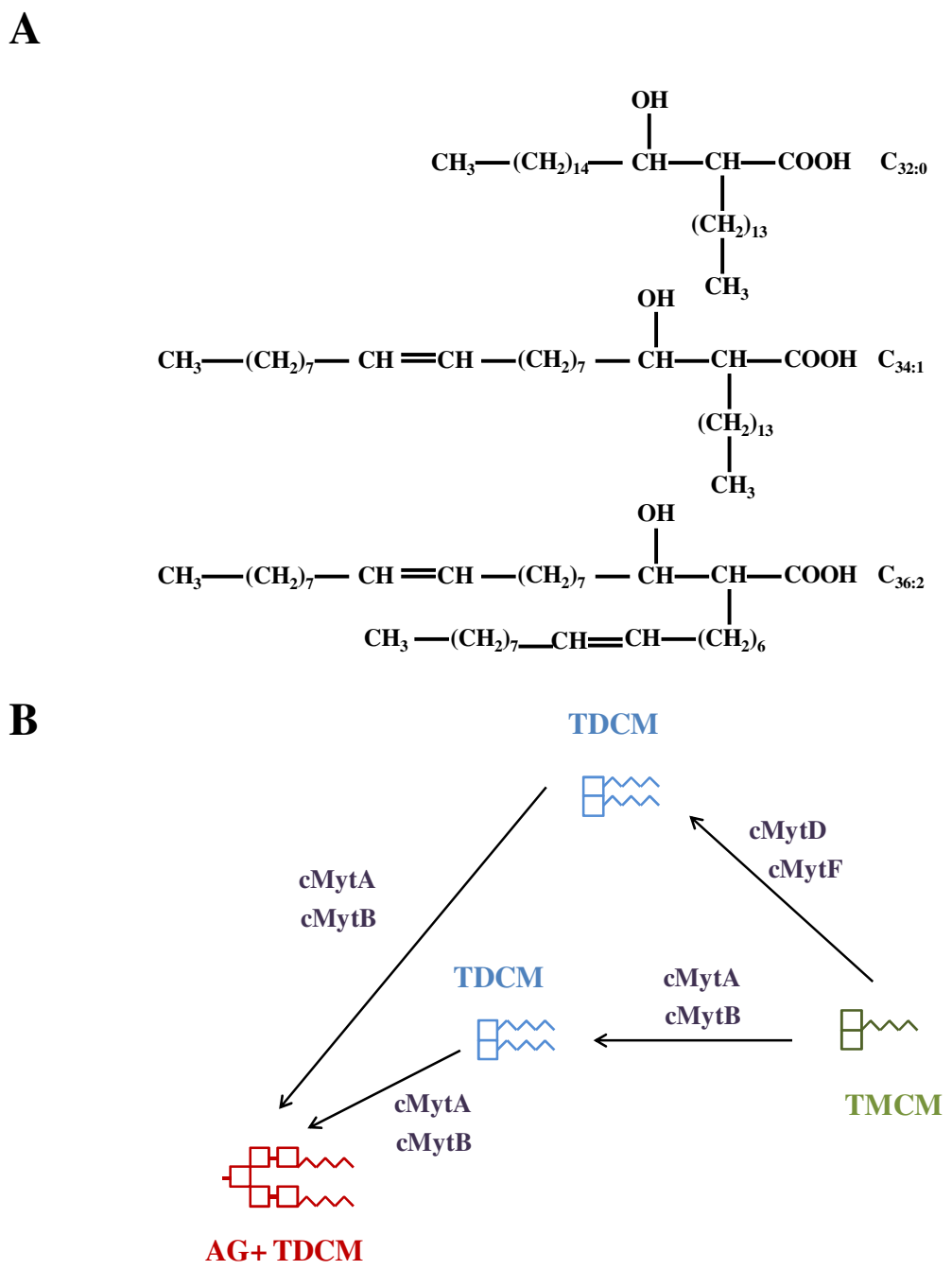


Figure 23 : Structure et substrats spécifiques des mycoloyltransferases (A) Structure des acides corynomycoliques majoritaires $C_{32:0}$;$C_{34:1}$ et $C_{36:2}$ et **(B)** Substrats spécifiques des mycoloyltransférases de *C. glutamicum.* **cMytA** et **cMytB** transfèrent des résidus mycolyles soit sur un autre monocorynomycolate de tréhalose (**TMCM**) pour former un dicorynomycolate tréhalose (**TDCM**) ou sur l'arabinogalactone (**AG**). **cMytD** et **cMytF** sont uniquement capables de synthétiser du **TDCM** à partir du **TMCM**. Eggeling et Bott (2005).

L'analyse de la composition lipidique chez des mutants sans *fas B* ou sans *fas A* chez *C. glutamicum* met en évidence que le système FAS-IB catalyse la synthèse de palmitate (C16:0) uniquement alors que le système Fas-IA catalyse la synthèse de l'oléate (C18 :1), du stéarate et d'une faible concentration de palmitate (Radmacher *et al.*, 2005a). Par ailleurs la synthèse d'oléate, de stéarate et de palmitate par le système Fas I varie considérablement avec la température de culture chez *B. ammoniagenes* (Kawaguchi *et al.*, 1981). Okazaki *et al.* (1967) rapportent que le L-glutamate peut être produit en utilisant un mutant auxotrophe pour l'acide oléique (Okazaki *et al.*, 1967). Une concentration de 6,8 $g.l^{-1}$ (46,2 mM) a été atteinte après 48h de culture avec le mutant délété pour *fas A* lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone. Alors que 0,3 mM et 0,1 mM de L-glutamate sont accumulés respectivement chez le mutant sans *fas B* et la souche référence de *C. glutamicum* (Radmacher *et al.*, 2005a).

Les acides mycoliques sont toujours estérifiés soit en complexe mycoloyl-arabinogalactane soit au tréhalose ou au glycérol. Lorsque les acides mycoliques sont estérifiés avec le tréhalose, ils forment le monomycolate et le dimycolate de tréhalose (respectivement TMCM et TDCM), alors que lorsqu'ils sont estérifiés avec le glycérol, ils forment du monomycolate de glycérol (MG) (Ioneda *et al.*, 1981; Ioneda and Silva, 1979; Lanéelle and Asselineau, 1977; Puech *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 1967; Shimakata and Minatogawa, 2000; Tsumita, 1956; Yague *et al.*, 2000). A ce jour, seuls les acides mycoliques liés à l'arabinogalactane, le TMCM, le TDCM et MG sont identifiés chez les *Corynebacterineae.*

Les enzymes qui catalysent le transfert de résidus mycoloyles sur le tréhalose et/ou sur l'arabinogalactane ont été identifiées et caractérisées chez les Mycobactéries (Belisle *et al.*, 1997) et les Corynébactéries (Puech *et al.*, 2000). Chez *C. glutamicum*, la mycoloylation de l'arabinogalactane et du TMCM est catalysée par PS1 (Puech *et al.*, 2000). Par ailleurs la production des glycolipides (TDCM, TMCM) et des corynomycolates liés chez un mutant dépourvue du gène *csp1* codant PS1 indique la présence d'autres mycoloyltransférases. Chez *C. glutamicum* pas moins de 6 gènes *fpb* ont été identifiés (Brand *et al.*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003). Les produits de ces gènes sont plus petits en taille (341 à 483 acides aminés contre 657 acides aminés pour PS1). Ils possèdent tous un peptide signal et sont localisés dans la paroi. Tous les gènes codant les mycoloyltransférases sont nommés *cmyt* pour **c**orynebacterial **my**colyl**t**ransferase et même le gène *csp*1a été renommé en *cmyt* par De Sousa-D'Auria *et al* (2003). Chez *C. glutamicum* CGL2005 on distingue donc les protéines cMytA, cMytB, cMytC, cMytD, cMytE et cMytF. Des études de complémentation de mutants

avec les gènes codant les différentes mycoloyltransférases ont permis de distinguer deux classes de *cmyt* (Figure 23 B), ceux qui codent les protéines cMytD et cMytF qui synthétisent uniquement du TDCM à partir du TMCM et ceux qui codent les protéines cMytA et cMytB qui sont capables de transférer un résidu mycoloyle d'un TMCM pour former un TDCM et de lier ce dernier à l'arabinogalactane (De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003).

b.3.2) Organisation des acides mycoliques

L'organisation des acides mycoliques dans l'enveloppe des Mycobactéries et des Corynébactéries reste un sujet de discussion. Dans la littérature on peut trouver plusieurs propositions de modèles d'organisation. En 1982, Minnikin propose le tout premier modèle d'organisation en pseudo-bicouche lipidique des acides mycoliques liés à l'arabinogalactane avec les lipides complexes associés à la paroi (Minnikin, 1982). Dans ce modèle, les chaînes acylées des lipides associés à la paroi s'intercalent à la monocouche formée par les acides mycolique liés à l'AG. Le modèle de Minnikin a été soutenu quelques années plus tard par une autre équipe (Nikaido *et al.*, 1993). Dans ce modèle une quantité suffisante d'acides mycoliques est présente pour former une monocouche ordonnée chez *M. bovis*. Cependant chez *C. glutamicum*, Puech *et al*. (2001) propose un modèle d'organisation différent de celui de *M. bovis*, car la quantité d'acides mycoliques liée à l'arabinogalactane ne serait pas suffisante pour recouvrir la surface de la bactérie. Ainsi, les auteurs proposent que le TMCM et TDCM compensent ce défaut d'acides corynomycoliques pour former la monocouche interne de la pseudo-bicouche lipidique (Puech *et al.*, 2001). Par la suite, les modèle de Rastogi et Liu décrivent une structure dans laquelle les lipides associés à la paroi forment une monocouche distincte plutôt que de s'intercaler avec les acides mycoliques liés à l'arabinogalactane (Liu *et al.*, 1995; Rastogi, 1991). Depuis peu, un nouveau modèle d'organisation de l'enveloppe vient remettre en cause les anciens modèles (Zuber *et al.*, 2008). Ce modèle s'appuie sur des travaux qui ont permis de mettre en évidence la mycomembrane des Corynébactéries et des Mycobactéries, en conditions natives grâce à la technique de cryo-microscopie électronique CEMOVIS. Les auteurs de ce modèle ont pu montrer que les chaînes acylées des acides mycoliques liés à l'arabinogalactane et des lipides associés (TMCM, TDCM) s'intercalent formant une structure en fermeture éclair (Figure 24). Chez les Corynébactéries, ces deux lipides sont retrouvés associés alors que chez les Mycobactéries, les deux lipides associés sont présents avec quelques glycérophospholipides (GPL). Le modèle de Zuber estime l'épaisseur de la membrane externe des Mycobactéries de 7 à 8 nm et celle des Corynébactéries de 4 à 5 nm. L'organisation générale de la pseudo-

bicouche lipidique serait alors analogue à celle de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, formant une seconde barrière de perméabilité aux solutés hydrophiles.

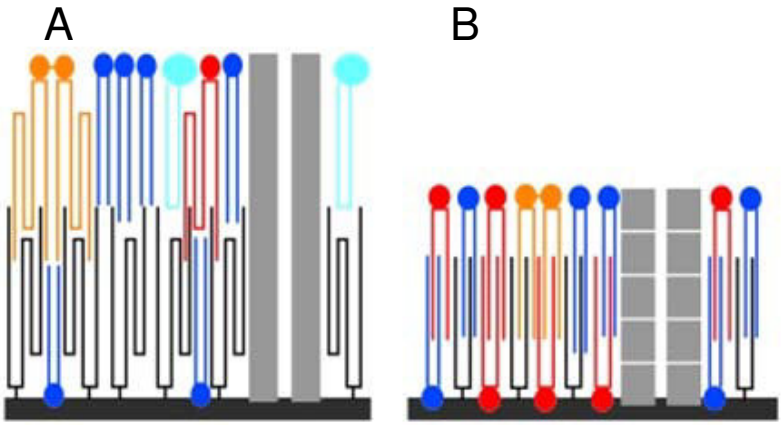


Figure 24 : Modèle de la membrane externe chez les *Corynebacterineae*.
(A) Mycobactéries **(B)** Corynébactéries. Barre horizontale **arabinogalactane** (Noir); **GPL** (glycérophospholipides) (Bleu clair); **phospholipides** (Bleu foncé) ; **TMCM (**Tréhalose monomycolate) **(**Rouge) ; **TDCM** (Tréhalose dimycolate) (Orange) ; **Acides mycoliques** (Noir) ; **Porines** (Gris clair). Zuber *et al.* (2008).

b.4) La couche externe

L'analyse de la composition moléculaire de la couche externe chez les *corynebacterineae* indique la présence d'une majorité de polysaccharides (90%). Ces polysaccharides sont essentiellement constitués d'arabinose, de mannose et de glucose (Lemassu and Daffe, 1994; Lemassu *et al.*, 1996). Chez *C. glutamicum* et les autres espèces de Corynébactéries, les polysaccharides sont composés de glucanes neutres (polymère de glucose) de 110 kDa (Puech *et al.*, 2001) et de deux types d'arabinomannanes dont la masse moléculaire est de 13 et 1,7 kDa (Lemassu and Daffe, 1994; Lemassu *et al.*, 1996). Chez les Mycobactéries, un type d'arabinomannane de plus haut poids moléculaire est présent dans les polysaccharides de surface (Ortalo-Magne *et al.*, 1995).

c) Protéines de l'enveloppe de *C. glutamicum*

Chez *C. glutamicum,* entre 100 et 120 protéines ont été mises en évidence lors de l'analyse de l'enveloppe et de la membrane cytoplasmique par électrophorèse à 2 dimensions (Hermann *et al.*, 2000; Hermann *et al.*, 2001). Parmi toutes ces protéines, se retrouvent les protéines impliquées dans le transport du résidu mycololyle sur leurs accepteurs au niveau de l'enveloppe. Depuis peu, des protéines appelées porines ancrées dans la couche d'acides mycoliques ont été découvertes chez *C. glutamicum* (Niederweis *et al.*, 1995). Elles forment

des canaux ioniques à travers l'enveloppe et permettent l'incorporation de solutés hydrophiles. A ce jour, ces porines ont été identifiées dans toutes les enveloppes des *Corynebacteriaceae* (Kartmann *et al.*, 1999; Raynaud *et al.*, 2002; Senaratne *et al.*, 1998).

Des protéines sont également retrouvées à la surface de certaines Corynébactéries, parmi lesquelles nous pouvons citer la protéine PS2 (Peyret *et al.*, 1993). La protéine PS2 intervient dans la formation d'un réseau paracrystallin ordonné à la surface de la bactérie, encore appelé couche-S (ou S-layer). Cette dernière n'a été, à ce jour, retrouvée que chez certaines Corynébactéries. La formation de la couche-S dépend des conditions de croissance et de la source de carbone. Par exemple la surface de *C. glutamicum* ATCC 14752 est entièrement recouverte de protéine PS2 lorsque les cellules poussent dans un milieu solide en présence de glucose, tandis que la surface est partiellement recouverte lors d'une croissance en milieu liquide. Enfin le remplacement du glucose par le lactate comme source de carbone dans le milieu de culture, augmente la concentration de protéine de surface (Soual-Hoebeke *et al.*, 1999). La protéine PS2 est solidement associée à la surface et résiste aux protéases et aux détergents (Chami *et al.*, 1997).

III.B.4. Modèle de l'enveloppe des *Corynebacterineae*

Une structure de l'enveloppe des *Corynebacterineae*, basée sur tous les modèles décrits précédement, est présentée dans la Figure 25. L'organisation générale de l'enveloppe des Corynébactéries reste similaire à celle des Mycobactéries (Puech *et al.*, 2001). Chez les Corynébactéries, l'enveloppe est composée d'une membrane plasmique de 6 à 7 nm d'épaisseur, d'une paroi de 15 à 20 nm d'épaisseur, d'une mycomembrane de 7 à 8 nm d'épaisseur et d'une couche externe fine de 2 à 3 nm d'épaisseur. Par ailleurs, l'analyse de l'enveloppe des *Corynebacterieae* par Zuber *et al.*(2008) décrit la présence d'un périplasme et d'une couche granuleuse dont la fonction reste inconnue (Zuber *et al.*, 2008).

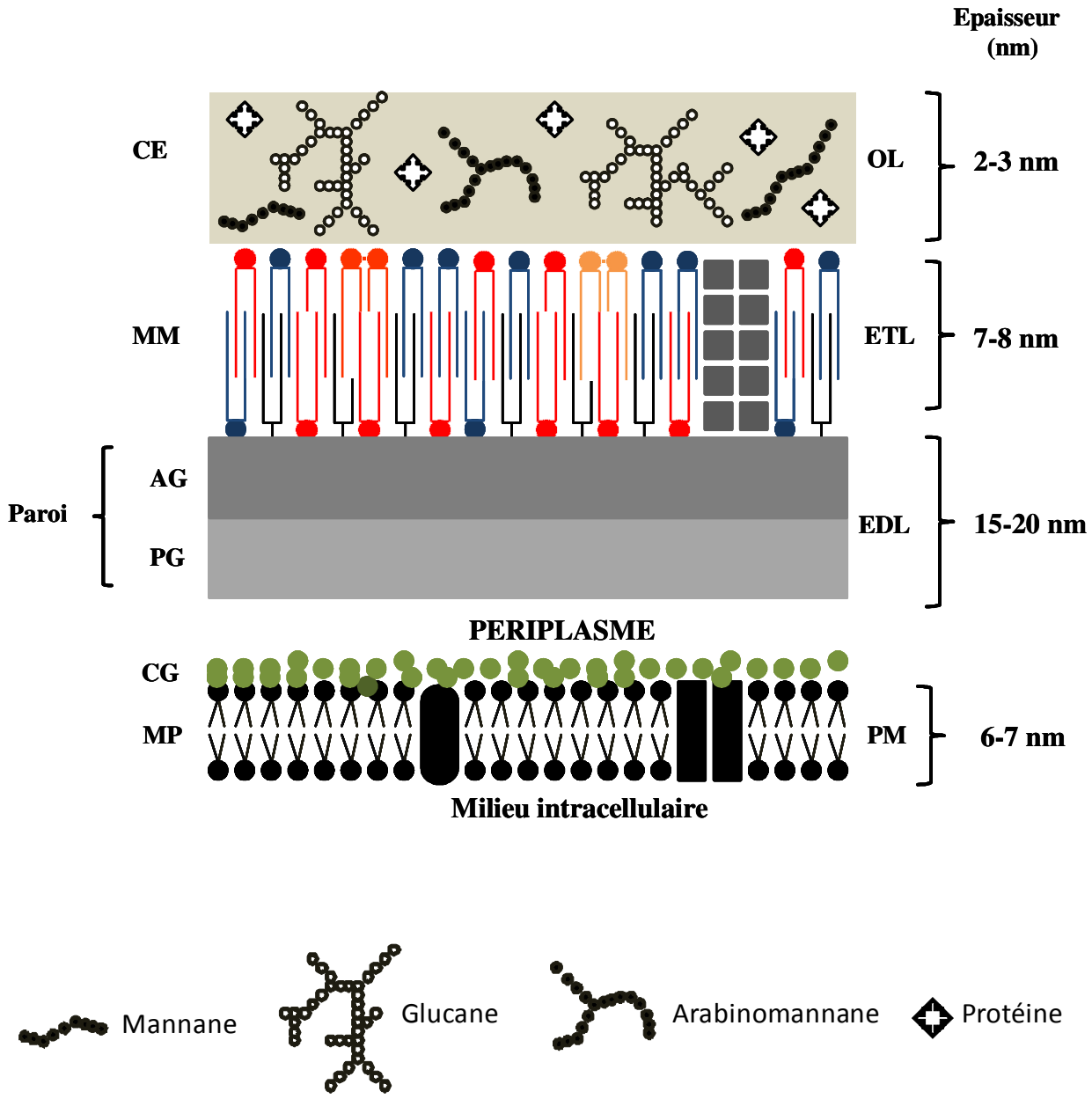


Figure 25 : Modèle schématique de l'enveloppe des *Corynebacterineae* d'après les données récentes de la littérature Zuber *et al*. (2008), Puech *et al*. (2001), Meniche (2007). Membrane plasmique (**MP / PM**), couche granuleuse correspondant aux protéines de l'espace périplasmique (**CG**), arabinogalactane (**AG/EDL**), peptidoglycane (**PG/EDL**), mycomembrane (**MM / ETL**), couche externe (**CE / OL**). La mycomembrane est composée de phospholipides (en bleu) ; de tréhalose monomycolate (TMCM, en rouge) ; de tréhalose dimycolate (TDCM, en orange) ; d'acides mycoliques (en noir) ; de porine (en gris).
EDL: Electron Dense Layer; **ETL**: Electron Transparent Layer; **OL**: thin Outer Layer.

III.C. Perméabilité et fluidité de l'enveloppe

III.C.1. Perméabilité de la membrane plasmique pour le passage des acides aminés

Le transport des acides aminés à travers la membrane plasmique de *C. glutamicum* nécessite soit des transporteurs spécifiques ou se fait tout simplement par diffusion (Figure 26). La L-lysine, la L-thréonine et les acides aminés branchés tels que la L-isoleucine, la L-valine et la L- leucine ont des transporteurs spécifiques au niveau de la membrane plasmique.

Le transport de la L-isoleucine à travers la membrane plasmique a été étudié chez *C. glutamicum*. L'isoleucine est excrétée soit par diffusion due à son hydrophobie, soit par un transporteur spécifique dépendant de la force protomotrice. Le transporteur de L-isoleucine est codé par deux gènes *brnE et brnF* et est activé ou réprimé selon la concentration intracellulaire de l'isoleucine. Lorsque celle-ci est supérieure à 7 mM, le transport de l'isoleucine est activé. Par ailleurs, ce transporteur est également celui de la L-valine et de la L-leucine (Hermann and Kramer, 1996; Kennerknecht *et al.*, 2002; Zittrich and Kramer, 1994).

Le transporteur du L-glutamate n'a été identifié qu'en 2007 par Nakamura *et al*. et le mécanisme d'activitation de ce dernier lors d'un procédé de production du glutamate reste inconnu.

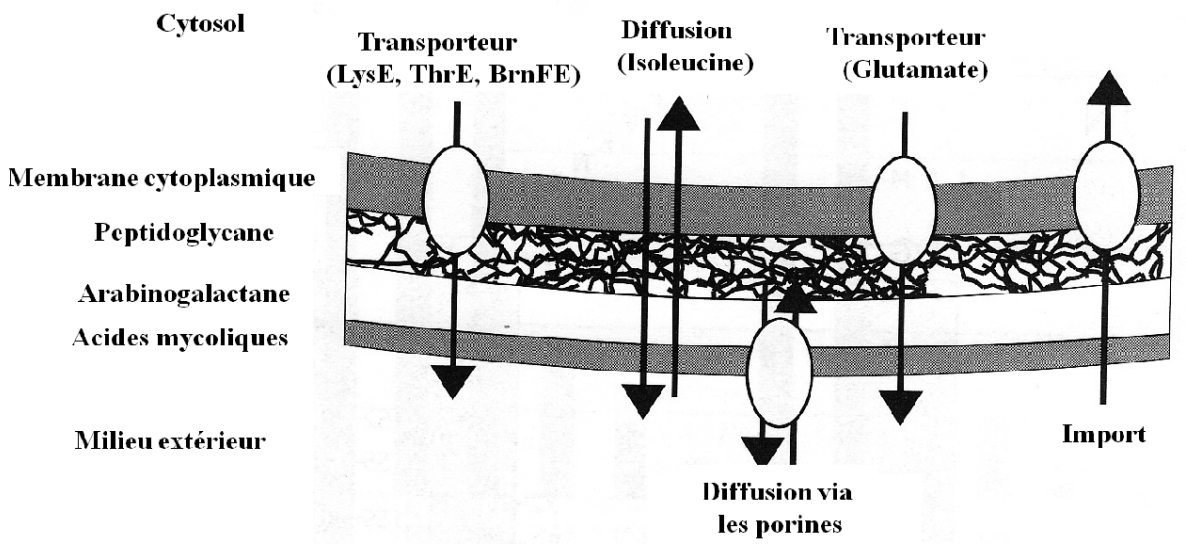


Figure 26 : Traversée de l'enveloppe de *C. glutamicum* par les acides aminés. Eggeling et Bott (2005) et Nakamura *et al.* (2007).

a) Système d'export des acides aminés

De nombreux facteurs clefs impliqués dans la régulation de chaque étape de la biosynthèse des acides aminés ont été très étudiés. Ce n'est pas le cas des exporteurs des acides aminés qui eux, ont fait l'objet de peu d'études. Ainsi il était autrefois supposé que l'excrétion du glutamate se faisait par diffusion simple à travers la membrane plasmique (Mori and Shiio, 1983; Takinami *et al.*, 1965).

a.1) Excrétion de L-lysine

Le gène codant le transporteur spécifique de la lysine *lysE* a été mis en évidence par complémentation d'un mutant de *C. glutamicum* dépourvu de l'exporteur (Vrljic *et al.*, 1995). Le transporteur LysE est un polypeptide de 233 acides aminés. La transcription du gène *lysE* est contrôlée par le régulateur LysG. Chez *C. glutamicum*, le régulateur LysG appartient à une grande famille de régulateur dite LysR-type transcriptional regulators (LTTR). *C. glutamicum* possède 10 régulateurs appartenant à cette famille (Henikoff *et al.*, 1988). Des études ont montré que *in vivo* le régulateur LysG interagit avec une région intergénique *lysE-lysG* et que *in vitro* le régulateur LysG interagit avec le promoteur de *LysE* (Bellmann, 2000). Le co-inducteur de la transcription du gène *lysE* est la L-lysine (concentration intracellulaire comprise entre 35 et 42 mM) ou la L-arginine. Ces deux acides aminés sont exportés par LysE avec une vitesse similaire de 0,75 $nmol.min^{-1}mg^{-1}$. D'autres acides aminés basiques tels que la L-arginine, la L-citrulline et la L-histidine sont reconnues par le régulateur LysG pour activer la transcription du gène *lysE*. Cependant, la L-citrulline et la L-histidine ne sont pas exportées par le transporteur LysE. Le rôle physiologique du système LysE-LysG est d'empêcher une bactériostase due à des concentrations élevées en L-lysine ou en L-arginine. En effet, comme l'arginine, la lysine est un acide aminé qui n'est pas dégradé après sa synthèse. *C. glutamicum* possède d'autres exporteurs capables d'exporter la L-histidine, la L-citrulline et la L-ornithine (Bellmann *et al.*, 2001).

a.2) Excrétion de L-thréonine

Le gène *thrE* codant l'exporteur de la L-thréonine est exprimé lorsque les conditions de culture sont favorables et en présence de peptides riches en thréonine. Lorsque le gène *thrE* est surexprimé, la L-thréonine est exportée avec une vitesse de 3,8 $nmol.min^{-1}mg^{-1}$, alors qu'un mutant délété du gène *thrE* a une vitesse d'export plus faible (1,1 $nmol.min^{-1}mg^{-1}$). La

L-sérine est également un substrat de ThrE. L'efflux de L-thréonine débute dès lors que sa concentration intracellulaire atteint 170 mM. A cette concentration, trois composants indépendants contribuent à l'export de la L-thréonine. L'excrétion de la L-thréonine par le système d'export représente 59 %, alors que 22 % sont excrétés par diffusion simple et les 19% restant empruntent une voie à ce jour inconnue (Simic *et al.*, 2001). L'activité d'export de la L-thréonine dépend de la force protomotrice (Palmieri *et al.*, 1996). Il a été rapporté dans la littérature que *C. glutamicum* est incapable de tolérer une concentration intracellulaire élevée en L-thréonine et que l'export de cet acide aminé est limité (Archer *et al.*, 1991; Ishida *et al.*, 1994). Des différences entre le système d'export de la L-thréonine et celui de la L-lysine existent. Le système LysE-LysG contrôle la concentration intracellulaire de la L-lysine ou de la L-arginine par l'export, tandis qu'une concentration importante de L-thréonine et la présence du transporteur ThrE ne permettent pas d'augmenter l'activité du transporteur. Néanmoins la surexpression du transporteur ThrE permet une augmentation de 40% de l'accumulation de L-thréonine dans le milieu extérieur (Simic *et al.*, 2002). L'étape d'excrétion reste l'étape limitante dans le processus de production de L-thréonine.

a.3) Excrétion du glutamate chez *C. glutamicum*

Le glutamate est un acide aminé dicarboxylique (Figure 27), hydrophile chargé. Il est incapable de diffuser librement la membrane plasmique. En limitation en biotine, le L-glutamate est exporté massivement à une vitesse de 20 $nmol.min^{-}1.mg^{-1}$. Des études ont montré que l'étape d'excrétion était l'étape limitante lors du procédé thermo-induit de production de glutamate (Lapujade, 2000; Lapujade *et al.*, 1999). Nampoothiri et son équipe (Nampoothiri *et al.*, 2002) ont pu déclencher une production de glutamate en mutant la voie de biosynthèse des phospholipides, mais ces mutants requièrent encore un stress pour l'induction de l'excrétion du glutamate.

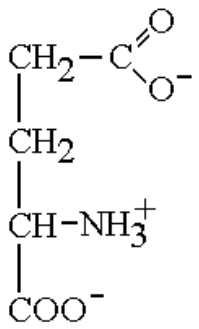


Figure 27 : Glutamate ou acide glutamique. pKa=2,2; pKb=9,7 pKr= 4,3 et pHi= 3,2.

La perméabilité de la membrane de *C. glutamicum* est inchangée en limitation de biotine. En consequence les acides aminés, autres que le glutamate, l'acétate et les ions tels que K^+, H^+ et Cl^-, ne sortent pas de la cellule lors de ce procédé de production de glutamate (Gutmann *et al.*, 1992; Hoischen and Kramer, 1990; Krämer, 1994). Malgré des études approfondies concernant les procédés de production du glutamate depuis 1957, aucun système d'export de glutamate n'a été caractérisé avant 2007. A cette date, le gène *NCgl 1221*, codant un exporteur du glutamate chez *C. glutamicum* ATCC 13869 a été identifié. Lorsque le gène *NCgl 1221* est délété, il y a absence d'excrétion du glutamate alors que la surexpression de celui-ci permet une augmentation de la production du glutamate, mais uniquement suite à une induction. Ces résultats suggèrent qu'une modification de l'environnement de l'exporteur glutamate est nécessaire pour permettre l'activation de celui-ci. Il a été proposé que l'induction altère la membrane plasmique et entraine une transformation structurale de la protéine NCgl1221, ce changement structural permettant l'export de l'acide glutamique (Nakamura *et al.*, 2007).

b) Systèmes d'import du glutamate

D'autres systèmes d'import et d'export des acides aminés ont déjà été identifiés dans la membrane plasmique chez *C. glutamicum* (Eggeling and sahm, 2001). Les systèmes d'import tels que Glu ABCD, Lys I, BrnQ, AroP, sont impliqués dans le transport de certains acides aminés comme le L-glutamate, la L-lysine, la L-Isoleucine, et les acides aminés aromatiques chez *C. glutamicum* (Eggeling and Sahm, 2003; Seep-Feldhaus *et al.*, 1991; Wehrmann *et al.*, 1995). *C. glutamicum* possède deux systèmes d'import du glutamate. Le

premier système, Glu ABCD, grâce auquel l'entrée du glutamate se fait avec une forte affinité (K_m 0,5 à 1,3 µM) et à une vitesse V_{max} de 15 nmol.min^{-1}mg^{-1}, est sous le contrôle de la répression catabolique par le glucose ou le saccharose (Kronemeyer *et al.*, 1995). Des auteurs rapportent que l'expression des gènes *gluABCD* est fortement régulée par la source en azote (Burkovski, 2003). En présence de fortes concentrations en ammonium, la croissance de *C. glutamicum* est inhibée quand le L-glutamate est utilisé comme source de carbone (Shiio *et al.*, 1982). Le second transporteur a une affinité modérée pour le L-glutamate (K_m de 0,6 mM) et une vitesse d'import de 15 nmol.min^{-1} mg^{-1}. Ce transport est controlé par le potentiel membranaire et est dépendant des ions sodium (Burkovski *et al.*, 1996).

L'idée que le système d'import du glutamate pouvait jouer simultanément le rôle d'exporteur a vite été écartée, puisque chez un mutant délété pour le système d'import du glutamate l'activité d'export du glutamate n'est pas altérée (Kronemeyer *et al.*, 1995).

III.C.2. Fluidité de la membrane plasmique

a) Effet de la variation de température sur la fluidité de la membrane plasmique

Les acides gras qui composent les phospholipides de la membrane plasmique confèrent à celle-ci une certaine fluidité. La variation de température est un paramètre qui permet de moduler la fluidité membranaire. En augmentant la température de culture, la membrane plasmique passe successivement de l'état de gel cristallin (A) à l'état liquide cristallin (B), puis à une structure hexagonale inversée (C) (Figure 28). Dans cette dernière configuration, la partie polaire des lipides forme des cylindres, et la partie apolaire remplit l'espace entre les cylindres. La structure hexagonale inversée présente une forte fluidité, de ce fait la structure de protéines membranaires, dont les transporteurs, peut être altérée (Beney and Gervais, 2001).

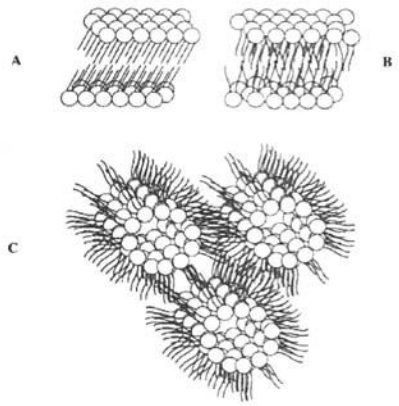


Figure 28 : Effet de la température sur la conformation adoptée par une bicouche lipidique. (A) gel cristallin**, (B)** liquide cristallin, **(C)** structure hexagonale inversée, d'après Beney et Gervais (2001).

b) Variation de la fluidité de la membrane plasmique lors des procédés de production du glutamate

D'autres facteurs influencent le passage d'une membrane d'un état vers un autre. Lors d'un procédé de production de glutamate par limitation en biotine ou suite à un ajout de tensio-actifs, des changements des propriétés de la membrane de *C. glutamicum* se produisent. Sous limitation en biotine (Kanzaki *et al.*, 1967), le rapport entre les acides gras saturés et insaturés change de manière significative. De même l'ajout de tensio-actifs dans le milieu de culture provoque une diminution de la quantité de phospholipides de la membrane plasmique (Huchenq, 1983). Ces modifications observées ont permis la proposition de plusieurs hypothèses susceptibles d'expliquer l'excrétion du glutamate. La première hypothèse a été une altération de la membrane plasmique qui devient perméable au glutamate, ce dernier sortant par diffusion (Demain and Birnbaum, 1968). La seconde hypothèse est le découplage du système d'import du glutamate suite à la diminution de la quantité de phospholipides. Ce découplage rend possible l'excrétion du glutamate (Clément and Laneelle, 1986). Actuellement il est admis que l'excrétion du glutamate est assurée par un transporteur spécifique (Hoischen and Kramer, 1990; Hoischen and Krâmer, 1989; Nakamura *et al.*, 2007). Le rôle de la modification de la composition de la membrane plasmique et donc éventuellement de sa fluidité sur l'activation de ce transporteur spécifique est encore mal compris.

Dans la membrane plasmique de *C. glutamicum* 2262, les acides gras présents sont l'acide palmitique ($C_{16:0}$), l'acide oléique ($C_{18:1}$), l'acide stéarique ($C_{18:0}$), l'acide linoléique ($C_{18:2}$) et l'acide myristique ($C_{14:0}$) à 33°C. Après élévation de la température à 39°C pour

induire l'excrétion du glutamate une modification de la composition lipidique est observée. L'acide linoléique devient indétectable, la proportion en acide palmitique et en acide myristique augmente alors que celle en acide oléique et en acide stéarique diminue. Le changement de la composition lipidique se fait en deux phases. Pendant la première phase de production (moins d'une heure après l'élévation de la température), la proportion en acide palmitique augmente de 58 à 63 % alors que l'acide oléique diminue de 37 à 32 %. En revanche, les pourcentages des acides gras $C_{18:0}$ et $C_{14:0}$ restent constants pendant cette période. Ce profil d'acides gras change pendant la 2ème phase de production, les proportions de $C_{16:0}$ et de $C_{18:1}$ continuent leur augmentation et se stabilisent autour de 83 et 12% respectivement, alors que les proportions de $C_{18:0}$ et de $C_{14:0}$ continuent de diminuer et d'augmenter respectivement. Après induction thermique, tous ces changements aboutissent à une augmentation du rapport acides gras saturés / acides gras insaturés (AG saturés/AG insaturés) de 1,7 (phase de croissance) à 7,3 (phase de production) en fin de culture (Gourdon, 1999). Il est intéressant de souligner que les données de Gourdon (1999) montent que lors de la stabilisation de l'excrétion du glutamate, le rapport AG saturés/AG insaturés cesse d'augmenter et se maintient constant. Les résultats de Gourdon et de son équipe sont parfaitement cohérents avec les donnés de la littérature sur les mécanismes d'adaptation thermique chez les micro-organismes (Richter *et al.*, 1985). L'analyse de l'évolution de ce rapport lors du procédé thermo-induit décrit par Gourdon et Lindley (1999) confirme l'importance du changement de la composition lipidique lors de l'excrétion du glutamate (Gourdon and Lindley, 1999).

III.C.3. Perméabilité de la mycomembrane

La mycomembrane constitue une seconde barrière pour les acides aminés. Un mutant délété du gène *csp1* codant la mycoloyl transférase cMytA chez *C. glutamicum* CGL2005 réduit son pourcentage d'acides mycoliques liés à l'arabinogalactane de 50%, et la vitesse d'entrée de l'acétate et du glycérol est respectivement de 2 et 10 fois plus élevée que dans la souche de référence (Puech *et al.*, 2000). Lorsque les gènes *treY* et *ots A* impliqués dans la synthèse du tréhalose sont délétés, le mutant obtenu est dépourvu des acides mycoliques liés soit au tréhalose ou à l'arabinogalactane et excrète 37% de L-lysine de plus que la souche de référence (Tzvetkov *et al.*, 2003; Wolf, 2002). Ce même mutant présente une accumulation du L-glutamate qui évolue de 40,2 à 45,6 $g.l^{-1}$ (Nakamura *et al.*, 2001). Ces travaux suggèrent que la mycomembrane constitue dans certain cas une barrière qui limite les transferts de molécules à travers l'enveloppe cellulaire. Des auteurs proposent que pour traverser la

mycomembrane, le glutamate comme d'autres acides aminés empruntent des porines. A ce jour, chez *C. glutamicum,* 4 porines ont été identifiées : la porine A (Por A), la porine B (Por B), la porine C (PorC) et la porine H (Por H) (Costa-Riu *et al.*, 2003a; Costa-Riu *et al.*, 2003b; Hunten *et al.*, 2005; Lichtinger *et al.*, 1998). Por A et Por H sont spécifiques des cations alors que PorB et PorC sont spécifiques des anions. Le glutamate, chargé négativement, pourrait emprunter les porines B et/ou C. Cependant l'implication de ces porines (A, B, C et H) sur l'excrétion du glutamate est à ce jour inconnue.

a) Généralités

Tout comme la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, la mycomembrane de certaines Mycobactéries, Corynébactéries, et Nocardia contient des porines, formant des canaux ioniques facilitant le passage des solutés chargés de l'intérieur vers l'extérieur et vis versa. Elles permettent d'éliminer les produits de dégradation éventuellement toxiques pour les bactéries (Lichtinger *et al.*, 1998; Nakae, 1976; Trias and Benz, 1993, 1994; Trias *et al.*, 1992). Leur nombre à la surface de l'enveloppe détermine la perméabilité de celle-ci. En effet d'après des quantifications réalisées chez *M. smegmatis*, celle-ci renferme 50 fois moins de porine que les bactéries à Gram-négatif (Engelhardt *et al.*, 2002). De ce fait, l'enveloppe de *M. smegmatis* est moins perméable. Quant à l'étude structurale des porines, elle n'a été réalisée que chez *E. coli* ou très récemment chez *M. smegmatis*.

La porine OmpF majoritaire chez *E. coli* possède une structure en tonneaux ß organisés en trimères fonctionnels (Jap, 1988). Chez *M. smegmatis*, la protéine est organisée en homo-octamères et adopte une structure générale de type gobelet, constituée de deux tonneaux β consécutifs, formant un canal central hydrophile unique (Faller *et al.*, 2004). Cette structure en tonneaux β est généralement spécifique aux bactéries à Gram-négatif.

b) Caractérisation des 4 porines de *C. glutamicum*

Les gènes codant quatre porines chez *C. glutamicum* ont été identifiés, les protéines caractérisées et leurs activités mesurées. Elles ont été nommées PorA, PorB, PorC et PorH. A ce jour, leur localisation dans la mycomembrane est confirmée. D'après l'épaisseur de la corynomycomembrane estimée par Zuber *et al*. (2008) entre 4 et 5 nm, les porines devraient s'oligomériser pour former un pore.

b.1) Les porines spécifiques des cations

- PorA

Por A est une petite protéine de 45 acides aminés (5 kDa) présentant un excès de quatre charges négatives ce qui est en accord avec une spécificité vis-à-vis des cations. Le gène codant cette protéine, *por A,* a été identifié (Lichtinger *et al.*, 1998). Chez les bactéries à Gram-négatif, les porines homologues à PorA sont de taille plus importante puisqu'elles présentent un poids moléculaire d'au moins 30 kDa (Lichtinger *et al.*, 2001). De ce fait, PorA doit nécessairement s'oligomériser, comme MspA chez *M. smegmatis,* afin de former un canal ionique dans la membrane mycolique. D'après des mesures réalisées en bicouche lipidique plane, PorA a une conductance de 5,5 ns et forme un pore de 8,2 nm de diamètre interne. La conductance mesurée *in vitro* est plus faible que la conductance mesurée *in vivo*. Selon les auteurs qui ont observé cette différence, celle-ci pouvait être attribuée à une modification post-traductionnelle ne se réalisant qu'*in vivo* (Hunten *et al.*, 2005). L'existence de cette modification a été confirmée par séquencage en condition basique (Lichtinger *et al.*, 2001) ainsi que par hydrolyse chimique. Por A est acylée sur la sérine 15 par un acide mycolique (C_{32} ou C_{34-1}). Cette acylation semble être indispensable pour que Por A soit active (Meniche, 2007).

- PorH

L'identification et la caractérisation d'un nouveau canal cation sélectif nommé PorH est récente. Le gène *porH* est localisé près du gène *porA*. Une RT-PCR révèle que *porA* et *porH* sont co-transcrits que leurs produits ont une masse moléculaire similaire de 5 kDa. PorH a des caractéristiques physico-chimiques équivalentes à celle de PorA. PorH a une conductance de 2,5 nS et un diamètre calculé de 2,2 nm (Hunten *et al.*, 2005). Une modification post-traductionnelle a tout récement été montrée sur Por H (Huc *et al.*, 2010).

Très récemment, il a été rapporté que PorH et PorA formerait ensemble une structure hétéro-oligomérique permettant la constitution d'un canal ionique fonctionnel chez *C. glutamicum, C. efficiens, C. diphtheriae* et *C. callunae* (Barthe *et al.*, 2010). Ces résultats contredisent ceux décrit à ce jour qui rapportent que chez *C. glutamicum* chaque porine forme un canal ionique unique qui traverserait la corynomycomembrane en s'oligomérisant.

b.2) Les porines spécifiques des anions

- PorB

PorB est un polypetide de 10 kDa (Costa-Riu *et al.*, 2003b). Le pore formé par PorB semble beaucoup moins large que celui de PorA. D'après des analyses électrophysiques réalisées en bicouche lipidique plane, PorB a une conductance de 0,7 nS et un diamètre interne calculé de 1,4 nm. PorB est spécifique des anions, bien que cette protéine présente un excès de 8 charges négatives. Cette contradiction entre la charge et la fonction de PorB, Costa-Riu et son équipe l'expliquent par la conformation des porines. En effet, PorB a une conformation qui lui permet d'exposer ses charges positives à l'intérieur du canal ionique et de ce fait, toutes les molécules chargées négativement peuvent traverser la porine. Contrairement à PorA, aucune modification post-traductionnelle de PorB n'est décrite à ce jour

- PorC

Le gène *porC* est situé à 138 pb du gène *porB* et est considéré comme son duplicata. Le gène *porC* possède 30% d'homologie avec *porB*. De plus, comme PorB, PorC a une masse théorique de 10 kDa, a un peptide signal et est spécifique des anions (Costa-Riu *et al.*, 2003b). Aucune modification post-traductionnelle de PorC n'est connue à ce jour.

III.C.4. Variation de la fluidité de la mycomembrane lors des procédés de production du glutamate

Deux méthodes décrites dans la littérature, permettent d'évaluer la fluidité mycomembranaire suite à une élévation de température chez *C. glutamicum* 2262. La première méthode est basée sur une analyse chimique de la mycomembrane alors que la seconde méthode est basée sur la la mesure de l'anisotropie de fluorescence grâce à la sonde TMA-DPH (Bokas *et al.*, 2007; Meniche *et al.*, 2009).

a) Influence de la température sur la fluidité de la mycomembrane : analyse chimique

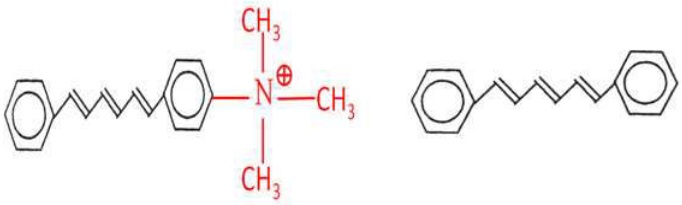
La structure des acides mycoliques détermine la perméabilité de la mycomembrane des *Corynebacterineae*. La perméabilité de la mycomembrane des Corynébactéries reste légèrement plus élevée que celle des Mycobactéries. Cette différence de perméabilité est due essentiellement à la différence de longueur des acides mycoliques de cette bicouche. La fluidité des membranes mycoliques des Corynébactéries et Mycobactéries dépend fortement

de la température de transition de phase. L'enveloppe de *Mycobacterium chelonae* possède des lipides dont la température de transition est entre 30 et 65°C (une bicouche lipidique passe d'un état ordonné à un état désordonné lorsque la température de transition est atteinte). De ce fait, l'enveloppe est difficilement perméable et sa fluidité est faible car la température de transition est supérieure à la température de croissance de *M. chelonae* (30°C) (Liu *et al.*, 1995). Par contre, la température de transition de bicouche lipidique d'autres bactéries telle que *E. coli* est de 30°C alors que sa température de croissance est à 37°C (Melchior and Steim, 1976).

Les acides mycoliques peuvent subir une modification structurale lorsque la cellule qui les contient perçoit un stress extérieur. Chez *C. glutamicum*, le gène *rv3802*, gène conservé chez les *Corynebacterineae*, essentiel chez *M. smegmatis* mais non essentiel chez *C. glutamicum*, code le facteur de régulation ElrF contrôlant la composition lipidique de la mycomembrane. L'expression de ce gène est induite uniquement suite à une élévation de la température. Une augmentation de la température de culture à 42°C provoque une modification au niveau de la mycomembrane de *C. glutamicum*. La synthèse des acides mycoliques saturés est activée alors que celle des acides mycoliques insaturés diminue (Meniche *et al.*, 2009). Ce remaniement lipidique aide la bactérie à se protéger contre des dommages liés au stress thermique.

b) Evaluation de la fluidité de la mycomembrane lors de la production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 : analyse physique

Les variations de fluidité sont couramment étudiées à l'aide de sondes fluorescentes capables de s'insérer au sein de la bicouche lipidique telles que le 1,6-diphényl-1.3.5-hexatriène (DPH) ou le 1-(4-(triméthylammonium)-phényl)-6-phénylhexa-1,3,5-triène (TMA-DPH) (Haugland, 2002; Kuhry *et al.*, 1983) (Figure 29).



1-(4-(triméthylammonium)-phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)

Figure 29 : Sondes fluorescentes utilisées pour la mesure de la fluidité membranaire. D'aprés Kuhry *et al*. (1983).

La rotation de ces sondes dans la bicouche lipidique dépend de la structure de la membrane. Dans une membrane rigide la sonde ne tourne pas librement à cause d'interactions fortes entre les chaînes d'acides gras. Dans une membrane liquide cristalline, les interactions entre acides gras sont réduites ce qui entraine plus de mouvement des chaînes et donc plus de rotation de la sonde. Quand la sonde tourne librement, la fluorescence devient dépolarisée et la lumière est émise dans toutes les directions (Trevors, 2003). Le rapport entre la polarisation et la fluidité de la membrane cytoplasmique est inverse. L'équipe de Mykytczuk (Mykytczuk *et al.*, 2007) a ainsi mesuré la fluidité membranaire et déterminé la phase de transition en fonction de ces changements environnementaux grâce à la sonde fluorescente DHP que ce soit avec des bactéries, des liposomes ou des membranes.

L'évolution de la fluidité de l'enveloppe cellulaire de *C. glutamicum* a été estimée par mesure de l'anisotropie de fluorescence. Cette grandeur est inversement proportionnelle à la fluidité. L'anisotropie de fluorescence a été suivie à l'aide de la sonde TMA-DPH au cours d'un procédé semi-continu de production de glutamate avec la souche *C. glutamicum* 2262. L'excrétion du glutamate a été induite suite à une élévation brusque de la température de culture de 33 à 39°C. Lorsque la température de culture est maintenue à 33°C, l'anisotropie se maintient et reste constante tout au long de la culture. L'élévation de la température à 39°C n'a aucun effet immédiat sur l'anisotropie. Par contre, après 1heure à 39°C, celle-ci diminue puis après 4 heures se stabilise de nouveau. C'est au moment où l'anisotropie atteint sa valeur minimum que la vitesse spécifique de production du glutamate est maximum. Le fait que l'anisotropie ne soit pas modifiée immédiatement après l'augmentation de température traduit un changement de la composition de l'enveloppe et non une influence physique de la température sur la fluidité de la mycomembrane (Bokas *et al.*, 2007).

IV. L'induction de la synthèse des HSP suite à un stress thermique

Une élévation brutale de température chez *C. glutamicum* 2262 a pour conséquence d'induire la production du glutamate, cependant ce stress thermique à d'autres conséquences sur la bactérie, celle-ci met en place un mécanisme d'adaptation afin de survivre à des températures inhabituelles. Dans la dernière partie de cette partie bibliographique, la réponse au stress thermique chez *C. glutamicum* sera traitée.

IV.A. Généralités

La réponse aux stress est une réponse universelle retrouvée chez tous les organismes. Chez *E. coli*, l'étude de cette réponse est bien avancée (Aertsen *et al.*, 2004; Arsène *et al.*, 2000). Cette réponse est la plus fréquemment utilisée pour étudier l'impact d'un stress thermique sur les systèmes biologiques. Tous les organismes répondent à une soudaine augmentation de la température par la surexpression de plusieurs gènes codant des protéines conservées appelées Heat Shock Proteins (HSP). Il s'agit d'une des classes des protéines chaperonnes. Le rôle des protéines chaperonnes est d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliment tridimensionnel adéquat. Les protéases, pour leur part, dégradent les protéines mal repliées (Dougan *et al.*, 2002; Wickner and Maurizi, 1999; Yura and Nakahigashi, 1999).

Initialement ces protéines chaperonnes ont été découvertes suite à l'augmentation de leur concentration de façon considérable lorsque les cellules sont exposées à de hautes températures, à des poisons métaboliques ou à d'autres types de stress. C'est la raison pour laquelle certaines protéines chaperonnes sont nommées protéines de choc thermique ou protéines de stress. Lors d'un choc de température, la majorité des protéines synthétisées sont des HSP, alors que la synthèse des autres protéines reste stable ou diminue (Yura *et al*., 1993).

L'expression des gènes codant les HSP est contrôlée soit par des facteurs sigma qui reconnaissent les promoteurs de type «heat shock» (heat shock promoters) ou par des régulateurs transcriptionels qui agissent comme des répresseurs ou activateurs en se fixant sur les promoteurs des HSP.

C'est chez *E. coli* que l'étude des protéines chaperonnes est la plus avancée. Le processus de repliement chez *E. coli* fait intervenir au moins quatre protéines chaperonnes (Dnak, DnaJ, GroEL, GroES) et la protéine de stress GrpE. Dès qu'une protéine naissante est suffisamment accessible (Figure 30), DnaJ se fixe sur le polypeptide naissant, Dnak se lie à

l'ATP et rejoint le complexe DnaJ-peptide. Dès que DnaK est fixée au peptide, l'ATP est hydrolysé en ADP. Une fois que le polypeptide est synthétisé, la protéine GrpE se fixe au complexe polypeptide-protéines chaperonnes et l'ADP est libéré par DnaK. Celle-ci se lie à un ATP et il y a dissociation de Dnak et DnaJ du polypeptide. Dans le cas ou la protéine est mal repliée, ce processus est répété. Il a souvent été observé que DnaK et DnaJ dirigent le polypeptide vers d'autres protéines, GroEL et GroES, pour un repliement final. GroEL est composé d'un anneau de 14 sous unités et se fixe à l'ATP. Cette fixation de l'ATP et son hydrolyse modifient l'affinité de la chaperonne sur le polypeptide et régulent la liaison et son relargage. La protéine GroES moins volumineuse que GroEL est constituée uniquement de 7 sous unités. Elle se lie à GroEL et l'aide à fixer puis libérer le polypeptide.

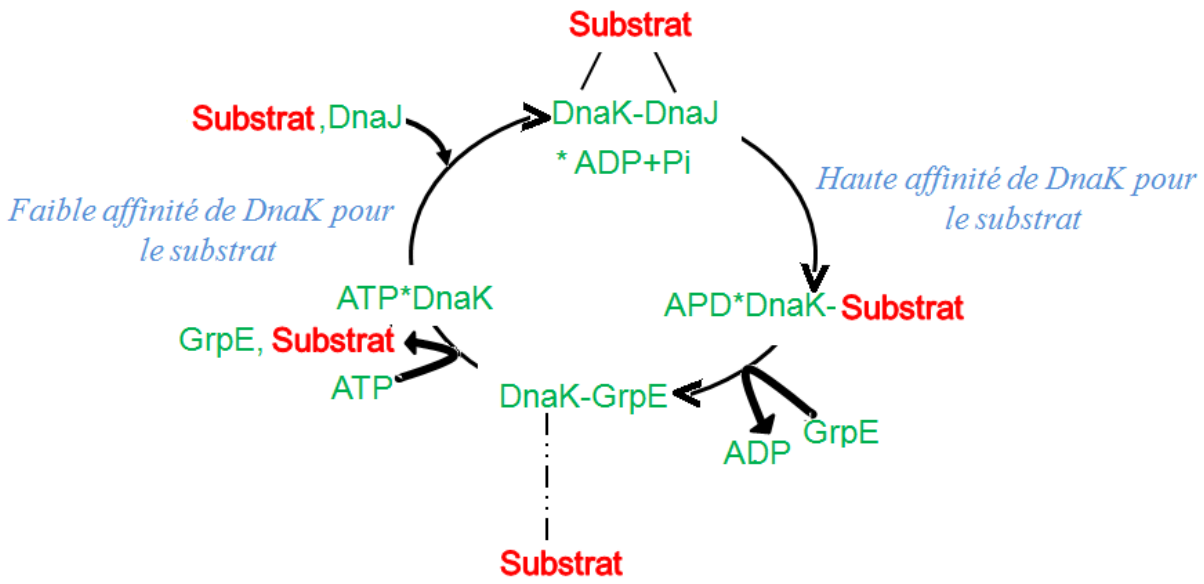


Figure 30 : Processus de repliment du polypeptide naissant. Ce cycle est régulé par deux chaperones DnaJ et GrpE Gelinas *et al.* (2002), (Guyot, 2007).

Lorsque *E. coli* est soumis à une élévation de température de 30 à 42°C, les protéines HSP sont exprimées et un facteur de transcription $ó^{32}$ s'accumule dans la cellule. Le facteur $ó^{32}$ est une sous unité de l'ARN polymerase, il permet d'initier la transcription de gènes sous le contrôle de promoteur du type «heat shock» (Yura *et al.*, 2000). Il régule de façon préférentielle la synthèse des HSP. L'augmentation de la concentration du facteur $ó^{32}$ suite à l'élévation de la température est expliquée par une dénaturation de la structure de l'ARNm. Cette dénaturation favoriserait l'ancrage du ribosome et donc la traduction du facteur $ó^{32}$. Suite à cette élévation de température le temps de vie du facteur $ó^{32}$ est augmenté (Arsène *et*

al., 2000). Le facteur σ^{32} fait aussi l'objet d'une régulation négative via le système Dnak ou via l'activiation d'une métalloprotéase membranaire ATP-dépendante : FtsH (Arsène *et al.*, 2000; Yura and Nakahigashi, 1999).

Par ailleurs chez *Bacillus subtilis,* l'induction des HSP met en jeu un facteur sigma et des régulateurs transcriptionnels HrcA et CtsR (Helmann *et al.*, 2001). Ce mécanisme de régulation est différent de celui des bactéries du genre *Streptomyces*. Ces dernières présentent quatre systèmes de régulation impliqués dans la réponse au stress thermique, tels que HrcA/CIRCE (régulation de l'opéron *groES-groEL1* et du *gène groEL2*), HspR/HAIR (régulation de l'opéron *dnak* et du gène *clpB*), RheA (répresseur transcriptionnel du gène *hsp18* chez *Streptomyces albus*) et PopR (régulation positive de deux des trois paralogues *clpP* chez *Streptomyces coelicolor*) (Bucca *et al.*, 2003; Servant *et al.*, 2000).

IV.B. Les HSP chez *C. glutamicum*

La réponse au stress thermique a été largement décrite chez les bactéries à Gram-négatif puis récemment chez les bactéries à Gram-positif. Les analyses protéomiques de *C. glutamicum* ATCC 13032 mettent en évidence une augmentation du niveau d'expression de plusieurs protéines en réponse à une élévation brutale de température. Ces protéines sont identifiées comme DnaK, GroEL1, GroEL2, ClpB, GrpE et PoxB. PoxB est une enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en acétate, et joue un rôle important dans la production d'acides aminés chez *C. glutamicum* (Barreiro *et al.*, 2004).

Chez *C. glutamicum,* un choc de température modéré (40°C, pendant 60 min) permet l'induction de 358 gènes et la répression de 420 gènes, alors qu'un choc de température sévère (50°C, pendant 10min), permet l'induction de 555 gènes et la répression de 519 gènes (Barreiro *et al.*, 2009). De même, l'expression des protéines HSP selon la sévérité du choc de température a été mis en évidence chez *M. tuberculosis* (Young and Garbe, 1991). Deux répresseurs transcriptionnels HcrA et HspR sont responsables chez *C. glutamicum* (Barreiro *et al.*, 2004) et chez *M. tuberculosis* (Stewart *et al.*, 2002) du contrôle des gènes codant les HSP. Comme dit précédemment, ces deux répresseurs ainsi qu'un troisième répresseur (RheA) régulent également la synthèse des HSP chez *S. albus G* (Grandvalet *et al.*, 1998; Grandvalet *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 2006; Yura and Nakahigashi, 1999) (Figure 31).

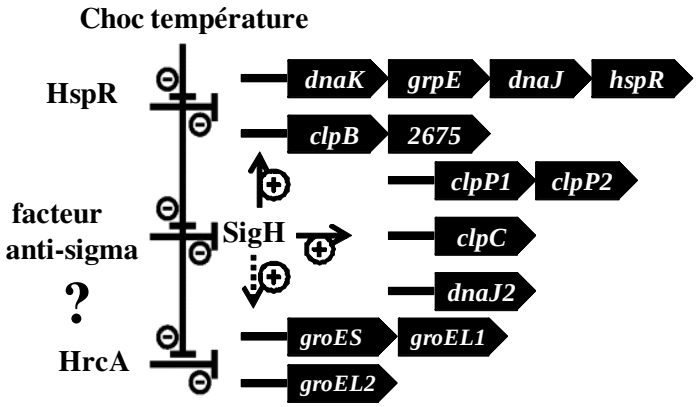


Figure 31 : **modèle de contrôle de l'expression des gènes codant les HSP en réponse a un choc de température**. + et - indique une régulation positive et négative respectivement. Une régulation indirecte de groES-groEL1 et groEL2 par SigH est montrée par la flèche en pointillés. **?**: l'implication du facteur anti-sigma dans la régulation de l'activité SigH n'a pas été encore mis en évidence chez *C. glutamicum*. Ehira *et al.* (2009)

Chez *M. tuberculosis,* SigH joue un rôle central dans la régulation des gènes suite à une réponse au stress de température ou oxydatif (Manganelli *et al.*, 2002; Raman *et al.*, 2001). L'opéron *sigH* chez *Mycobacterium* inclut le gène *sigH* et le gène *rshA* codant l'anti-sigma H (Song *et al.*, 2003). Un arrangement similaire a été décrit dans le génome de *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003) et *Corynebacterium jeikeium* (Tauch *et al.*, 2005). Des études *in vitro* chez *M. tuberculosis* ont mis en évidence une dissociation du complexe SigH-RshA uniquement suite à un choc de température sévère (53-55°C) (Song *et al.*, 2003). Chez *C .glutamicum*, ce régulateur HspR réprime l'expression des gènes *clpB, dnaK, grpE, dnaJ* et *hspR* alors que HrcA réprime l'expression des gènes codant groEL1 et groEL2. Par ailleurs, lors d'un stress de température, l'expression de 18 gènes codant des régulateurs transcriptionnels a été mis en évidence chez *C. glutamicum*. Ces résultats suggèrent que les trois régulateurs SigH, HspR et HrcA ne sont pas les seuls à contrôler l'expression des HSP. Cependant un réseau complexe contrôlant et régulant la réponse à l'élévation soudaine de la température chez *C. glutamicum* semblerait exister. L'activité de SigH est probablement régulée chez *C. glutamicum* par un facteur anti-sigma dans un mécanisme similaire à celui découvert chez *M. tuberculosis* et *S. coelicolor* (Ehira *et al.*, 2009).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Chapitre I : Etude cinétique et métabolique de *C. glutamicum* 2262 et de son variant *C. glutamicum* 2262 NP au cours du procédé discontinu thermo-induit de production de glutamate.

I. Influence de l'amplitude de l'élévation de température sur la physiologie et le métabolisme de *C. glutamicum* 2262

Une étude comparative a été réalisée à différentes amplitudes d'élévation de température afin de comparer les cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production du glutamate par *C. glutamicum* 2262 lors du procédé thermo-induit en mode discontinu. Au cours de cultures réalisées sur un milieu synthétique adapté à la production de glutamate, la température du milieu est soit maintenue à 33°C, soit augmentée à 36°C, 37°C ou 39°C en phase exponentielle de croissance (lorsque la concentration en biomasse atteint 1 $g.l^{-1}$). Le choix de la concentration cellulaire au moment de la variation de température est un paramètre clé, il détermine la concentration en biomasse pendant la phase de production et par conséquent la productivité du procédé. Les objectifs étaient :

1-De mesurer l'effet de l'amplitude de la variation de température sur les cinétiques extracellulaires (consommation de glucose, production de biomasse, de glutamate et lactate) en procédé thermo-induit en mode discontinu.

2-D'étudier les modifications physiologiques accompagnant la production du glutamate suite à la variation de température du milieu de culture.

I.A. Cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production du glutamate

I.A.1. Maintien de la température à 33°C

Dans un premier temps, une culture a été effectuée en maintenant la température du milieu de culture à 33°C.

Au cours de cette culture (Figure 32), la vitesse spécifique de croissance maximale est de 0,54 h^{-1} après 6 heures de culture, celle-ci diminue progressivement jusqu'à devenir nulle en fin de culture. En fin de culture, 20 $g.l^{-1}$ de biomasse ont été obtenus (Figure 32 A). Le glucose, dont la concentration initiale est de 39 $g.l^{-1}$est totalement consommé en fin de culture. La vitesse spécifique de consommation de glucose augmente dans un premier temps jusqu'à 1,1 $g.g^{-1}.h^{-1}$ puis diminue simultanément à la vitesse spécifique de croissance (Figure

32 B). Lors de cette culture sans changement de température, aucun composé autre que le CO_2 n'est produit. Ainsi, le rendement de conversion de glucose en biomasse est de 0,55 $g.g^{-1}$.

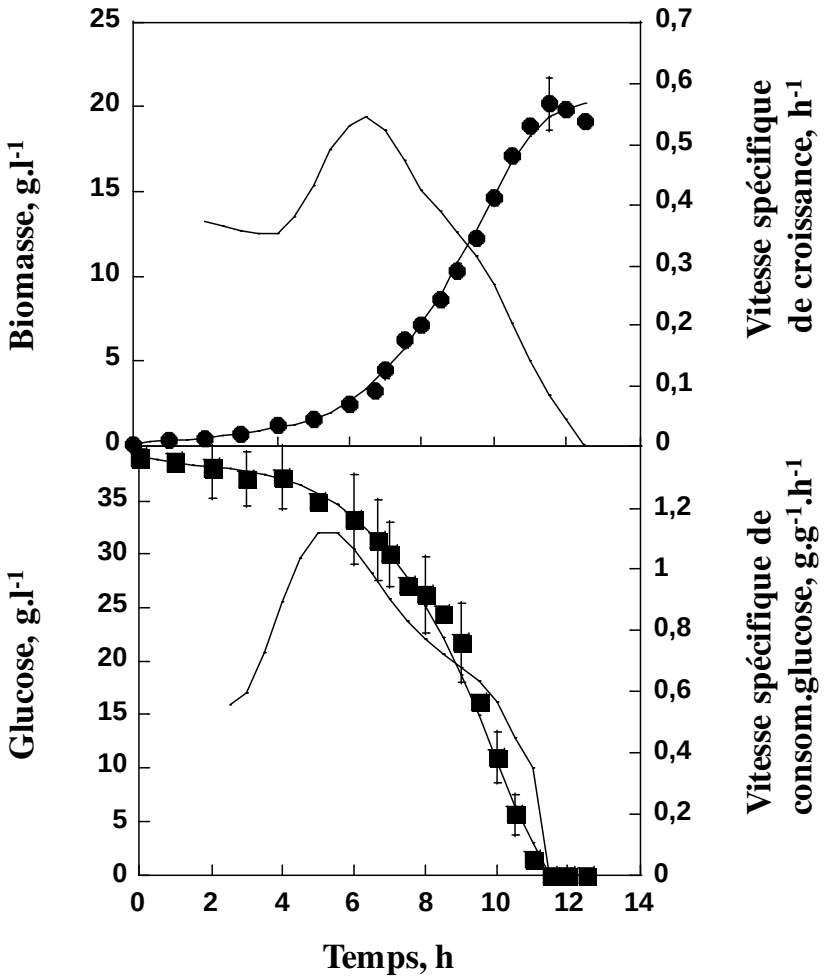


Figure 32 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262 cultivé à 33°C en mode discontinu.
(**A**) Concentration en biomasse ($g.l^{-1}$) (•) et vitesse spécifique de croissance (—) (h^{-1}); (**B**) concentration en glucose ($g.l^{-1}$) (■) et vitesse spécifique de consommation du glucose (—) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) de *C. glutamicum* 2262 cultivée en mode discontinu à 33°C.

I.A.2. Elévation de la température de 33-36°C

Lors du procédé thermique 33-36°C (Figure 33), la vitesse spécifique de croissance atteint une valeur maximale de 0,63 h^{-1}, puis diminue jusqu'à 0,4 h^{-1} en fin de culture (Figure 33 A). Trois heures après l'augmentation de température, la vitesse spécifique maximale de production de glutamate est de 0,05 $g.g^{-1}.h^{-1}$. Cette valeur diminue et s'annule en fin de culture. Les concentrations finales de biomasse et glutamate sont respectivement de 22 $g.l^{-1}$ et

de 0,8 $g.l^{-1}$ (Figure 33 C). Le glucose dont la concentration initiale est de 40 $g.l^{-1}$, est totalement consommé pendant les 8 premières heures de culture (Figure 33 B). La vitesse spécifique de consommation de glucose augmente pour atteindre un maximum de 1,2 $g.g^{-1}.h^{-1}$, puis diminue progressivement jusqu'à 0,62 $g.g^{-1}.h^{-1}$ en fin de culture. Durant cette étude, les rendements de conversion du glucose en biomasse et du glucose en glutamate sont respectivement de 0,53 $g.g^{-1}$ et 0,021 $g.g^{-1}$. Quant au lactate, aucune production n'est observée tout au long de la culture.

Les cinétiques de croissance, de consommation du glucose, mesurées à 33°C et à 33-36°C en mode de culture discontinu semblent similaires. De ce fait, l'augmentation de température de 33 à 36°C n'affecte ni la croissance, ni la consommation du glucose. Par ailleurs la vitesse spécifique d'excrétion du glutamate n'atteint que 0,05 $g.g^{-1}.h^{-1}$ à 36°C. La comparaison du procédé 33°C et 33-36°C laissent supposer que l'élévation de température de 33 à 36°C n'est pas suffisante pour induire des vitesses d'excrétion du glutamate conséquentes avec *C. glutamicum* 2262.

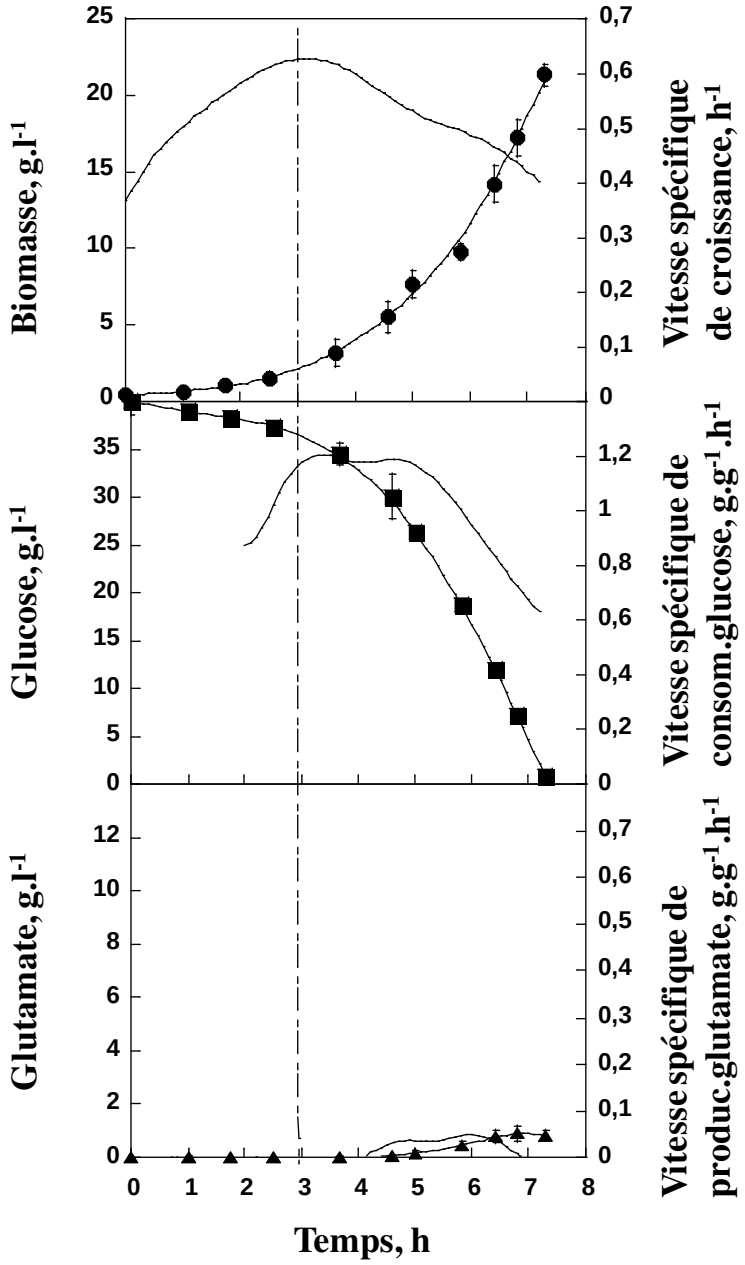


Figure 33 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 36°C). (A) Concentration en biomasse ($g.l^{-1}$) (●) et vitesse spécifique de croissance (——) μ (h^{-1}); **(B)** concentration en glucose ($g.l^{-1}$) (■) et vitesse spécifique de consommation de glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$); **(C)** concentration en glutamate ($g.l^{-1}$) (▲) et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) obtenues avec *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu. La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 3°C (passage de 33 à 36°C).

I.A.3. Elévation de la température de 33 à 37°C

Tout comme lors des cultures précédentes, la vitesse spécifique de croissance augmente rapidement et atteint sa valeur maximale de 0,68 h^{-1} après 3 heures de culture à 33°C (Figure 34 A), elle se maintient à cette valeur pendant une heure à 37°C, puis diminue progressivement jusqu'à 0,4 h^{-1} en fin de culture. Après passage à 37°C, la vitesse spécifique de production du glutamate augmente brusquement et atteint un niveau maximum de 0,47 $g.g^{-1}.h^{-1}$ après 3 heures de culture à 37°C (Figure 34 C); elle diminue par la suite pour atteindre 0,34 $g.g^{-1}.h^{-1}$ en fin de culture. Les concentrations en biomasse et en glutamate obtenues en fin de culture sont respectivement de 14 $g.l^{-1}$ et 7,5 $g.l^{-1}$. La concentration en glucose consommée est de 28 $g.l^{-1}$, la vitesse spécifique maximale de consommation de glucose est de 1,2 $g.g^{-1}$ h^{-1} (Figure 34 B). Celle-ci se maintient à cette valeur pendant 3 heures à 37°C puis diminue progressivement jusqu'à atteindre 0.8 $g.g^{-1}$ h^{-1} en fin de culture. Les rendements de conversion du glucose en biomasse et du glucose en glutamate chez *C. glutamicum* 2262 sont respectivement de 0,52 $g.g^{-1}$ et 0,3 $g.g^{-1}$ en fin de culture. Ce rendement de conversion du glucose en glutamate chez *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu est légèrement plus fort que celui mesuré en mode semi-continu à 37°C (0,2 $g.g^{-1}$) (Delaunay *et al.*, 2002).

Précédement à ces travaux, des cultures continues avaient été réalisées à 37°C, et à des taux de dilution variants entre 0,025 et 0,3 h^{-1}, le glutamate était produit très faiblement (0,2 $g.l^{-1}$ au taux de dilution 0,3 h^{-1} et était négligeable pour les autres taux de dilutions) et aucune production de lactate n'était observée (Uy, 2003).

L'augmentation de température à 37°C a affecté la concentration en biomasse, celle-ci est plus faible comparée à celles obtenues à 33°C ou suite à une élévation de température de 33 à 36°C. Contrairement à cette dernière culture, la concentration en glutamate en fin de culture est nettement plus importante, 7,5 $g.l^{-1}$ contre 0,8 $g.l^{-1}$. Quant à la production de lactate, celle-ci est négligeable. Le rendement de conversion du glucose en glutamate a été amélioré d'un facteur 14 entre 36 et 37°C. Il apparaît donc qu'un seul degré celsius de différence est suffisant pour permettre une augmentation conséquente de la production du glutamate par *C. glutamicum* 2262.

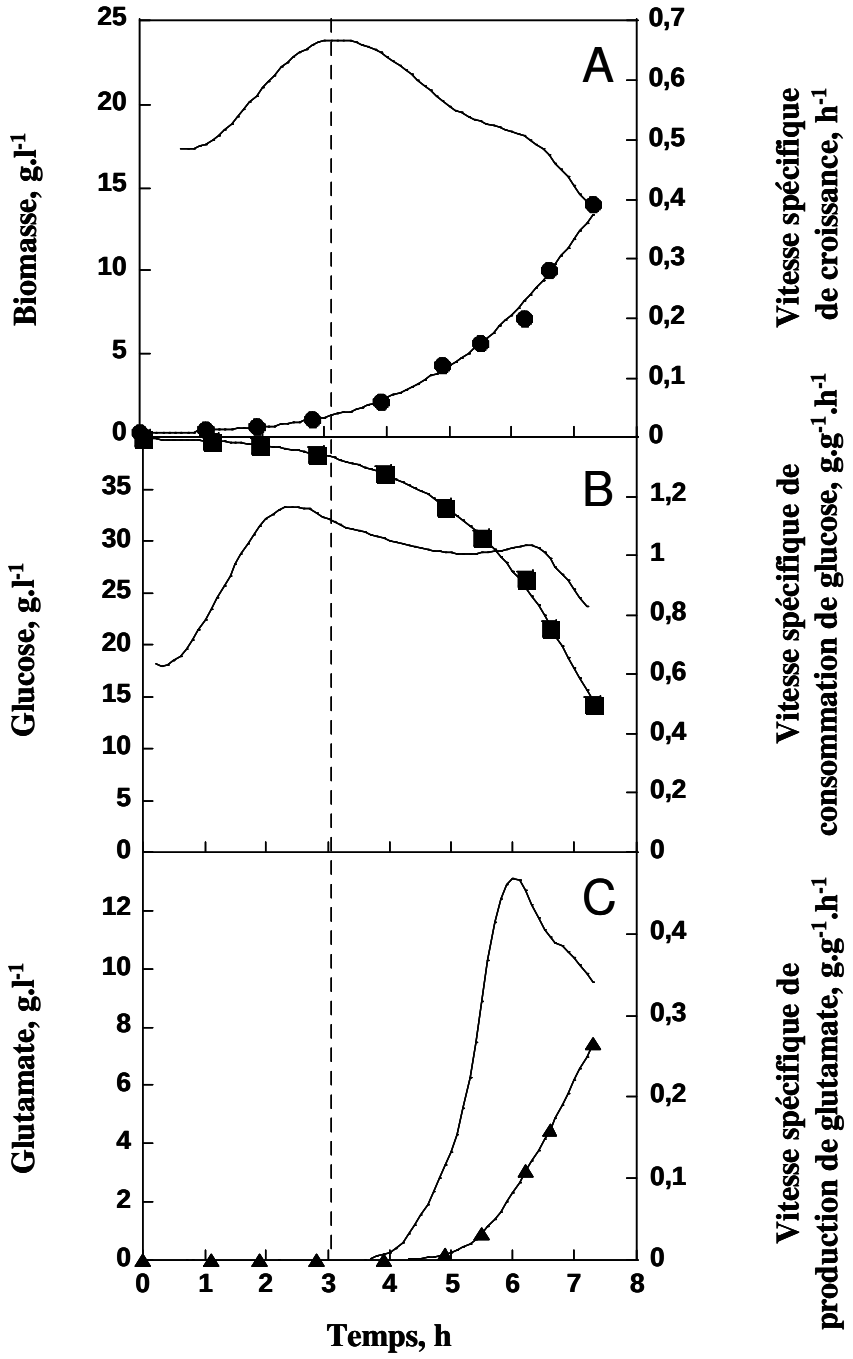


Figure 34 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 37°C).
(A) Concentration en biomasse ($g.l^{-1}$) **(●)** et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}) **(B)** concentration en glucose ($g.l^{-1}$) **(■)** et de vitesse spécifique de consommation de glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$); **(C)** concentration en glutamate ($g.l^{-1}$) **(▲)** et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) obtenues avec *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu. La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 4°C (passage de 33 à 37°C).

I.A.4. Elévation de la température de 33 à 39°C

Selon des travaux précédents réalisés en mode semi–continu, le procédé thermique à 39°C semble le plus performant en termes de rendement de conversion du glucose en glutamate (Delaunay *et al*., 2002). Afin de caractériser l'effet de l'élévation de température de 6°C en mode discontinu chez *C. glutamicum* 2262, le suivi des cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production du glutamate a été réalisé (Figure 35). La vitesse spécifique maximale de croissance est de 0,62 h^{-1} après 2 heures de culture à 33°C, puis l'élévation de température à 39°C provoque un arrêt quasi-instantané de la croissance (Figure 35 A). De ce fait, la vitesse spécifique de croissance diminue et atteint 0,05 h^{-1}. La vitesse spécifique maximale de production du glutamate est obtenue après 3 heures de culture à 39°C pour atteindre 0,5 $g.g^{-1}.h^{-1}$ (Figure 35 C). Les concentrations maximales en biomasse et en glutamate sont respectivement de 8 $g.l^{-1}$ et 16 $g.l^{-1}$. Avec une concentration initiale en glucose de 35 $g.l^{-1}$, la totalité du glucose est consommée au bout de 12 heures de culture (Figure 35 B). La vitesse spécifique de consommation du glucose augmente simultanément avec la vitesse spécifique de croissance et se maintient à sa valeur maximale de 1,1 $g.g^{-1}.h^{-1}$ pendant 3 heures à 39°C, puis diminue progressivement jusqu'à 0,8 $g.g^{-1}.h^{-1}$. Les rendements de conversion de glucose en biomasse et de glucose en glutamate sont respectivement de 0,3 $g.g^{-1}$ et 0,45 $g.g^{-1}$.

A 33°C, le flux carboné est réservé à la croissance, puis l'induction à 39°C provoque une déviation du flux vers la production du glutamate au détriment de la croissance. Les études menées au sein de notre laboratoire avaient déjà rapporté cette répartition du flux carboné lors d'une fermentation glutamique avec l'élévation de température de 33 à 39°C avec le glucose comme source de carbone. 13% du flux carboné est utilisé pour la biomasse, 25% pour la production de CO_2, 45% pour la production de glutamate et enfin le pourcentage restant est partagé entre les acides organiques, le lactate et le tréhalose (Delaunay *et al.*, 1999b). Par ailleurs les travaux de Gourdon (1999) rapportent une faible accumulation de tréhalose, de lactate et de dihydroxyacétone dans le milieu lors d'une culture en mode semi-continu. Il est peu probable que l'apparition de ces métabolites soit due à une limitation en oxygène puisque la pression partielle en oxygène est toujours maintenue à une valeur supérieure à 20%. L'apparition de ces métabolites est plutôt attribuée à l'arrêt de croissance (Gourdon, 1999).

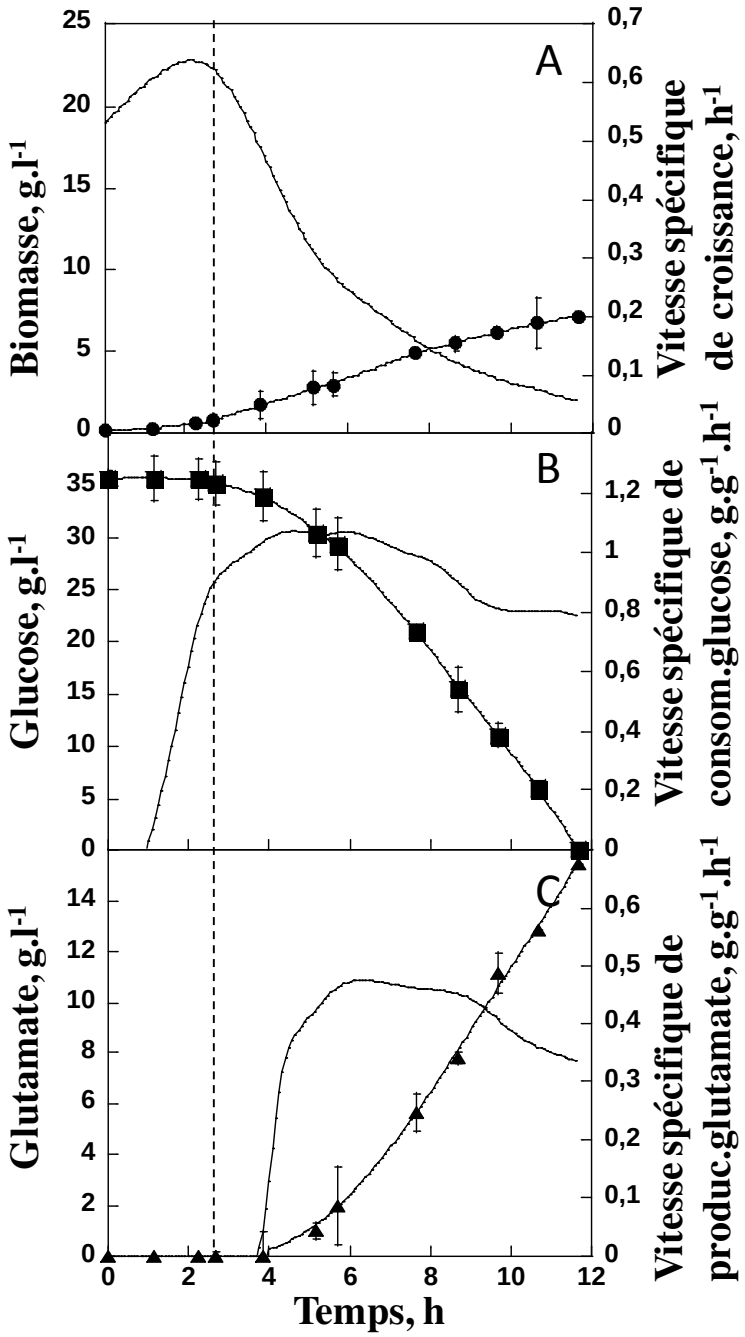


Figure 35 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 39°C). (A) Concentration en biomasse ($g.l^{-1}$) **(●)** et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}); **(B)** concentration en glucose ($g.l^{-1}$) **(■)** et de vitesse spécifique de consommation de glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$)**; (C)** concentration en glutamate ($g.l^{-1}$) **(▲)** et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) obtenues avec *C. glutamicum* 2262 cultivé en mode discontinu. La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 6°C (passage de 33 à 39°C).

A l'issue des différentes cultures qui ont été menées, il apparait que plus l'élévation de température (36°C, 37°C et 39°C) est importante, plus la concentration finale en biomasse est affectée. Nous avons observé que les vitesses spécifiques maximales de croissance et de consommation de glucose avant induction à 36°C, 37°C et 39°C étaient similaires à celles obtenues lorsque la température de culture était maintenue à 33°C. Parmi les différentes amplitudes de température appliquées à *C. glutamicum* 2262, c'est suite au passage à 39°C que la croissance est la plus affectée et que le titre le plus important en glutamate est obtenu. C'est également suite à ce changement de température que le rendement de conversion du glucose en glutamate est le plus élevé. De même, la montée de température de 33 à 39°C provoque une excrétion du glutamate en mode continu et semi-continu (Delaunay *et al.*, 1999b; Uy, 2003). Dans les mêmes conditions de culture, la vitesse spécifique d'excrétion augmente beaucoup plus rapidement en mode semi-continu (0,55 $g.g^{-1}.h^{-1}$ contre 0,3 $g.g^{-1}.h^{-1}$ pour le mode continu) où les cellules sont exposées à une concentration plus élevée en glucose qu'en culture continue.

Les fermentations en mode semi-continu et discontinu montrent des similitudes au niveau de l'excrétion du glutamate dans le milieu, et des divergences au niveau du lactate. Ce dernier est présent en mode semi-continu et absent en mode discontinu. En revanche les vitesses spécifiques de production du glutamate et de rendement de conversion du glucose en glutamate sont plus faibles en culture continue du fait d'une concentration en glucose fortement limitante. De plus, en mode continu, le glutamate dans le milieu extérieur est soutiré en continu, de ce fait la phase de production du glutamate est prolongée. En effet, les travaux de Lapujade ont mis en évidence le rôle déterminant du glutamate extracellulaire sur l'arrêt de la production de glutamate en cultures discontinues (Lapujade, 2000; Lapujade *et al.*, 1999).

Par ailleurs, une étude basée sur l'effet de différentes amplitudes de température (33°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C ou 41°C) sur la production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 au cours du procédé thermo-induit en mode semi-continu, a révélé une diminution de la production de biomasse proportionnelle à l'augmentation de température. Nous aurions pu continuer à augmenter la température de culture, afin de vérifier si cette amélioration graduelle de la production du glutamate en fonction de l'élévation de la température continuait. Cependant, des études précédentes rapportent qu'une élévation de température de 33°C à 41°C du milieu de culture chez *C. glutamicum* 2262 induit une diminution de tous les paramètres mesurés exceptée la production du lactate qui augmente. A une telle température, le métabolisme de *C. glutamicum* 2262 est très rapidement bloqué ce qui se traduit par un arrêt rapide de

croissance, et une utilisation du glucose vers la production de lactate (Delaunay *et al.*, 2002).

Une élévation de température de 33 à 41°C aurait donc eu peu d'intérêt pour notre travail dont un des objectifs est de déterminer les modifications physiologiques induites par la variation de température du milieu et qui aboutissent à l'excrétion du glutamate par *C. glutamicum* 2262. Il est bien connu que l'induction de la production de glutamate engendre des modifications importantes au niveau du métabolisme central avec notamment des modifications de certaines activités enzymatiques. Parmi celles-ci, deux activités enzymatiques, la PDH, intermédiaire entre la glycolyse et le cycle de Krebs, et l'ODH, du cycle Krebs, jouent un rôle essentiel pour la production de glutamate par *C. glutamicum.* L'ODH est la plus étudiée en raison de son rôle dans la réorientation du flux de carbone vers la synthèse du glutamate. Cette activité est due à un complexe enzymatique constitué de 3 sous-unités. Une de ces sous-unités est commune à un autre complexe enzymatique, la PDH. Selon Uy (Uy, 2003), chez *C. glutamicum* 2262, l'élévation de la température du milieu de culture en mode continu provoque une forte baisse de l'activité ODH et une diminution de l'activité PDH ce qui a pour conséquence de diriger le flux de carbone vers la synthèse du glutamate. Afin de préciser le lien entre la modification de ces deux activités enzymatiques clés et l'excrétion du glutamate au cours du procédé thermo-induit en mode discontinu, nous avons mesuré les variations de ces deux activités enzymatiques aux différents gradients de températures dont les cinétiques de croissance et de production du glutamate ont été présentées précédemment. Ces résultats ont par la suite été comparés à ceux déjà obtenus par Uy chez *C. glutamicum* 2262 mais en mode continu (Uy, 2003).

I.B. Activités enzymatiques ODH et PDH

I.B.1. Maintien de la température à 33°C

Afin de caractériser le métabolisme pendant la phase de croissance et en absence de production du glutamate, le suivi des activités enzymatiques des complexes ODH et PDH chez *C. glutamicum* 2262, à 33°C a été réalisé. Les activités enzymatiques ODH et PDH ont été mesurées en début de la phase exponentielle (lorsque la biomasse atteint 1 $g.l^{-1}$), 1 heure et 3 heures après que la concentration en biomasse ait atteint 1 $g.l^{-1}$.

Tableau 1 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) de *C. glutamicum* 2262. **E1** (prélèvement en début de phase exponentielle (1g.l^{-1}de biomasse), **E2** et **E3** (prélèvements à 1 heure et 3 heures après avoir atteint 1g.l^{-1}). Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH (nmol.min^{-1}mg^{-1})	PDH (nmol.min^{-1}mg^{-1})
E1	**33**	**2,6 ± 0,9**	**10,5 ± 0,3**
E2	**33**	**3,1 ± 0,5**	**13,0 ± 0,2**
E3	**33**	**4,0 ± 0,3**	**21,0 ± 0,4**

Les deux activités ODH et PDH augmentent progressivement tout au long de la culture de 2,6 à 4 et de 10,5 à 21 nmol.min^{-1}mg^{-1} respectivement pour l'ODH et la PDH (Tableau 1). Ces résultats sont similaires à ceux observés en cultures continues à 33°C (Uy, 2003).

I.B.2. Elévation de température de 33 à 36°C

Le suivi des activités enzymatiques a été effectué au cours de la fermentation glutamique avec une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 36°C. Le prélèvement à 33°C a été effectué à une concentration cellulaire d'environ 1 g.l^{-1}. A 33°C, l'activité PDH est de 12,5 nmol.min^{-1}.mg^{-1}, alors que l'activité ODH est encore plus faible, de 2,6 nmol.min^{-1}.mg^{-1} (Tableau 2). Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus lors de la culture avec maintient de la température à 33°C. Lorsque la température de la culture est élevée à 36°C, les 2 enzymes ODH et PDH se maintiennent à 3 et 10 nmol.min^{-1}.mg^{-1} respectivement.

Tableau 2 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) de *C. glutamicum* 2262. E1 (prélèvement avant le choc thermique), **E2** et **E3** (prélèvements à 1heure et 3 heures après le choc thermique). Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH (nmol.min^{-1}mg^{-1})	PDH (nmol.min^{-1}mg^{-1})
E1	**33**	**2,6 ± 0,5**	**12,5 ± 4,0**
E2	**36**	**2,1 ± 0,0**	**10,5 ± 2,3**
E3	**36**	**3,3 ± 1,1**	**10,4 ± 0,6**

Les deux activités enzymatiques mesurées lors de cette culture présentent un profil similaire avec celui mesuré lors de la culture avec maintien de la température à 33°C. Nous avons pu observer dans les deux cas une absence de variation significative de ces deux activités. En absence de variation de température, ou lorsque la variation de température est

de 3°C, pas ou peu de glutamate est excrété. Les profils d'activités enzymatiques mesurées apparaissent donc logiques en raison du lien entre l'excrétion du glutamate et l'évolution de ces deux enzymes, notamment l'ODH.

I.B.3. Elévation de la température de 33 à 37°C

Les activités spécifiques de la PDH et de l'ODH présentent un niveau de 3 et 13 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ respectivement pendant la culture à 33°C. Puis après le choc thermique à 37°C, les deux activités sont diminuées (Tableau 3) contrairement au choc thermique à 36°C ou les deux activités étaient maintenues constantes tout au long de la culture. Les deux activités diminuent légèrement après 1 heure à 37°C, puis la diminution est plus importante après 3 heures à 37°C. L'activité PDH diminue mais reste présente (9,6 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$) alors que l'activité ODH devient indétectable.

Tableau 3 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH ($nmol.min^{-1}.mg^{-1}$) de *C. glutamicum* 2262. **E1** (prélèvement avant le choc thermique), **E2** et **E3** (prélèvements à1 heure et 3 heures après le choc thermique). ND: non détectable. Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)	PDH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)
E1	**33**	**3,1 ± 0,4**	**13 ± 0,5**
E2	**37**	**2,6 ± 0,0**	**12,6 ± 1,8**
E3	**37**	**ND**	**9,6 ± 2,7**

Les activités spécifiques ODH et PDH présentent un profil différent de ceux des deux procédés (33°C et 33-36°C) présentés précédemment. L'absence totale de l'activité ODH coïncide avec la vitesse spécifique maximale de production du glutamate.

Cette très forte réduction de l'activité ODH, mesurée durant la phase de production du procédé thermo-induit a également été observée pour les procédés de production de glutamate induit par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif ou un ajout de pénicilline (Kawahara *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999). En culture continue, le profil cinétique de la culture réalisée à 37°C est similaire à celui effectué à 33°C. De ce fait, les activités enzymatiques ont été uniquement caractérisées à 33°C, et les résultats ont montré une activité PDH comprise entre 10 et 12 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ quel que soit le taux de dilution. Quant à l'activité ODH, elle est également présente entre 3 et 4 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ selon le taux de dilution (Uy, 2003). Ces résultats sont encore une fois en corrélation avec l'excrétion du glutamate qui est très faiblement présente à 37°C au taux de dilutions de 0,3 h^{-1} et négligeable aux autres taux de dilution.

I.B.4. Elévation de la température de 33 à 39°C

Le procédé thermique à 39°C, se caractérise au niveau métabolique par une diminution de l'activité des deux enzymes. L'activité ODH diminue très fortement après seulement une heure à 39°C et devient indétectable après 3 heures à 39°C. Quant à l'activité PDH, elle est réduite de 47% après une heure à 39°C et de 63% après 3 heures de culture à 39°C.

Tableau 4 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) de *C. glutamicum* 2262. **E1** (prélèvement avant le choc thermique), **E2** et **E3** (1 h et 3 h après le choc thermique). ND: non détectable. Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH (nmol.min^{-1}mg^{-1})	PDH (nmol.min^{-1}mg^{-1})
E1	**33**	**4 ± 1,4**	**19,0 ± 2,5**
E2	**39**	**0,3 ± 0,7**	**10,0 ± 1,7**
E3	**39**	**ND**	**7,0 ± 1,0**

Au niveau métabolique, les activités enzymatiques clés ODH et PDH sont diminuées lors du passage de 33 à 37 ou 39°C, alors que pour les cultures à 33°C et 33-36°C, elles étaient maintenues. Nous avons donc pu confirmer qu'une excrétion significative du glutamate nécessite la diminution des activités enzymatiques ODH et PDH comme déjà décrit en culture continue et discontinue en procédé thermo-induit chez *C. glutamicum* 2262 (Uy, 2003) ou dans la littérature avec d'autres types d'induction pour l'activité ODH (Kawahara *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999). Récemment, Hasegawa *et al* (2008) rapportent une diminution des deux activités ODH et PDH sous différentes conditions d'induction telles que l'ajout de pénicilline ou de Twen 40 et sous limitation biotine, et ceci de manière similaire à celle obtenue au cours du procédé thermo-induit de production du glutamate (Hasegawa *et al.*, 2008). Si la diminution de l'activité ODH lors de la phase de production est largement rapportée dans la littérature, celle de l'activité PDH est très peu discutée. La diminution de l'activité PDH est indépendante de la vitesse spécifique de croissance puisqu'aucune diminution significative n'est observée lorsque celle-ci diminue en fin de croissance à 33°C. Cette diminution peut être responsable d'une limitation de la synthèse d'acétyl-CoA nécessaire à l'élaboration des acides gras. De ce fait, elle pourrait être impliquée dans les changements de la composition de la membrane plasmique observés lors du procédé thermo-induit de production du glutamate (Gourdon, 1999).

Quelle que soit l'élévation de température imposée au milieu de culture (36°C, 37°C ou 39°C), les études cinétiques et métaboliques semblent être en parfaite corrélation. En effet jusqu'à 36°C la synthèse de biomasse est importante et la production de glutamate reste

faible. Ce n'est qu'à partir de 37°C qu'une forte diminution de la synthèse de biomasse et une forte production de glutamate est observée. Ceci se retrouve au niveau des variations de l'activité ODH. La diminution de l'activité ODH est plus rapide après l'induction à 39°C. En effet, la diminution est observée dès la première heure à 39°C, alors qu'elle n'est observée qu'après 3 heures à 37°C. Ces résultats sont en accord avec les études cinétiques présentées précédemment montrant une chute brutale de la vitesse spécifique de croissance après induction à 39°C, alors que cette diminution est moins brutale après l'induction à 37°C.
Une analyse du protéome a également été effectuée au cours des différentes cultures réalisées. L'outil utilisé pour cette caractérisation est l'électrophorèse bidimensionnelle de protéines. Des études antérieures du génome de *C. glutamicum* ATCC 13032 avait permis d'établir que *C. glutamicum* ATCC 13032 et *C. glutamicum* 2262 étaient presque identiques (similitude supérieure à 95%) (Stansen *et al.*, 2005). De ce fait, l'identification de ces protéines a pu être réalisée par comparaison des cartes protéomiques que nous avons obtenues avec *C. glutamicum* 2262 et celles, déjà publiées, de *C. glutamicum* ATCC 13032 (Barreiro *et al.*, 2009; Hermann *et al.*, 2001).

I.C. Expression des protéines de stress

Il est connu que des variations de la température du milieu de culture et donc l'application d'un stress thermique induisent la surexpression de protéines de stress (HSP). Cette réponse au choc température est retrouvée chez tous les organismes étudiés à ce jour (Winter and Jakob, 2004). Par exemple chez *E. coli*, un choc thermique de 30°C à 42°C induit la surexpression maximale d'une vingtaine de HSP en 5 minutes (Yura *et al.*, 1993). Afin de vérifier si ce type de protéines était surexprimé chez *C. glutamicum* 2262 soumis à des variations de température permettant la production du glutamate, nous avons caractérisé le profil protéomique avant et après induction à 36°C, 37°C ou 39°C. Les échantillons analysés ont été prélevés avant et 3 heures après induction quelle que soit la température appliquée (Figure 36).

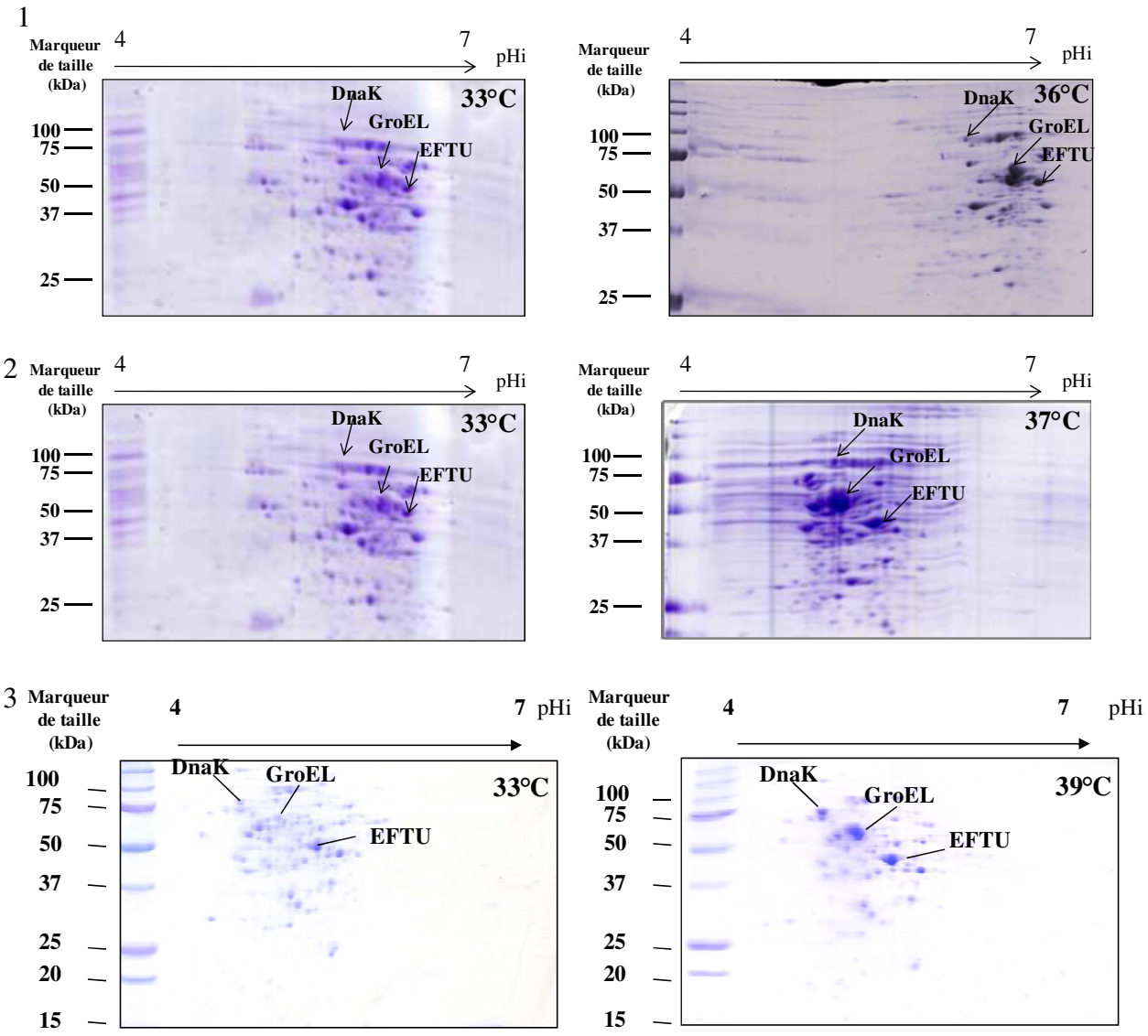


Figure 36 : Analyse comparative en gel d'électrophorèse 2D du protéome de *C. glutamicum* 2262 suite à un choc thermique
(1) Avant (33°C) et après un choc thermique (36°C), **(2)** avant (33°C) et après un choc thermique (37°C), **(3)** avant (33°C) et après un choc thermique (39°C).

Par comparaison des cartes protéomiques réalisées avant et après élévation de température, une différence d'intensité de certains spots peut être visualisée. Cette augmentation d'intensité traduit une surexpression des protéines observées. Ainsi, 3 protéines apparaissent comme étant surexprimées, il s'agit de DnaK, GroEL et EFTU. Il est rapporté dans la littérature que les deux protéines DnaK et GroEL sont essentiellement des protéines chaperonnes et la protéine EFTU est un facteur d'élongation Tu, essentiel à la synthèse protéique (Bendt *et al.*, 2003). Le niveau d'expression des protéines DnaK, GroEL et EFTU est augmenté après induction à 37°C et 39°C (Figure 36.2 et 36.3) alors que seule la protéine GroEL est surexprimée parmi les trois après l'élévation de température à 36°C (Figure 36.1).

De ce fait, le profil protéomique à 36°C est différent de celui obtenu à 37°C ou 39°C. Nos résultats mettent en évidence qu'une élévation de température de 3°C, n'est pas suffisante pour induire l'expression de DnaK et GroEL. D'après des données bibliographiques, diverses études ont permis de distinguer des HSP surexprimées sous élévation modérée de température (40°C), et d'autres surexprimées sous une élévation sévère de température (50°C) (Barreiro *et al.*, 2009). Dans notre étude, le choc thermique de 36°C n'est donc pas suffisant pour permettre la surexpression de DnaK et EFTU. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'à 36°C, nous avons observé le maintien des activités ODH et PDH et une faible excrétion du glutamate. En revanche un choc thermique de 33°C à 37°C ou de 33°C à 39°C induit la surexpression des trois protéines HSP, une diminution des deux activités enzymatiques (ODH et PDH) et dans ce cas, l'excrétion du glutamate.

La seule surexpression de la protéine GroEL à 36°C pourait reflèter un faible ressenti du stress thermique par *C. glutamicum* 2262. Ce ressenti n'étant pas suffisant, il n'y aurait pas déclenchement de l'excrétion du glutamate. La surexpression des 3 HSP pourrait être la conséquence d'un ressenti plus important du stress thermique par *C. glutamicum* 2262.

Afin d'approfondir ce lien entre la surexpression de HSP, le profil métabolique et l'excrétion du glutamate, le chapitre suivant est consacré à la caractérisation d'un variant, *C. glutamicum* 2262 NP. Ce variant a été isolé au cours d'un procédé continu de production du glutamate avec la souche de référence (Uy, 2003). La caractéristique qui définit ce mutant est qu'il est incapable de produire le glutamate lorsqu'il est soumis à des conditions de culture similaires à celles de *C. glutamicum* 2262. Par ailleurs, des études précédentes au sein du laboratoire ont montré que ce variant était capable de récupérer sa capacité à produire du glutamate lorsque l'amplitude de culture appliquée était plus élevée, de 33 à 41°C. Néanmoins la concentration de glutamate produite reste faible, comparée à celle de *C. glutamicum* 2262 (Uy, 2003).

II. Influence de l'amplitude de l'élévation de température sur la physiologie et le métabolisme de *C. glutamicum* 2262 NP

Comme précédemment avec *C. glutamicum* 2262, un suivi cinétique de la croissance, de la consommation de glucose, de la production de glutamate, des activités PDH et ODH ainsi que du protéome a été réalisé. En raison de l'incapacité du variant *C. glutamicum* 2262 NP à produire du glutamate suite à une variation de température du milieu de culture de 33 à 39°C, des amplitudes différentes ont été appliquées. Après un début de culture à 33°C, la température a été portée à 39, 41, 43 ou 45°C. Une culture sans variation de température à également été réalisée.

II.A. Cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 NP

II.A.1. Maintien de la température à 33°C

Au cours de cette culture, la vitesse spécifique de croissance atteint un maximum de 0,68 h^{-1} puis diminue progressivement et s'annule en fin de culture (Figure 37 A). La concentration en biomasse atteint un maximum de 20 $g.l^{-1}$ puis diminue pour se stabiliser à 14 $g.l^{-1}$ en fin de culture. Le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,66 $g.g^{-1}$. La vitesse spécifique de croissance et le rendement de conversion de glucose en biomasse sont légèrement plus élevés que chez *C. glutamicum* 2262 à 33°C. La concentration initiale de glucose est de 30 $g.l^{-1}$. Celui-ci est totalement consommé après 10 heures de culture. La vitesse spécifique de consommation du glucose atteint un maximum de 0,8 $g.g^{-1}.h^{-1}$ puis diminue progressivement jusqu'à devenir nulle en fin de culture (Figure 37 B). A 33°C aucune production de glutamate, ni de lactate n'a été détectée pendant la fermentation, tout le flux carbone est donc acheminé vers la production de biomasse et la production de CO_2.

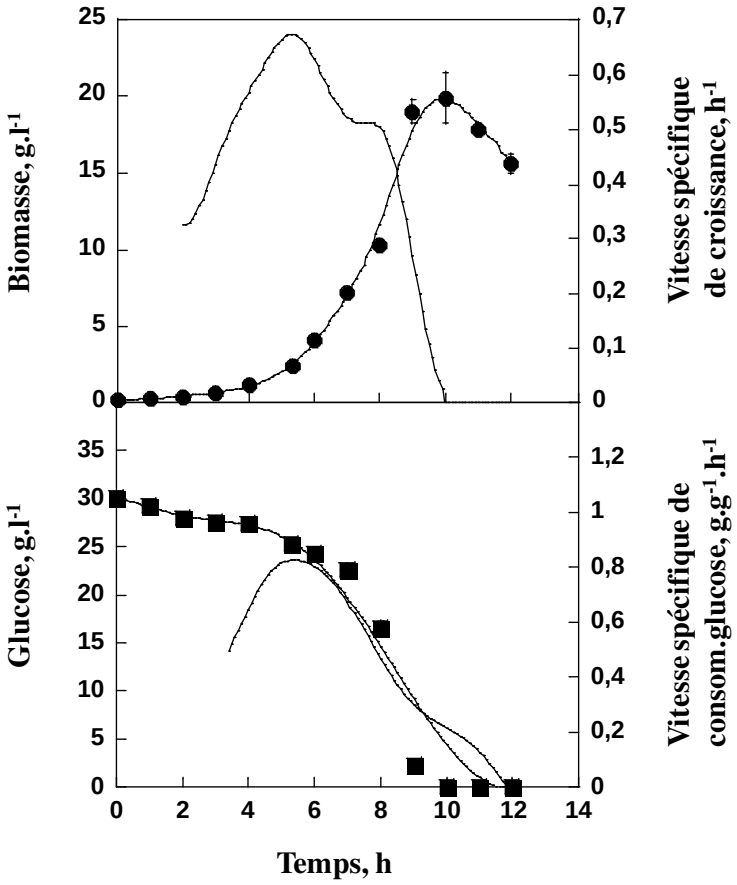


Figure 37 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262 NP cultivé en mode discontinu à 33°C.
(**A**) Concentration en biomasse (g. l^{-1}) (•) et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}); (**B**) Concentration en glucose (g. l^{-1}) (■) et vitesse spécifique de consommation du glucose (——) (g. $g^{-1}.h^{-1}$)

II.A.2. Elévation de la température de 33 à 39°C

La vitesse spécifique de croissance maximale (0,68 h^{-1}) est mesurée avant l'induction (Figure 38 A). Aucune excrétion du glutamate n'est observée. A 39°C, *C. glutamicum* 2262 NP présente une croissance non affectée par l'élévation de la température. Soumis aux mêmes conditions de culture, la concentration finale en biomasse atteint 25 $g.l^{-1}$ contre 8 $g.l^{-1}$ pour *C. glutamicum* 2262. La vitesse spécifique de croissance diminue progressivement jusqu'à 0,3 h^{-1} en fin de culture. Celle-ci reste légèrement plus forte que celle de *C. glutamicum* 2262. Le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,6 $g.g^{-1}$. Le glucose dont la concentration initiale est de 42 $g.l^{-1}$, est consommé progressivement au cours du temps, puis au bout de 9 heures de culture, celui-ci est totalement consommé (Figure 38 B). A 33°C, la vitesse spécifique de consommation de glucose augmente progressivement et se maintient au

maximum de sa valeur (0,8 $g.g^{-1}.h^{-1}$) après induction à 39°C. L'augmentation de la température n'a donc aucun effet sur la vitesse spécifique de consommation de glucose. Elle diminue progressivement au bout de 5 heures de culture à 39°C, pour atteindre 0,4 $g.g^{-1}.h^{-1}$ en fin de culture.

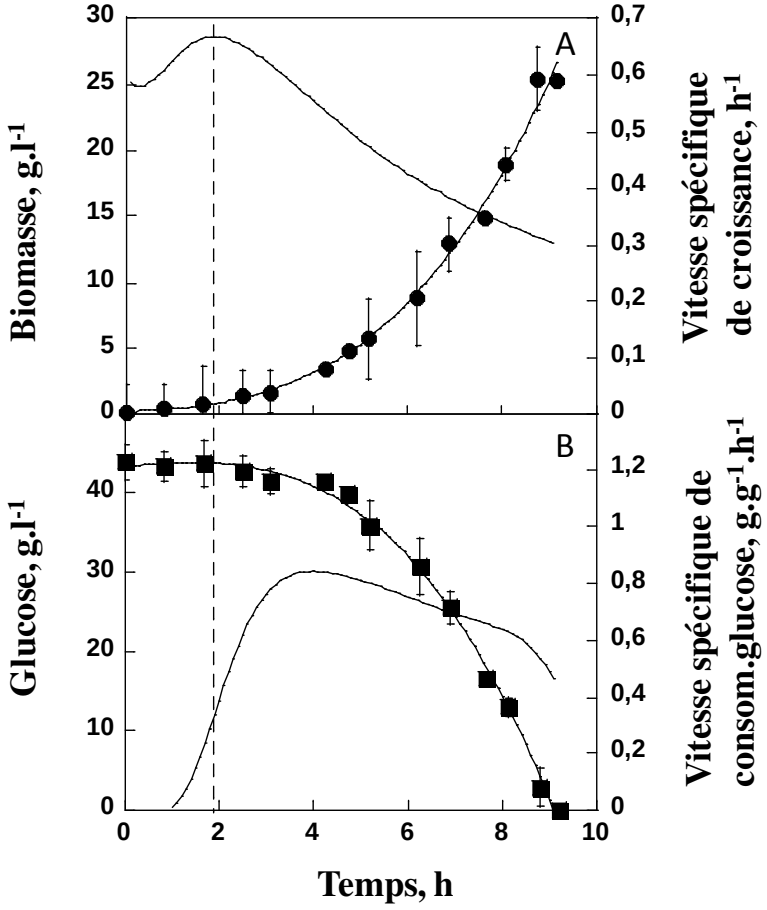


Figure 38 : Cinétique de *C. glutamicum* 2262NP cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 39°C).
(**A**) Concentration en biomasse ($g.l^{-1}$) (●) et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}); (**B**) concentration en glucose ($g.l^{-1}$) (■) et vitesse spécifique de consommation du glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 6°C (passage de 33 à 39°C).

L'analyse cinétique de *C. glutamium* 2262 et de son variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP montre des différences aux mêmes variations de température (33°C et 33-39°C). A 33°C, la vitesse de croissance et le rendement de conversion du glucose en biomasse sont plus élevés chez le variant non producteur. L'élévation de la température à 39°C chez *C. glutamium* 2262 provoque un arrêt quasi-instantané de la croissance et la majorité du flux carboné est alors acheminée vers la production du glutamate. En revanche,

l'élévation de la température à 39°C chez le variant non producteur n'affecte pas la croissance, tout le flux carbone étant acheminé vers la croissance cellulaire et la production de CO_2 et aucune excrétion du glutamate n'est observée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Uy lorsque ce variant a été cultivé en mode continu (Uy, 2003).
La variation de température de 33 à 39°C n'affectant pas la croissance chez le variant, et ne permettant pas une production du glutamate, d'autres variations de température ont été testées afin de vérifier la sensibilité de ce variant à des amplitudes de température plus importantes comme cela a été montré par Uy (2003) en mode continu.

II.A.3. Elévation de température de 33 à 41°C

La vitesse spécifique de croissance est maximale à 33°C (0,65 h^{-1}) puis diminue progressivement à 41°C et pour atteindre 0,05 h^{-1} en fin de culture (Figure 39 A). La concentration en biomasse maximale obtenue est de 11 $g.l^{-1}$. La variation de température de 8°C, a affecté la vitesse spécifique de croissance puisque celle-ci diminue immédiatement après le changement de température. Le rendement de conversion du glucose en biomasse est faible et atteint 0,34 $g.g^{-1}$. Ce rendement de conversion est similaire à celui de la souche *C. glutamicum* 2262 lorsque la température est augmentée de 33 à 39°C. Le glucose, dont la concentration initiale est de 31 $g.l^{-1}$, est totalement consommé au bout de 12 heures de culture. La vitesse spécifique de consommation de glucose atteint 0,6 $g.g^{-1}.h^{-1}$, se maintient quelques heures à cette valeur maximale à 41°C, puis diminue en fin de culture à 0,4 $g.g^{-1}.h^{-1}$ (Figure 39 B). Celle-ci est plus faible que lors de la culture effectuée à 33°C-39°C avec ce variant non producteur. Contrairement à l'élévation de la température de 33 à 39°C chez le variant non producteur où aucune production de glutamate ni de lactate n'est observée, de faibles quantités de glutamate (Figure 39 C) et de lactate sont produites à 41°C. Les concentrations finales sont respectivement de 1,3 $g.l^{-1}$ et de 2 $g.l^{-1}$ pour le glutamate et le lactate. Par ailleurs la vitesse spécifique de production du glutamate augmente lentement après 3 heures à 41°C, atteint un maximum de 0,08 $g.g^{-1}.h^{-1}$puis diminue rapidement. Quand au lactate, la vitesse spécifique maximale de production est de l'ordre de 0,06 $g.g^{-1}.h^{-1}$.

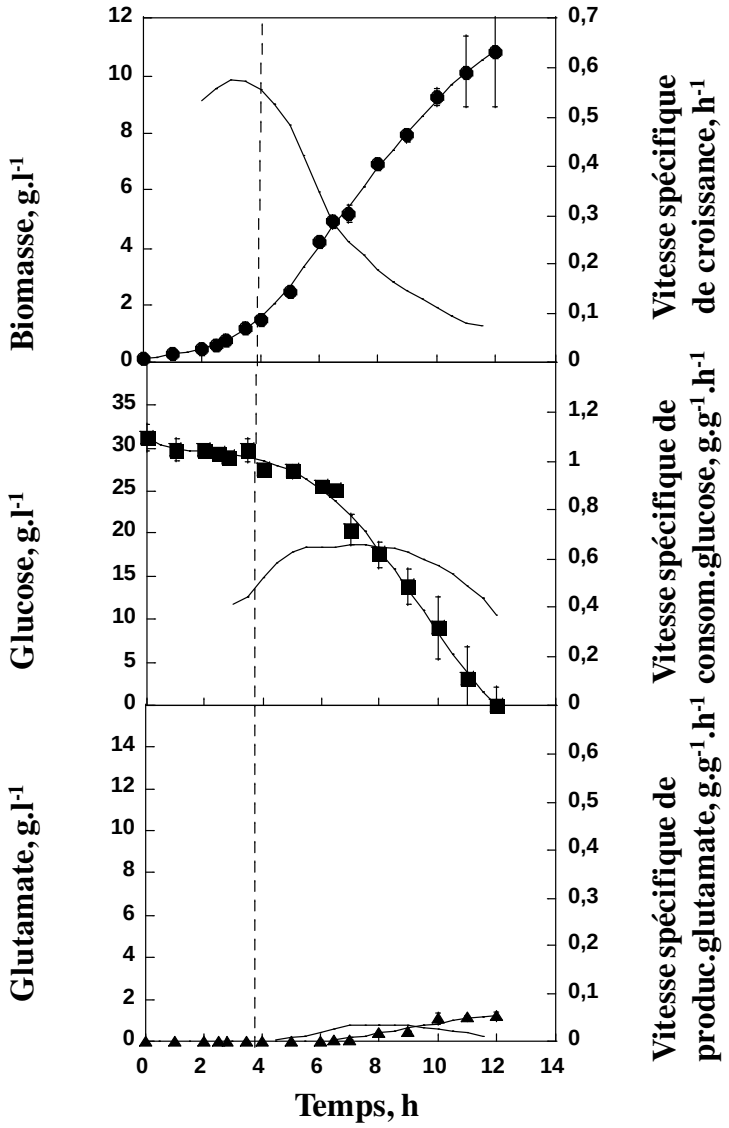


Figure 39 *:* **Cinétique de *C. glutamicum* 2262 NP cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 41°C)**.
(A) Concentration en biomasse **(●)** et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}) **(B)** concentration en glucose ($g.l^{-1}$) **(■)** et de vitesse spécifique de consommation de glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$)**; (C)** concentration de glutamate **(▲)** et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$). La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 8°C (passage de 33 à 41°C).

En mode discontinu tout comme en mode continu (Uy, 2003), *C. glutamicum* 2262 NP peut donc retrouver la capacité à excréter le glutamate, cependant la vitesse spécifique de production du glutamate reste faible comparée à celle de *C. glutamicum* 2262. Afin de vérifier si une variation de température plus importante permettait d'accroître la capacité d'excrétion

de ce variant non producteur, des élévations de température plus importantes, de 10 et 12°C, ont été réalisées.

II.A.4. Elévation de la température de 33 à 43°C

Avant le choc thermique, la vitesse spécifique de croissance augmente pour atteindre 0,66 h^{-1} puis elle diminue très rapidement après un passage à 43°C. La concentration finale en biomasse n'excède pas 9 $g.l^{-1}$ (Figure 40 A). Le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,42 $g.g^{-1}$. La vitesse spécifique de consommation du glucose, augmente et atteint le maximum de 0.6 $g.g^{-1}.h^{-1}$. Elle diminue progressivement ensuite après induction à 43°C pour atteindre 0,2 $g.g^{-1}.h^{-1}$en fin de culture (Figure 40 B). Le glucose dont la concentration initiale est de 30 g. l^{-1}, n'est pas totalement consommé après de 12 h de culture. Après induction à 43°C, la concentration finale en glutamate est de 3,2 $g.l^{-1}$. La vitesse spécifique maximale de production de glutamate est de 0,16 $g.g^{-1}$. h^{-1} (Figure 40 C). Une faible accumulation de lactate de l'ordre de 0,5 $g.l^{-1}$ est détectée en fin de culture.

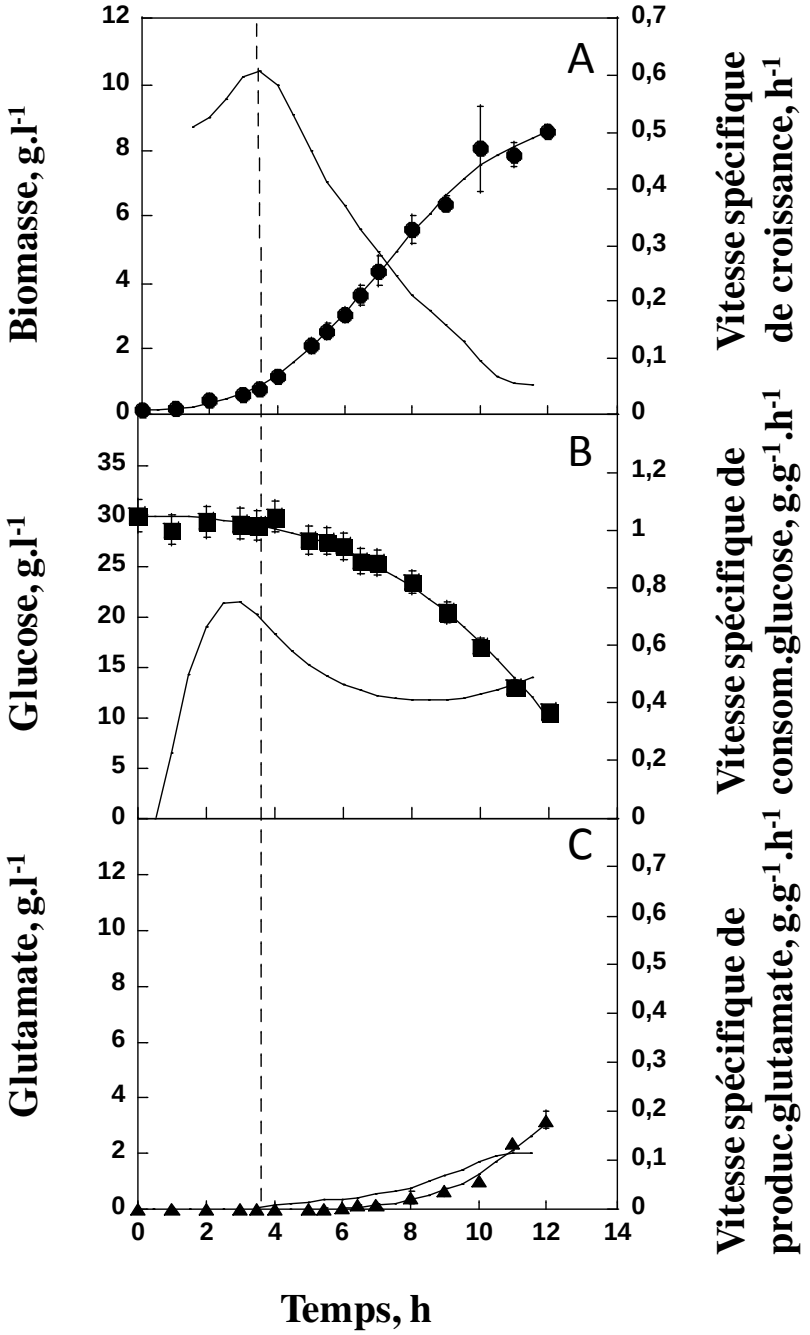


Figure 40 *:* **Cinétique de *C. glutamicum* 2262 NP cultivé en mode discontinu au cours d'un procédé thermo-induit (33 à 43°C).**

(A) Concentration en biomasse (•) et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}); **(B)** concentration en glucose ($g.l^{-1}$) **(■)** et de vitesse spécifique de consommation de glucose(——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$); **(C)** concentration de glutamate **(▲)** et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 10°C (passage de 33 à 43°C).

.

Tout comme à 41°C, *C. glutamicum* 2262 NP produit donc du glutamate mais aussi du lactate. La concentration finale en biomasse est encore plus affectée à 43 qu'à 41°C.

II.A.5. Elévation de température de 33 à 45°C

Une vitesse spécifique maximale de croissance proche de celles mesurées précédemment a été obtenue (0,55 h^{-1}) avant le choc thermique (Figure 41 A). Néanmoins, cette vitesse spécifique diminue très rapidement jusqu'à devenir négligeable seulement 5 heures après le choc thermique. Par conséquent, la concentration en biomasse maximale obtenue est de l'ordre de 2,2 $g.l^{-1}$ seulement. L'élévation de la température du milieu de culture à 45°C affecte donc très fortement la croissance. Le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,28 $g.g^{-1}$. La concentration initiale en glucose est de 31 $g.l^{-1}$, mais seulement 9 $g.l^{-1}$ de glucose sont consommés après 12 h de culture (Figure 41 B). La vitesse spécifique de consommation de glucose atteint 0,5 $g.g^{-1}.\ h^{-1}$ avant induction puis après le changement de température, celle-ci se stabilise à 0,38 $g.g^{-1}.\ h^{-1}$ jusqu'à la fin de la culture. Après le changement de température, seulement 2 $g.\ l^{-1}$ de glutamate ont été produits (Figure 41 C), avec une vitesse de production de glutamate maximale de 0,12 $g.g^{-1}.\ h^{-1}$. D'autre part, 2 $g.l^{-1}$ de lactate ont été produits lors de cette culture.

La concentration en glutamate n'est donc pas plus importante à 45°C, cette faible excrétion du glutamate peut être expliquée par une croissance très affectée à cette température.

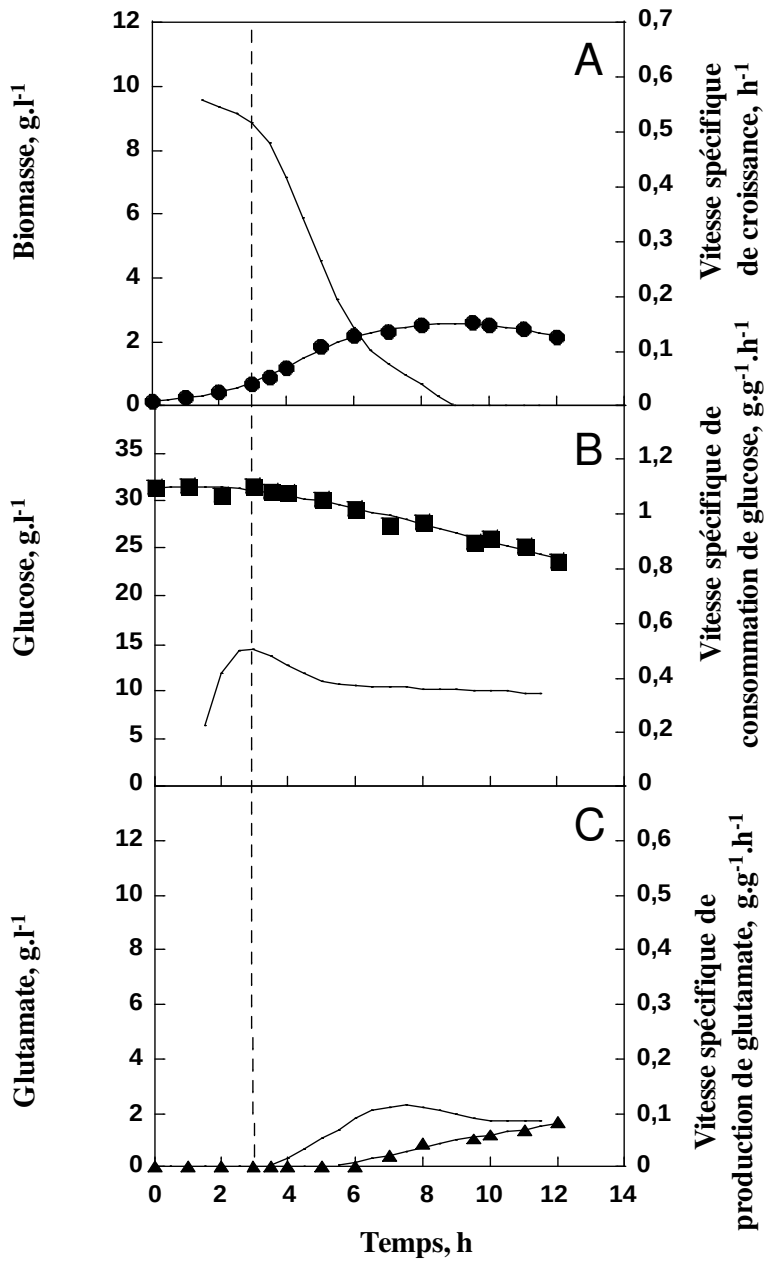


Figure 41 *:* **Cinétique de *C. glutamicum* 2262 NP au cours d'un procédé thermo-induit en mode discontinu (33 à 45°C)**.

(A) Concentration en biomasse (•) et vitesse spécifique de croissance (——) (h^{-1}); **(B)** concentration de glucose ($g.l^{-1}$) (■) et de vitesse spécifique de consommation de glucose (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$); **(C)** concentration de glutamate (▲) et vitesse spécifique de production de glutamate (——) ($g.g^{-1}.h^{-1}$) obtenues avec *C. glutamicum* 2262 NP cultivé en mode discontinu. La ligne en pointillés indique le moment où la température du milieu a été augmentée de 12°C (passage de 33 à 45°C).

Quelle que soit la variation de température (33-41°C, 33-45°C et 33-43°C) excepté 33-39°C, une production de glutamate est mesurée avec *C. glutamicum* 2262 NP. Cependant le titre de glutamate produit est très faible comparé à celui obtenu avec *C. glutamicum* 2262. En effet, même si le variant non producteur retrouve la capacité à produire du glutamate à certaines variations de température, les titres en glutamate atteints sont de 1,3 $g.l^{-1}$ à 41°C, 3,2 $g.l^{-1}$ à 43°C et 2 $g.l^{-1}$ à 45°C. Le titre obtenu à 41°C en glutamate est proche de celui obtenu avec le procédé thermique 33-36°C avec *C. glutamicum* 2262. Lorsque la variation de température est de 12°C, (33-45°C), la croissance cellulaire est très faible (2,2 $g.l^{-1}$), ceci est probablement la raison pour laquelle un faible titre en glutamate est obtenu. De plus, au cours études précédentes réalisées *in vitro* sur l'effet de la température sur les activités enzymatiques ODH et PDH, il avait été mis en évidence qu'à 45°C, aucune de ces deux activités enzymatiques n'était détectée (Uy, 2003).

Afin de caractériser le variant non producteur sur le plan métabolique, deux variations de températures 33-43°C et 33-39°C, ont été choisies. Le choix de ces deux amplitudes repose sur le fait qu'à 33-39°C, il y a absence totale de production du glutamate, et qu'à 33-43°C on obtient le titre le plus important en glutamate comparativement aux autres variations de température.

II.B. Activités enzymatiques ODH et PDH

Un travail identique à celui présenté précédemment concernant l'influence des variations de température étudiées chez la souche de référence, a donc été effectué. Les résultats sont présentés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH ($nmol.min^{-1}.mg^{-1}$) chez *C. glutamicum* 2262 NP E1 (prélèvement avant le choc thermique), **E2** et **E3** (1 h et 3 h après le choc thermique). Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)	PDH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)
E1	**33**	**2,8 ± 1,6**	**26,7 ± 6,7**
E2	**39**	**2,2 ± 1,2**	**28,5 ± 1,1**
E3	**39**	**4,9 ± 0,5**	**26,8 ± 2,3**

Lors de l'élévation de la température du milieu de culture à 39°C, l'activité PDH est maintenue et l'activité ODH augmente après 3 heures à 39°C. Dans le même temps, aucune excrétion de glutamate n'est mesurée. Le maintien de l'activité ODH empêche la déviation du

flux de carbone vers la synthèse du glutamate, ce qui favorise la croissance de ce variant même après une élévation de la température à 39°C.

Lors du choc thermique de 33 à 43°C chez *C. glutamicum* 2262 NP, qui dans ces conditions produit du glutamate (3,2 $g.l^{-1}$), l'activité PDH n'est pas affectée après une heure à 43°C, puis diminue de 45% après 3 heures de culture à 43°C. De la même manière, l'activité ODH est légèrement diminuée 1 heure après le choc thermique puis devient négligeable 3 heures après le changement de température.

Tableau 6 : Activités spécifiques des complexes PDH et ODH ($nmol.min^{-1}.mg^{-1}$) chez *C. glutamicum* 2262 NP E1 (prélèvement avant le choc thermique), **E2** et **E3** (1 h et 3 h après le choc thermique). Les cultures et les dosages enzymatiques ont été reproduits trois fois, puis l'écart-type a été calculé sur ces trois tests.

Echantillon	Température (°C)	ODH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)	PDH ($nmol.min^{-1}mg^{-1}$)
E1	**33**	**3,1 ± 1,4**	**25,0 ± 1,4**
E2	**43**	**2,5 ± 0,4**	**24,0 ± 1,6**
E3	**43**	**0,4 ± 0,7**	**14,3 ± 2,0**

Comme nous l'avons vu précédemment, une élévation de la température du milieu de culture de 33°C à 39°C chez *C. glutamicum* 2262 provoque une disparition de l'activité ODH et une diminution de l'activité PDH de 45%. Dans ces conditions de culture, l'excrétion du glutamate est concomitante avec la diminution de l'activité de ces deux enzymes. Pour la variation de température de 33 à 43°C appliquée à *C. glutamicum* 2262 NP, les activités spécifiques des deux enzymes sont maintenues pendant la première heure après le passage à 43°C, puis chutent après 3 heures à 43°C. Ces mesures sont encore une fois en parfaite corrélation avec la production du glutamate. En effet, une heure après l'induction à 43°C, aucune production du glutamate n'est observée. Celle-ci ne débute qu'après 3 heures à 43°C. Lors d'une variation de température de 33 à 43°C, les mesures d'activité ODH et PDH chez *C. glutamicum* 2262 NP présente un profil similaire à celui de *C. glutamicum* 2262 lors de la variation de température de 33 à 37°C. Néanmoins, cette similarité au niveau enzymatique ne permet pas au variant non produteur d'atteindre la concentration finale de glutamate obtenue avec *C. glutamicum* 2262. Il est probable que la variation de température, beaucoup plus importante chez le variant non producteur, affecte de façon plus importante le métabolisme de celui-ci. De ce fait, même si *C. glutamicum* 2262 NP est capable de retrouver des capacités à produire du glutamate, il reste dans l'incapacité d'égaler des concentrations en glutamate avoisinant celles de *C. glutamicum* 2262.

Comme cela avait été précédemment observé chez *C. glutamicum* 2262, nous avons donc pu montrer que la diminution de l'activité des 2 enzymes, l'ODH et la PDH, est nécessaire pour déclencher l'excrétion du glutamate et cela même pour des titres en glutamate très faibles comme ceux obtenus avec le variant *C. glutamicum* 2262 NP. Il ne semble donc pas y avoir de relation entre la diminution de l'activité ODH et la concentration produite en glutamate (Uy, 2003).

II. C. Expression des protéines de stress

Afin de compléter cette étude, comme chez *C. glutamicum* 2262, l'évolution des protéines cytoplasmiques suite à des variations de température 33-39°C et 33-43°C a été mesurée chez *C. gluamicum* 2262 NP.

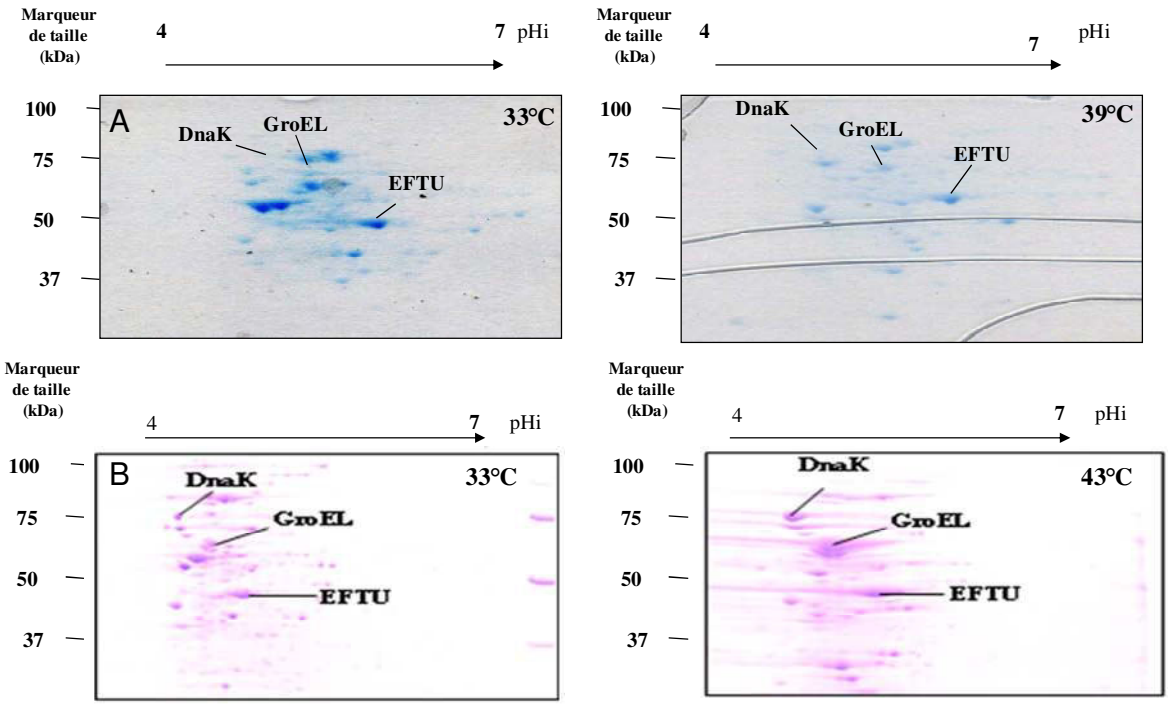


Figure 42 : Analyse comparative en gel d'électrophorèse 2D des protéines cytoplasmiques de *C. glutamicum* 2262 NP suite à un choc thermique de 33 à 39°C.
(A) Profil protéique à 33°C et après 3 heures à 39°C de *C. glutamicum* 2262 NP **(B)** Profil protéique à 33°C et après 3 heures à 43°C de *C. glutamicum* 2262. 400µg de protéines ont été déposés par gel.

Le niveau d'expression des protéines est identique entre l'échantillon prélevé avant et après induction à 39°C. Ces résultats montrent que les protéines de stress ne sont pas surexprimées lorsque la température est augmentée de 33 à 39°C pour le variant non producteur. Ce variant semble donc être insensible à la variation de température comprise

entre 33 et 39°C (Figure 42 A). Par ailleurs, l'augmentation de la température du milieu de culture à 43°C, permet de visualiser une légère augmentation du niveau d'expression des protéines HSP (Figure 42 B). De ce fait, le variant non producteur ressent un stress thermique à 43°C.

Des études précédentes avaient montré que le variant *C. glutamicum* 2262 NP était capable de produire du glutamate lorsque la température était augmentée de 33 à 41°C en mode continu (Uy *et al*., 2003). Dans ce contexte, la comparasion des deux souches, *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* 2262 NP a été réalisée afin de caractériser les mécanismes physiologiques aboutissant à l'excrétion du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu au cours du procédé thermo-induit. Il apparaît que la souche *C. glutamicum* 2262 NP est une souche thermosensible puisqu'elle produit du glutamate suite à une variation de température supérieure ou égale à 8°C. Cependant son niveau de production reste toujours bien inférieur à ce qu'il est chez *C. glutamicum* 2262. Comme chez cette dernière, la température a une grande influence sur la croissance car chez *C. glutamicum* 2262 NP, plus la température augmente, plus la croissance diminue. Dès que la production de glutamate est effective, on retrouve chez *C. glutamicum* 2262 NP les mêmes mécanismes que chez *C. glutamicum* 2262. En effet, après l'élévation de température, une réduction forte des activités enzymatiques PDH et ODH, une surexpression de protéines de stress thermique, telles que DnaK, GroEL et EFTU ont été obtenus chez *C. glutamicum* 2262 NP.

La présence de ces protéines de stress est peut être simplement due à l'élévation de température ressentie par la bactérie. Par contre, cela semble indiquer que la bactérie doit ressentir ce stress thermique pour être en capacité de produire du glutamate. Il demeure cependant hasardeux de relier la présence de ces protéines de stress au mécanisme de production de glutamate.

Par ailleurs, il apparaît clairement que lors du procédé thermo-induit, les activités PDH et ODH doivent être respectivement diminuées ou abolies pour que *C. glutamicum* 2262 (ou 2262 NP) soit en capacité d'excréter du glutamate. L'abolition de l'activité ODH lors d'un procédé de production du glutamate a été observée pour la première fois chez *B. flavum* par Shiio *et al* (1982). Ce n'est qu'à partir de 2006, que la littérature rapporte un système de régulation de l'activité ODH par un phénomène de phosphorylation-déphosphorylation. Ce système a été mis en évidence chez *C. glutamicum* ATCC 13032 (Niebisch *et al.*, 2006). Chez cette souche, le complexe ODH est régulé par la protéine OdhI. Lorsque celle-ci est phosphorylée par des protéines kinases, elle n'interagit pas avec ODH. Lorsqu'elle est déphosphorylée par l'action de la phosphatase PPP, elle se fixe à ODH et provoque une

inhibition de l'activité du complexe. Grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques d'OdhI, les 2 formes de cette protéine (phosphorylée et déphosphorylée) ont pu être mises en évidence et quantifiées. Dans le chapitre suivant, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'état de phosphorylation de la protéine OdhI au cours de la fermentation glutamique chez *C. glutamicum* 2262 ainsi que chez son variant *C. glutamicum* 2262 NP.

Chapitre II : Effet de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI sur la régulation de l'activité ODH au cours du procédé thermo-induit de production de glutamate.

I. Cinétique de déphosphorylation d'OdhI au cours de différents procédés de production de glutamate avec *C. glutamicum*

Cette partie du travail est présentée sous la forme d'une publication publiée dans Applied Microbiology and Biotechnology 2010 Aug;87(5):1867-74.

La régulation de l'activité ODH fait intervenir la phosphoprotéine OdhI. L'état de phosphorylation de la protéine OdhI est contrôlé par plusieurs protéines kinases (PknG, PknL, PknB et PknA) et une phosphatase (PPP). Dans cette étude, les cinétiques de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI au cours du procédé de production du glutamate (induction en limitation biotine ou suite à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C) ont été suivies. Dans un premier temps, la culture de *C. glutamicum* 2262 a été effectuée à 33°C sans induction. En ce qui concerne la limitation en biotine, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux fournis lors de cultures réalisées avec la souche de référence *C. glutamicum* ATCC 13032. La protéine kinase PknG est décrite dans la littérature, comme la principale protéine kinase phosphorylant OdhI. Aussi, un mutant dépourvu de l'activité kinase PknG, *C. glutamicum* 2262 *pknG::ka*n a été construit. L'influence d'une telle mutation sur la phosphorylation d'OdhI et sur la production de glutamate suite à une élévation de température de 33 à 39°C a été étudiée.

Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87:1867–1874
DOI 10.1007/s00253-010-2599-y

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*

Kenza-Amel Boulahya · Emmanuel Guedon · Stéphane Delaunay · Christian Schultz · Joseph Boudrant · Michael Bott · Jean-Louis Goergen

Received: 21 January 2010 / Revised: 12 March 2010 / Accepted: 4 April 2010 / Published online: 7 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In *Corynebacterium glutamicum*, the activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex was shown to be controlled by the phosphorylation of a 15-kDa protein OdhI by different serine/threonine protein kinases. In this paper, the phosphorylation status and kinetics of OdhI dephosphorylation were assessed during glutamate producing processes triggered by either a biotin limitation or a temperature upshock from 33°C to 39°C. A dephosphorylation of OdhI in *C. glutamicum* 2262 was observed during the biotin-limited as well as the temperature-induced glutamate-producing process. Deletion of *pknG* in *C. glutamicum* 2262 did not affect the phosphorylation status of OdhI during growth and glutamate production phases triggered by a temperature upshock, though a 40% increase in the specific glutamate production rate was measured. These results suggest that, under the conditions analyzed, PknG is not the kinase responsible for the phosphorylation of OdhI in *C. glutamicum* 2262. The phosphorylation status of OdhI alone is, as expected, not the only parameter that determines the performance of a specific strain, as no clear relation between the specific glutamate production rate and OdhI phosphorylation level was demonstrated.

K.-A. Boulahya · E. Guedon (✉) · S. Delaunay · J. Boudrant · J.-L. Goergen
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR CNRS 3349, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy Université, 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
e-mail: emmanuel.guedon@ensaia.inpl-nancy.fr

C. Schultz · M. Bott
Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany

Keywords *Corynebacterium glutamicum* · Glutamate · OdhI · Biotin limitation · Temperature increase · PknG

Introduction

Since the discovery of the glutamate-producing bacterium, *Corynebacterium glutamicum*, by Kinoshita et al. (1957), extensive researches have been carried out in order to elucidate physiological mechanisms involved in the overproduction of glutamate. These last years, regulation of glutamate production at the enzymatic level has gained interest because, under all conditions that trigger glutamate production, i.e., biotin limitation, surfactant or antibiotic addition, and thermal upshock, activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) was found to be strongly reduced if not completely abolished (Kawahara et al. 1997; Kimura et al. 1999; Uy et al. 2003; Kimura 2005; Shimizu and Hirasawa, 2006). In addition, a deletion of the *odhA* gene in *C. glutamicum* encoding for an E1/E2 subunit of ODHC in association with point mutations in a gene required for glutamate export resulted in a glutamate production similar to that obtained with the wild type after induction (Asakura et al. 2007). In fact, recently, Niebisch et al. (2006) demonstrated that the regulation of the ODHC activity was controlled through the phosphorylation status of OdhI, a small soluble protein. It was shown in vitro that the formation of a complex between OdhA and the OdhI protein in its unphosphorylated state leads to an inhibition of ODHC (Niebisch et al. 2006). Phosphorylation of OdhI is catalyzed by serine/threonine protein kinases, one of which is PknG. Others are PknA, PknB, and PknL since it has been reported that these three additional kinases are able to phosphorylate OdhI in vitro and in vivo (Fiuza et al. 2008; Schultz et al. 2009). Conversely, dephosphorylation of OdhI is catalyzed by a phosphoserine/

threonine protein phosphatase (Ppp) encoded by the gene *cg0062* (Schultz et al. 2007, 2009). Ppp, PknA, PknB, and PknL are membrane-integral proteins while PknG was reported to be soluble or at least partially membrane-associated (Fiuza et al. 2008; Niebisch et al. 2006; Schultz et al. 2007). It is now well admitted that unphosphorylated OdhI is required for the full induction of glutamate excretion, as deletion of this protein resulted in a decrease in glutamate synthesis up to 99% (Schultz et al. 2007). A deletion of PknG significantly increased the glutamate excretion under strong biotin limitation and after ethambutol addition (Schultz et al. 2007).

With the aim to get a better understanding of the control of glutamate production through regulatory proteins, our study focused on the kinetics of OdhI phosphorylation during a glutamate production process using *C. glutamicum* 2262. *C. glutamicum* 2262 is an industrial bacterium known to overproduce glutamate after a thermal induction or under biotin limitation similarly to *C. glutamicum* ATCC 13032 (Delaunay et al. 1999a). In this study, we compared the kinetics of growth and glutamate formation in relation to the phosphorylation status of OdhI in *C. glutamicum* ATCC 13032 cultivated during a glutamate production process triggered by biotin limitation and in *C. glutamicum* 2262 cultivated under the same conditions or after a temperature upshock.

Materials and methods

Bacterial strain and medium composition

Strains used in this study were *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* 2262, and *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* (this work). The composition of the glutamate production medium was based on MCGC medium (Von der Osten et al. 1989) in which citrate was replaced by deferoxamine (Delaunay et al. 1999a). This medium consisted of glucose (40 g l^{-1}), Na_2HPO_4 (3 g l^{-1}), KH_2PO_4 (6 g l^{-1}), NaCl (2 g l^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (8 g l^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0.4 g l^{-1}), $FeSO_4.7H_2O$ (40 mg l^{-1}), $FeCl_3$ (4 mg l^{-1}), $ZnSO_4.7H_2O$ (1 mg l^{-1}), $CuCl_2.2H_2O$ (0.4 mg l^{-1}), $MnSO_4.H_2O$ (4 mg l^{-1}), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (0.2 mg l^{-1}), $Na_2B_4O_7.10H_2O$ (0.4 mg l^{-1}), $CaCl_2$ (84 mg l^{-1}), biotin (2 mg l^{-1}), thiamine (20 mg l^{-1}), deferoxamine (3 mg l^{-1}), and glycine betaine (2 g l^{-1}). In batch culture, this medium was supplemented with polypropylene glycol (1.3 g l^{-1}) used as antifoaming agent.

Cultures conditions

Glutamate production was triggered by two different methods: either by biotin limitation (Shiio et al. 1962) or by temperature upshock (Delaunay et al. 1999a) using two induction modes. In the first induction mode, C. *glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* ATCC 13032 were cultivated aerobically at 33°C and 200 rpm in 500-ml flasks containing 50 ml of MCGC medium supplemented with 4 µg/l biotin (Delaunay et al. 1999b). During the temperature upshift process, *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* were grown at 33°C, then when the biomass concentration reached 1 g l^{-1}, the culture temperature was increased to 39°C to provoke glutamate production (Delaunay et al. 1999a; Momose and Takagi 1978; Sun et al. 1989).

Analytical methods

During cultivation, samples were collected to determine biomass, glucose, and glutamate concentrations. The cell concentration was determined by absorbance at 570 nm (Hitachi 2000, Japan). After centrifugation of culture samples (13,000 rpm, 5 min at room temperature, Beckman), titers of glutamate and glucose in the culture supernatant were determined enzymatically (r-Biopharm, Germany). Protein concentrations were assayed according to the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford 1976).

Construction of a *pknG::kan* mutant of *C. glutamicum* 2262

The mutant of *C. glutamicum* 2262 defective in *pknG* was constructed by inserting a kanamycin resistance cassette into the *pknG* gene. Design of the forward primer pknG1 (CGA-ATT-CCT-CGC-CGA-CAT-CAC-CAC) and reverse primer pknG2 (AGA-ATT-CGC-ATA-GGA-GGA-TCC-GGA-GAG-CAT-A) to amplify *pknG* was based on the genome sequence of *C. glutamicum* ATCC 13032 (GenBank BX927147). A 0.8-kb fragment was amplified by PCR using DNA from *C. glutamicum* 2262 as a template. The expected PCR product was then cloned into Zero-Blunt pCR cloning vector (Invitrogen) containing a kanamycin resistance cassette. The resulting plasmid was transferred into *C. glutamicum* 2262 by electroporation. Transformants were selected on BHI agar plates containing 50 µg ml^{-1} kanamycin and incubated at 33°C.

Western blot analysis

Analysis of the OdhI phosphorylation status was carried out using Western blotting essentially as previously described (Schultz et al. 2007).

Statistical analysis

Data for the OdhI/OdhI-P ratio determined under the different induction conditions (biotin limitation, biotin

excess, thermal upshock) at different times of the fermentations using *C. glutamicum* 2262, *C. glutamicum* 13032, and *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* were analyzed by a Student's *t* test (Statbox pro software (v. 6.2) available at www.grimmersoft.com).

Results

Kinetics of *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262 cultivated under biotin unlimited or limited conditions

C. glutamicum ATCC 13032 and 2262 were grown in MCGC medium with glucose as the sole carbon source, either in the presence of a high amount of biotin (2 mg/l) or under biotin-limited conditions (4 µg/l) to induce glutamate production (Fig. 1). With a high amount of biotin, *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262 were able to grow at a maximal specific growth rate of 0.67 and 0.69 h^{-1}, respectively. For both strains, the maximal biomass titer, i.e., 27 and 26 g/l, respectively, for *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262, was reached after 10 h of cultivation upon glucose exhaustion. Then, a decrease in the biomass occurred down to 22 and 20 g/l for *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262 due to a slight cell lysis and/or a decrease in cell volume. Under these culture conditions, glutamate production was not detected.

Growth of the two strains was slower under biotin limitation, with a maximal specific growth rate of 0.53 h^{-1} for both strains. As expected, biotin limitation induced glutamate accumulation in the culture broth up to 8 or 12 g/l with maximal specific production rates of 0.14 and 0.21 g/g/h for *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262, respectively. Then, after a 16-h production phase, glucose (initial concentration 30 g/l) was completely depleted. A slightly higher accumulation of glutamate occurred with *C. glutamicum* 2262 than with *C. glutamicum* ATCC 13032, due to the higher maximal specific glutamate production rate of *C. glutamicum* 2262 compared to *C. glutamicum* ATCC 13032. These results are in agreement with the fact that *C. glutamicum* 2262 displays industrial performance with a higher ability to produce glutamate upon induction compared to *C. glutamicum* ATCC 13032.

Influence of biotin limitation on the phosphorylation status of OdhI in *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262

OdhI, a small soluble regulatory protein, was recently shown to control the activity of ODHC through its phosphorylation status and therefore the production of glutamate by *C. glutamicum*. Thus, it was interesting to monitor OdhI phosphorylation changes for both *C. glutamicum* 2262 and ATCC 13032 strains cultivated in MCGC medium containing either a low biotin concentration (4 µg/

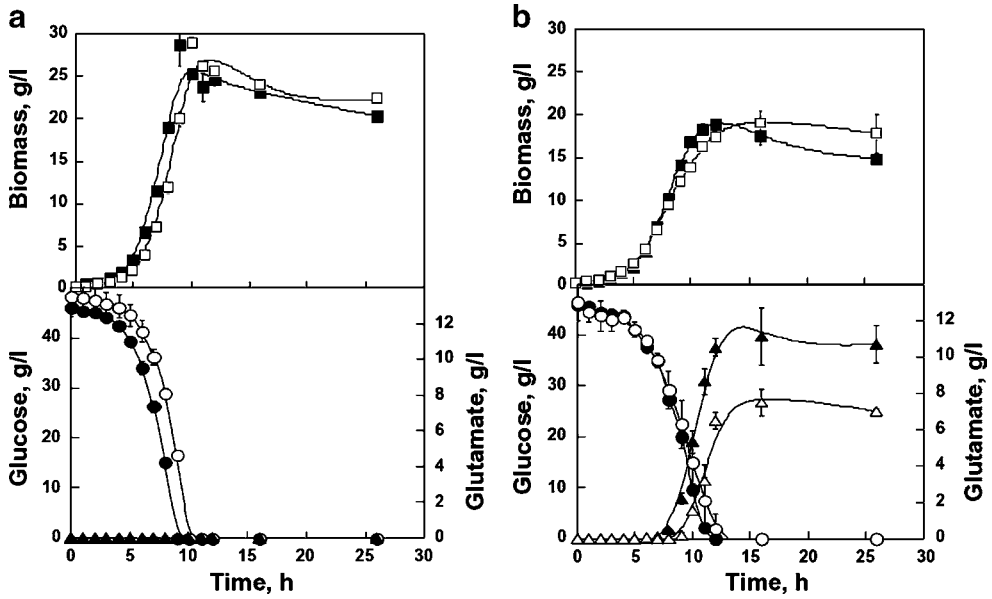


Fig. 1 **a** Growth, glucose consumption, and glutamate formation by *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* ATCC 13032 cultivated with high biotin concentration (2 mg/l). Biomass of *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open squares*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled squares*). Glucose consumption by *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open circles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled circles*). Glutamate production by *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open triangles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled triangles*). **b** Growth, glucose consumption, and glutamate formation by *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* ATCC 13032 cultivated under biotin limitation (4 µg/l). Biomass of *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open squares*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled squares*). Glucose consumption by *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open circles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled circles*). Glutamate production by *C. glutamicum* ATCC 13032 (*open triangles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled triangles*)

l), i.e., inducing condition enabling glutamate production, or a high biotin concentration (2 mg/l), i.e., noninducing condition for glutamate production. For both strains, samples of each culture were harvested after 2 and 10 h of fermentation, and equal amounts of protein were characterized using Western blot analysis (Fig. 2).

As expected, Western blot analyses revealed that, for each strain, both phosphorylated and unphosphorylated OdhI forms were present under noninducing conditions (2 mg/l biotin; Fig. 2a). From 2 to 10 h after the start of the cultivation, the relative amount of phosphorylated OdhI increased from 29% to 47% and from 33% to 49% for *C. glutamicum* 2262 and ATCC 13032, respectively. Under those culture conditions, glutamate was not produced by both *C. glutamicum* strains.

Under biotin-limited conditions (4 µg/l), glutamate accumulated in the medium at concentrations of 2 and 6 g/l for *C. glutamicum* ATCC 13032 and 2262, respectively, after 10 h of fermentation. Contrary to the previous cultivation conditions, the relative amount of phosphorylated OdhI measured at the beginning of the production phase (10 h) decreased for both strains compared to the initial growth phase (2 h after the start of the fermentation), as revealed by densitometry analyses (Fig. 2b). Nevertheless, residual amounts of phosphorylated OdhI were still detectable for the two strains after biotin limitation. It appeared from these results that a dephosphorylation of OdhI seems to be necessary for glutamate production by *C. glutamicum* 2262 as was already reported for *C. glutamicum* ATCC 13032.

As dephosphorylated OdhI inhibits ODHC and therefore deviates the carbon flux toward glutamate synthesis, one could have expected that a higher excretion of glutamate would be the result of a higher dephosphorylation of OdhI in *C. glutamicum* 2262 compared to *C. glutamicum* ATCC 13032. However, compared to *C. glutamicum* ATCC 13032 where a lower glutamate production was measured (2 vs 6 g/l), dephosphorylation of OdhI appeared to be rather similar or even less pronounced in *C. glutamicum* 2262 upon biotin limitation (11% vs 5%). Therefore, OdhI dephosphorylation does not appear to be a suitable parameter to predict the performances of a specific strain regarding glutamate production.

OdhI dephosphorylation kinetics during the temperature triggered glutamate producing process

Contrary to *C. glutamicum* ATCC 13032, glutamate production by *C. glutamicum* 2262 is known to be better induced upon a thermal upshock, from 33°C to 39°C. As excretion of glutamate induced after a temperature upshock could be subject to a regulation similar to the one involved during the biotin limitation process, proteins were extracted from *C. glutamicum* 2262 cells and the OdhI phosphory-

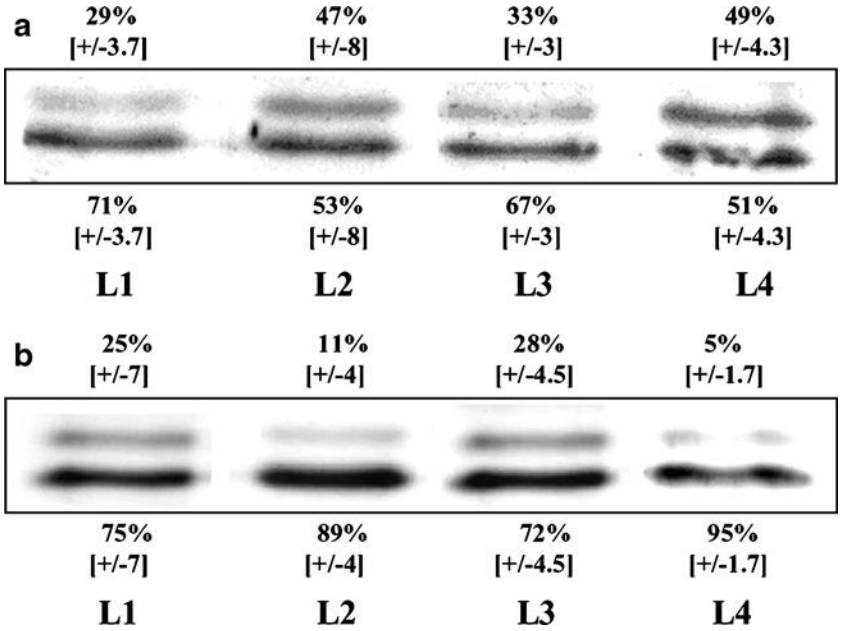


Fig. 2 Western blot analysis of phosphorylated and unphosphorylated OdhI in crude cell-free extracts of *C. glutamicum* strains. **a** Strains 2262 (*L1* and *L2*) and ATCC 13032 (*L3* and *L4*) cultivated in MCGC medium under biotin excess (2 mg/l) for 2 h (*L1* and *L3*) or for 10 h (*L2* and *L4*). **b** Strains 2262 (*L1* and *L2*) and ATCC 13032 (*L3* and *L4*) cultivated in MCGC minimal medium under biotin limitation (4 µg/l) for 2 h (*L1* and *L3*) or for 10 h (*L2* and *L4*). Percentage values indicate relative amounts of phosphorylated (*upper band*) and unphosphorylated (*lower band*) OdhI quantified by a densitometric method using Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). All cultures and Western blot analyses were performed in triplicate. A Student *t* test gave *P* values <0.05 for all comparisons of OdhI/OdhI-P ratios between samples analyzed at 2 and 10 h

lation status was assessed by Western blot analysis as described above.

C. glutamicum 2262 was first cultivated at 33°C in the MCGC medium, and then the temperature was increased to 39°C approximately 2 h after the start of the fermentation to reduce cell growth and induce glutamate production. As can be seen in Fig. 3, biomass reached a final concentration of 6 g/l 11 h after the beginning of the culture. During the same period of time, glutamate was produced at a maximal specific rate of 0.45 g/g/h and accumulated up to 11 g/l, whereas glucose, initially at 30 g/l, was completely exhausted (data not shown).

Western blot analyses indicated that the phosphorylated OdhI form was present when *C. glutamicum* 2262 was cultivated at 33°C (Fig. 4, L1); a 30% decrease in the phosphorylated OdhI form was observed 1 h after the increase in temperature to 39°C. Contrary to the biotin-mediated induction, the phosphorylated OdhI form was almost undetectable 3 h after the temperature shift, whereas unphosphorylated OdhI accumulated during the same period from 74% to 95%. It has to be noted that the maximal specific glutamate production rate was observed during the same period of time, coinciding with the strong reduction in phosphorylated OdhI.

Influence of *pknG* inactivation on the phosphorylation status of OdhI and glutamate production by *C. glutamicum* 2262

Because the inactivation of the *pknG* gene in *C. glutamicum* 2262 could result in an increase in the unphosphorylated OdhI form and, consequently, in an increase in the carbon flux toward glutamate synthesis, kinetics of growth and glutamate formation by both *C. glutamicum* 2262 wild type and a *pknG* mutant derivative were compared upon thermal upshock (Fig. 3). Whereas growth of *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* was significantly more affected by the thermal upshock, both wild-type and mutant strains produced the same amount of glutamate, i.e., 11 g/l. Despite glutamate yields calculated for *C. glutamicum* 2262 wild type and *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* were similar (0.43 g/g), the maximal specific rate of glutamate production by the *pknG* mutant strain was shown to be approximately 40% higher (0.66 vs 0.45 g/g/h), suggesting that the *pknG* mutation had a strong influence on ODHC activity and associated regulatory proteins.

Western blot analyses of proteins extracted from *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* and wild-type strains revealed the presence of both phosphorylated and unphosphorylated OdhI forms when cultivated at 33°C (Fig. 4). In fact, relative amounts of phosphorylated OdhI forms appeared to be quite similar in both strains before and after thermal induction. This indicates that, under the conditions analysed here, PknG is not the main kinase responsible for OdhI phosphorylation. Nevertheless, the absence of PknG leads to a strong increase in the specific rate of glutamate production.

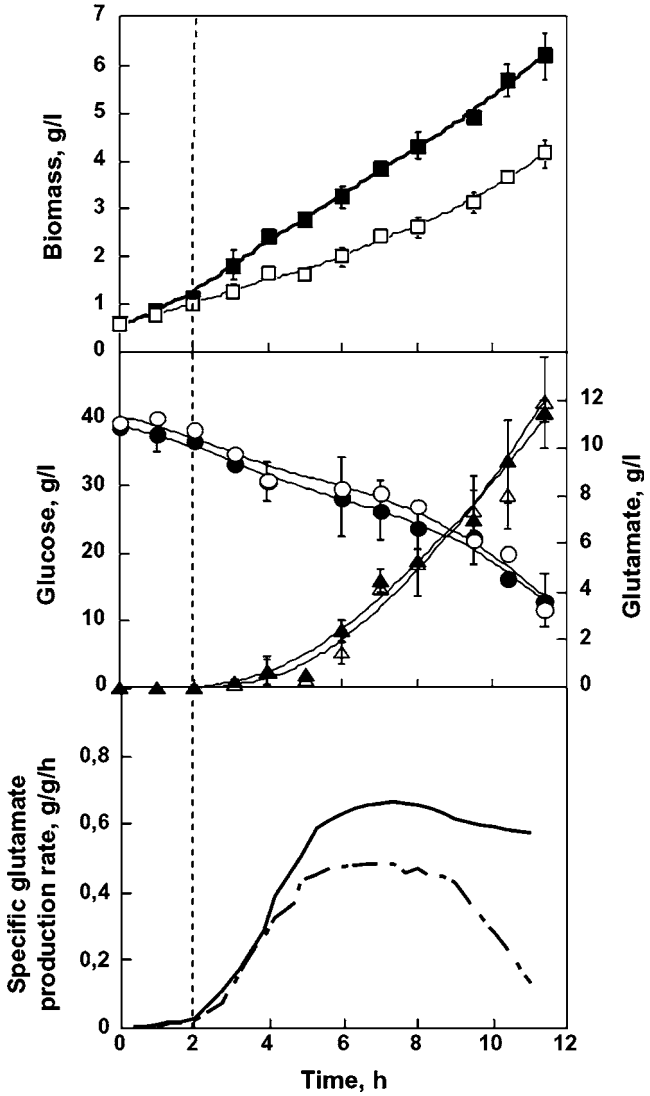


Fig. 3 Kinetics of temperature-triggered glutamate-producing batch processes using *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan and C. glutamicum* 2262 cultivated in MCGC medium. Biomass of *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* (*open squares*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled squares*). Glucose consumption by *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* (*open circles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled circles*). Glutamate production by *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* (*open triangles*) and *C. glutamicum* 2262 (*filled triangles*). Specific glutamate production rate by *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* (*plain line*) and *C. glutamicum* 2262 (*dashed line*). The *vertical dashed line* indicates the time when the temperature was increased from 33°C to 39°C

Discussion

Glutamate production by *C. glutamicum* can be induced by various stimuli affecting ODHC activity. One of them,

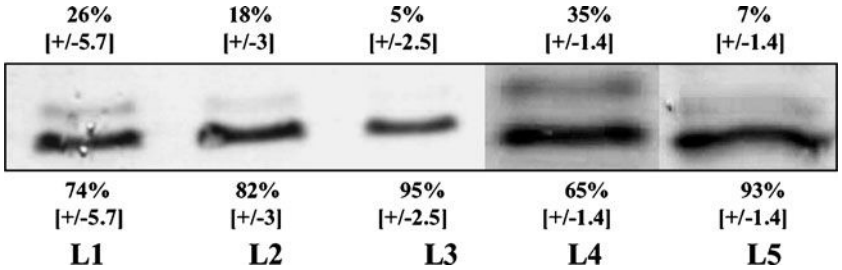


Fig. 4 Western blot analysis of phosphorylated and unphosphorylated OdhI in crude cell-free extracts of *C. glutamicum* strains 2262 (*L1*, *L2*, and *L3*) and 2262 *pknG::kan* (*L4* and *L5*) cultivated in MCGC medium before (*L1* and *L4*, 33°C) and 1 h (*L2*) or 3 h (*L3*, *L5*) after a temperature shift to 39°C. Percentage values indicate relative amounts of phosphorylated (*upper band*) and unphosphorylated (*lower band*) OdhI quantified by a densitometric method using Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). All cultures and Western blot analyses were performed in triplicate. A Student *t* test gave *P*-values<0.05 for all comparisons of OdhI/OdhI-P ratios between samples taken at 33°C and 39°C

biotin limitation, has been reported to be efficient for all *C. glutamicum* strains used so far during the glutamate processes (Bona and Moser 1997; Takinami et al. 1966). In this study, we focused on the regulation of glutamate production by *C. glutamicum* 2262, in comparison to the well-known ATCC 13032 strain. Whereas *C. glutamicum* ATCC 13032 can be considered as a reference strain in regard to the abundant dedicated literature and by the fact that its genome was fully sequenced few years ago (Kalinowski et al. 2003; Ikeda and Nakagawa 2003; Yukawa et al. 2007), *C. glutamicum* 2262 is an industrial strain able to produce large amounts of glutamate, up to 85 g/l under the appropriate triggering conditions such as a thermal upshock (Delaunay et al. 1999a). Interestingly, DNA microarray comparisons of chromosomal DNA of strain 2262 and ATCC 13032 revealed high similarity of the two strains (Stansen et al. 2005), suggesting that most of the regulation processes established in *C. glutamicum* ATCC 13032 could be at least similar if not identical in *C. glutamicum* 2262.

Recently, Niebisch et al. (2006) described a novel mechanism for control of ODHC activity in *C. glutamicum* ATCC 13032 involving the inhibitory protein OdhI. In its unphosphorylated form, OdhI binds to the OdhA subunit of ODHC and then inhibits its enzymatic activity. Phosphorylation of OdhI by PknG at Thr14 promotes a dissociation of the OdhI-ODHC complex. Besides, PknG, PknA, PknB, and PknL are also able to phosphorylate OdhI (Fiuza et al. 2008; Schultz et al. 2009) and, in the case of PknA and PknB, Thr15 of OdhI was found to be the phosphorylated site (Barthe et al. 2009). The four kinases presumably become active in response to specific stimuli, which are not known yet. Therefore, under different culture conditions, different kinases can be important for OdhI phosphorylation. Schultz et al. (2007) reported that a *pknG* mutant of *C. glutamicum* ATCC 13032 shows increased glutamate production under strong biotin limitation and in the presence of ethambutol, but not in the presence of Tween 40. These differences might be due to differences in the OdhI phosphorylation status caused by differential effects of the triggers on the activity of PknA, PknB, PknL, or the phosphatase Ppp. PknA, PknB, and PknL play a role in cell morphogenesis and possibly cell division (Fiuza et al. 2008; Schultz et al. 2009). Although none of these kinases is essential, it was not yet possible to create a mutant lacking both PknA and PknB (Schultz et al. 2009). In agreement with the results obtained for *C. glutamicum*, the OdhI homolog GarA of *Mycobacterium tuberculosis* was found to be phosphorylated by PknB at Thr22 (corresponding to Thr15 of OdhI) and by PknG at Thr21 (corresponding to Thr14 of OdhI; O'Hare et al. 2008; Villarino et al. 2005).

In this study, we investigated the regulation involved in glutamate production by *C. glutamicum* 2262, triggered either by biotin limitation or by a temperature upshock. Whereas the phosphorylation of OdhI was shown to increase when *C. glutamicum* 2262 was cultivated in the presence of excess amounts of biotin, under biotin limitation, the apparent phosphorylation of OdhI was decreased and resulted in glutamate production. A similar phenomenon was observed for *C. glutamicum* ATCC 13032 cultivated under the same conditions, suggesting that regulations involved in the control of glutamate production were similar for both strains when biotin is limiting.

Contrary to *C. glutamicum* ATCC 13032, a temperature upshock can promote glutamate production by *C. glutamicum* 2262. Under these conditions, a strong dephosphorylation of OdhI was observed 3 h after the temperature increase. Therefore, it can be suggested that a similar phenomenon was responsible for glutamate production by *C. glutamicum* 2262 subjected either to biotin limitation or to temperature upshift.

In fact, the dephosphorylation of OdhI alone during the production phases of the studied fermentations does not appear to be a valid criterion to determine the performances of a specific strain, as *C. glutamicum* ATCC 13032 with reduced production capacities, displayed a similar or higher

dephosphorylation of OdhI compared to *C. glutamicum* 2262 in biotin limitation. In addition, only a slight difference in OdhI dephosphorylation in *C. glutamicum* 2262 was observed between the temperature and the biotin processes (5% vs 11%) whereas specific glutamate production rates were significantly different (0.45 vs 0.21 g/g/h). This might be due to the fact that a residual ODHC activity remains under biotin limitation when the wild-type strain is cultivated.

An inactivation of *pknG* in *C. glutamicum* 2262 apparently did not influence the phosphorylation status of OdhI cultivated either at 33°C or at 39°C. Nevertheless, this mutation resulted in a significantly decreased growth rate and in a 40% increase in the specific glutamate production rate during the temperature process. Therefore, PknG is not the main kinase responsible for OdhI phosphorylation in *C. glutamicum* 2262 under the conditions studied. The strong effect of the PknG absence on specific rates of growth and glutamate production might be due to another regulatory mechanism involving PknG. It must be noticed that, under biotin limitation, phosphorylated OdhI of *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* was almost undetectable (data not shown) but accounted for 11% of the total protein in the wild-type strain (Fig. 2b).

In *C. glutamicum*, the control of glutamate production induced by various stimuli involves several regulatory proteins. By phosphorylating OdhI, kinases appear to play key roles but different, depending on the stimulus and the culture medium. According to Schultz et al. (2009), in addition to PknG, PknA has an important role in the phosphorylation of OdhI and could constitute the most promising target to better understand glutamate production mechanisms by *C. glutamicum* 2262 during the temperature-triggered process. The expression level and phosphorylation status (as an indicator of activity) of the different serine/threonine protein kinases involved in OdhI phosphorylation during the temperature-triggered glutamate producing process in association with metabolic flux analysis might give further clues about the mechanisms involved in amino acid overproduction by *C. glutamicum* 2262.

Acknowledgments This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through the "Corypar" project (ANR-05-JCJC-0069-01).

References

Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, Kawahara Y, Matsui K, Osumi T, Nakamatsu T (2007) Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol 73:1308–1319

Barthe P, Roumestand C, Canova MJ, Kremer L, Hurard C, Molle V, Cohen-Gonsaud M (2009) Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism. Structure 17:568–578

Bona R, Moser A (1997) Modelling of the glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Bioprocess Eng 17:139–142

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Delaunay S, Gourdon P, Lapujade P, Mailly E, Oriol E, Engasser JM, Lindley ND, Goergen JL (1999a) An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. Enzyme Microb Technol 25:762–768

Delaunay S, Uy D, Baucher MF, Engasser JM, Guyonvarch A, Goergen JL (1999b) Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. Metab Eng 1:334–343

Fiuza M, Canova MJ, Zanella-Cléon I, Becchi MA, Cozzone J, Mateos LM, Kremer L, Gil JA, Molle V (2008) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* towards the role of PknA and PknB in cell division. J Biol Chem 283:18099–18112

Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol 62:99–109

Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S (1997) Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. Biosci Biotechnol Biochem 61:1109–1112

Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey DA, Rückert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegräbe I, Tauch A (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J Biotechnol 104:5–25

Kimura E (2005) l-Glutamate production. In: Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC, Boca Raton, pp 439–463

Kimura E, Yagoshi C, Kawahara Y, Ohsumi T, Nakamatsu T, Tokuda H (1999) Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. Biosci Biotechnol Biochem 63:1274–1278

Kinoshita S, Udaka S, Shimono M (1957) Studies on the amino acid fermentation: part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol 3:193–205

Momose H, Takagi T (1978) Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. Agric Biol Chem 10:1911–1917

Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. J Biol Chem 281:12300–12307

O'Hare HM, Durán R, Cerveñansky C, Bellinzoni M, Wehenkel AM, Pritsch O, Obal G, Baumgartner J, Vialaret J, Johnsson K, Alzari PM (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. Mol Microbiol 70:1408–1423

Schultz C, Niebisch A, Gebel L, Bott M (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxogluta-

rate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. Appl Microbiol Biotechnol 76:691–700

Stansen C, Uy D, Delaunay S, Eggeling L, Goergen JL, Wendisch VF (2005) Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. Appl Environ Microbiol 71:5920–5928

Schultz C, Niebisch A, Schwaiger A, Viets U, Metzger S, Bramkamp M, Bott M (2009) Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. Mol Microbiol 74:724–741

Shiio I, Ôtsuka SI, Takahashi M (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J Biochem 51:56–62

Shimizu H, Hirasawa T (2006) Production of glutamate and glutamate-related amino acids: molecular mechanism analysis and metabolic engineering. In: Wendisch Volker F (ed) Microbiology monographs amino acid biosynthesis—pathways regulation and metabolic engineering. Springer, Germany, pp 1–38

Sun Z, Yu Z, Yang Y, Jin H, Yang H (1989) Fermentative production of L-glutamic acid from rice hydrolysate by temperature-sensitive mutant *Corynebacterium crenatum* N1. Gongye Weishengwu 19:9–14

Takinami K, Yamada Y, Okada H (1966) Biochemical effects of fatty acids and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Agric Biol Chem 30:674–682

Uy D, Delaunay S, Germain P, Engasser JM, Goergen JL (2003) Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. J Biotechnol 104:173–184

Villarino A, Duran R, Wehenkel A, Fernandez P, England P, Brodin P, Cole ST, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Cervenansky C, Alzari PM (2005) Proteomic identification of *M tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. J Mol Biol 350:953–963

Von der Osten CH, Gioannetti C, Sinskey AJ (1989) Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. Biotechnol Lett 11:11–16

Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kós P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y, Vertès AA, Inui M (2007) Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. Microbiology 153:1042–1058

Principales contributions de l'article :

La relation entre l'excrétion du glutamate et l'état de phosphorylation de la protéine OdhI lors des procédés de production du glutamate (limitation en biotine ou thermo-induit) a clairement pu être mise en évidence. Lorsque *C. glutamicum* 2262 est cultivée en excès de biotine et à 33°C, la proportion de la forme phosphorylée d'OdhI augmente et aucune production de glutamate n'est observée. A l'inverse, en limitation de biotine ou suite à une élévation de température à 39°C, la proportion de la forme phosphorylée diminue et l'excrétion du glutamate est observée. Par ailleurs, la vitesse maximale de production du glutamate coïncide avec la disparation de la forme phosphorylée d'OdhI.

De façon inattendue, l'inactivation du gène codant la protéine kinase PknG, décrite comme une des principales kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine OdhI, a un effet positif sur la vitesse maximale de production du glutamate, celle-ci est augmentée de 40% en absence de PknG. Par ailleurs, l'étude comparative de l'état de phosphorylation d'OdhI avant induction entre *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* révèle un profil similaire pour les deux souches. De ce fait, il est probable que PknG ne soit pas la principale kinase responsable de la phosphorylation d'OdhI chez *C. glutamicum* 2262.

II. Etat de phosphorylation d'OdhI chez *C. glutamicum 2262 pknG::kan* durant le procédé de production du glutamate en limitation de biotine

Dans l'article précédent, seul le procédé thermique avec le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* est présenté. Afin de compléter cette étude, nous nous sommes intéressés à l'état de phosphorylation de la protéine OdhI chez ce mutant lors d'un procédé de production du glutamate induit par une limitation en biotine. Comme précédemment, les 2 formes de cette protéine (phosphorylée et déphosphorylée) ont été suivies au cours de ce procédé.

Lors de ce procédé, une perte totale de la forme phosphorylée d'OdhI entre 2 et 10 heures de culture est observée (Figure 43). En effet, après 2 heures de culture, la biotine est encore présente dans le milieu de culture et les deux formes de la protéine OdhI sont observées dans les proportions suivantes: 32% de la forme OdhI phosphorylée et 68% de la forme non-phosphorylée. La concentration en glutamate mesurée après 2 heures de culture est négligeable. Cependant, après 10 heures de culture, alors que le milieu est carencé en biotine, la forme phosphorylée d'OdhI diminue fortement (12,5%) alors que la forme non-phosphorylée augmente (87,5%). La concentration en glutamate mesurée après 10 heures de culture est de 3,4 $g.l^{-1}$. L'ensemble de ces résultats confirment que la déphosphorylation de la protéine OdhI est nécessaire pour permettre l'excrétion du glutamate et ceci, pour deux modes d'induction étudiés, la limitation en biotine et l'élévation de la température. Par ailleurs, la forme phosphorylée de la protéine OdhI est présente même dans des conditions de non induction. De ce fait, ces résultats renforcent l'hypothèse émise précédemment et selon laquelle chez *C. glutamicum* 2262 la protéine OdhI peut être phosphorylée par des kinases autres que PknG.

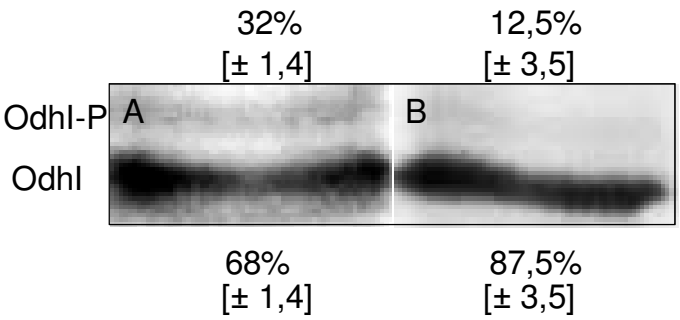


Figure 43 : Analyse par Western blot des formes phosphorylées d'OdhI et non-phosphorylées chez *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* cultivé en excès et sous limitation en biotine. **(A)** *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* cultivé dans du milieu MCGC en excès de biotine après 2 heures de culture. **(B)** *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* cultivé dans du milieu MCGC en limitation biotine après 10 heures de culture. 20 µg de protéines sont déposés sur le gel. Le pourcentage indique les concentrations relatives d'OdhI phosphorylée (bande supérieure du gel) et non-phosphorylée (bande inférieure du gel) quantifiées par une méthode densitométrique en utilisant le logiciel Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). Toutes les cultures et les analyses ont été reproduites trois fois. Le test Student t donne un $P < 0,05$ pour la comparaison du ratio OdhI/OdhI-P entre les échantillons analysés à 2 et 10 heures.

Les travaux de Schultz *et al*. (2007) avaient mis en évidence le rôle principal de la protéine kinase PknG dans la phosphorylation de la protéine OdhI chez *C. glutamicum* ATCC 13032. Notre étude nous a permis de mettre en évidence que PknG n'est pas la principale kinase chez *C. glutamicum* 2262 puisque la délétion de celle-ci n'affecte que très peu la phosphorylation de la protéine OdhI. En effet les deux formes de la protéine OdhI sont présentes chez le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* à 33°*C,* la forme phosphorylée d'OdhI disparait de la même manière que chez *C.glutamicum* 2262 sous les deux conditions d'induction de production du glutamate (élévation de la température et limitation en biotine).

Afin d'approfondir le lien entre l'état de phosphorylation de la forme OdhI et l'excrétion du glutamate, nous nous sommes intéressés à l'état de phosphorylation d'OdhI chez le variant non producteur du glutamate *C. glutamicum* 2262 NP au cours du procédé de production thermo-induit. Comme précédemment, deux amplitudes d'élévation de la température ont été réalisées, une élévation rapide de température (33-39°C) où le variant *C. glutamicum* 2262 NP ne produit pas de glutamate et une variation de température (33-43°C) où ce variant redevient capable d'excréter le glutamate mais en faible quantité.

III. Etat de phosphorylation d'OdhI chez *C. glutamicum* 2262 NP suite à une élévation de température

Les profils de phosphorylation d'OdhI sont différents selon l'amplitude de l'élévation de température appliquée. Chez *C. glutamicum* 2262 NP, les deux formes d'OdhI sont présentes avant et après induction à 39°C, le pourcentage de la forme phosphorylée avant induction est de 49%. Suite à l'élévation de la température, celui-ci se maintient à 47% et 48% respectivement après 1 heure et 3 heures à 39°C. De même, le pourcentage de la forme non-phosphorylée, est similaire avant et après induction (Figure 44 A). La proportion des formes non phosphorylées et phosphorylées d'OdhI n'a donc pas évolué après l'élévation de la température à 39°C. En revanche, lorsqu'une élévation thermique de 33 à 43°C est appliquée à *C. glutamicum* 2262 NP, le pourcentage de la forme phosphorylée d'OdhI est de 45% à 33°C. Ce dernier reste constant après une heure d'induction à 43°C, puis diminue à 27% 3 heures après l'élévation de la température à 43°C (Figure 44 B).

La proportion entre la forme phosphorylée et la forme non phosphorylée d'OdhI chez le variant *C. glutamicum* 2262 NP après induction à 43°C, est similaire à celle observée chez *C. glutamicum* 2262 après induction à 39°C. Néanmoins la forme phosphorylée d'OdhI ne disparait qu'après 3 heures à 43°C pour le variant non producteur. Chez *C. glutamicum* 2262, la déphosphorylation d'OdhI est observée dès la première heure à 39°C, puis est totale après 3 heures à 39°C. Cependant nous avons montré dans le chapitre précédent que même si le variant *C. glutamicum* 2262 NP devient sensible et produit du glutamate suite à une induction à 43°C, cette production est négligeable 1 heure après l'induction et apparait tardivement. L'état de phosphorylation d'OdhI s'avère donc, une nouvelle fois, être en accord avec le déclenchement de la production du glutamate. En effet les deux formes d'OdhI sont encore bien présentes 1 heure après l'induction à 43°C, et aucune production du glutamate n'est observée. De même, suite à l'augmentation de la température de 33-39°C pour laquelle le variant est insensible, aucune production de glutamate n'est détectée et l'état de phosphorylation d'OdhI n'évolue pas. Les deux formes d'OdhI restent similaires avant, 1 heure et 3 heures après passage à 39°C.

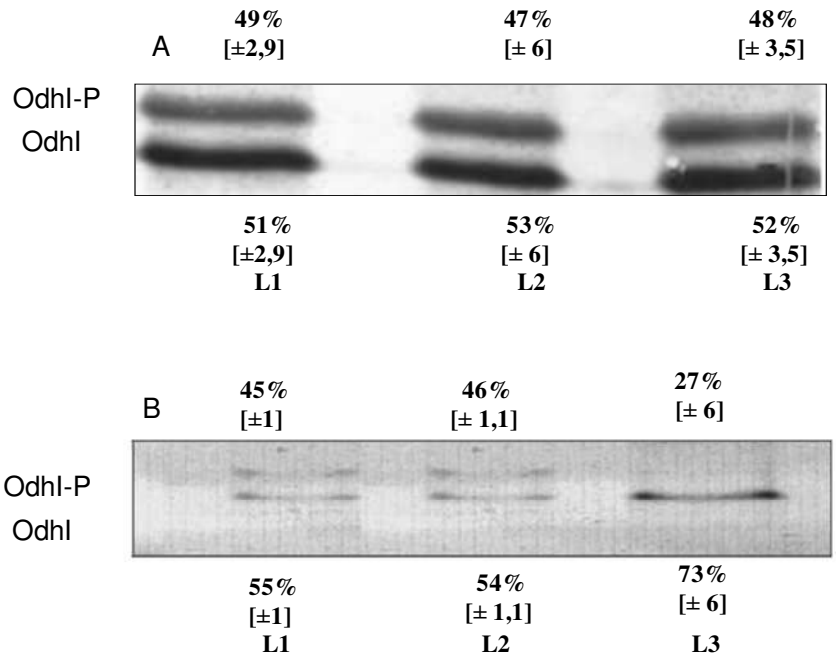


Figure 44 *:* **Analyse par Western blot des formes phosphorylées et non-phosphorylées d'OdhI dans des extraits acellulaires chez *C. glutamicum* 2262 NP suite à une élévation de température de 33 à 39°C**
(A) L1 culture de *C. glutamicum* 2262NP à 33°C, L2 et L3 culture de *C. glutamicum* 2262NP après une heure et trois heures à 39°C respectivement. **(B) L1** culture de *C. glutamicum* 2262NP à 33°C, **L2** et **L3** culture de *C. glutamicum* 2262 NP après une heure et trois heures à 43°C respectivement. 20 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE. Le pourcentage indique les concentrations relatives d'OdhI phosphorylée (bande supérieure du gel) et non phosphorylée (bande inférieure du gel) quantifiés par une méthode densitométrique en utilisant le logiciel Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). Toutes les cultures et les analyses ont été reproduites trois fois. Le test Student t donne un $P<0,05$ pour la comparaison du ratio OdhI/OdhI-P entre les échantillons analysés avant et après l'élévation de température.

Dans ce chapitre II, nous avons étudié deux procédés de production de glutamate (limitation biotine et choc de température) pour suivre l'évolution de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI. L'objectif de ce travail était de mettre en évidence un lien possible entre la production de glutamate et l'état de phosphorylation d'OdhI notamment lors d'un procédé thermo-induit. Nous avons déterminé, pour chaque souche et chaque condition de culture le ratio de la forme OdhI phosphorylée sur la forme OdhI non phosphorylée. Nous avons ainsi démontré que ce ratio évoluait de façon similaire lors des deux procédés (limitation biotine ou thermo-induction) de production du glutamate. En absence de production de glutamate, les formes phosphorylées et non phosphorylées sont présentes, alors qu'en phase de production de glutamate, le ratio d'OdhI-P/OdhI diminue. Chez *C. glutamicum* 2262, nous avons observé une disparition totale de la forme phosphorylée après 3 heures de culture à 39°C. La disparation de la forme phosphorylée semble être liée à la vitesse maximale de production du

glutamate. Par ailleurs chez le variant *C. glutamicum* 2262 NP, le ratio forme phosphorylée/ forme non phosphorylée n'évolue pas suite à une élévation de la température de 33 à 39°C. A cette amplitude de température, aucune production du glutamate n'est observée. Cependant lorsque le variant devient thermosensible (élévation de 33 à 43°C), une déphosphorylation est observée après 3 h à 43°C, ce qui correspond au moment de la culture où l'excrétion du glutamate est observée.

Des études récentes de Schultz *et al*. (2009) rapportent qu'OdhI est phosphorylée principalement par la protéine kinase PknG, mais que d'autres kinases interviennent chez *C. glutamicum* ATCC 13032 (Schultz *et al.*, 2009). Cependant la protéine kinase PknG n'est pas la kinase majoritaire chez *C. glutamicum* 2262, puisque le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* présente un profil d'état de phosphorylation similaire à celui de la souche de référence lors du procédé thermo-induit de 33 à 39°C. Il est probable, que la délétion du gène codant la protéine kinase PknG provoque l'induction des autres kinases telles que PknB, L ou A. Par ailleurs, chez ce mutant, la vitesse spécifique de croissance est légèrement affectée et la vitesse spécifique de production du glutamate augmente de 40% comparée à la souche référence. Parmi les protéines kinases identifiées chez *C. glutamicum* (PknA, PknB et PknL), trois sont transmembranaires et une seule est cytosolique (PknG). Quant à la phosphatase PPP, elle est aussi transmembranaire. Le domaine PASTA présumé "senseur" des kinases PknB et PknL est capable de reconnaître le peptidoglycane, suggérant ainsi que PknB et PknL contrôle l'état de la paroi cellulaire (Barthe *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2008). Barthe *et al*. (2010) rapportent que selon la dimérisation de ce domaine PASTA, ce dernier peut reconnaitre un ligand et permettre l'activation de la protéine kinase PknB (Barthe *et al.*, 2010). On peut donc émettre l'hypothèse que l'activation des protéines kinases PknB et PknL se fait grâce à leur domaine PASTA. Puis une fois activées, ces kinases pourraient à leur tour activer les autres kinases cytosoliques (PknG) ou dépourvues du domaine PASTA (PknA) ou encore des phosphatases. La déphosphorylation de la protéine OdhI par la phosphatase PPP induit l'inhibition de l'activité ODH, et le flux carboné est dévié pour la production du glutamate.

Nous pouvons imaginer, qu'un stimulus doit dans un premier temps franchir la mycomembrane, barrière en contact avec l'extérieur, puis atteindre le domaine PASTA des protéines kinases PknL ou PknB. Il est donc envisageable que la mycomembrane de *C. glutamicum* 2262 joue un rôle clé dans le ressenti du stress notamment du stress thermique. Dans le chapitre suivant, nous avons donc tenté de comprendre le rôle de cette mycomembrane dans les modifications intracellulaires et dans le ressenti du stress thermique.

Il est donc apparu opportun de mettre au point une stratégie de suppression de cette mycomembrane afin d'analyser l'effet de son absence sur les régulations intracellulaires aboutissant à l'excrétion du glutamate.

Chapitre III : Rôle de la mycomembrane dans la capacité de *Corynebacterium glutamicum* 2262 à excréter du glutamate lors du procédé thermo-induit de production de glutamate

I. Importance de la bicouche mycolique lors du procédé thermo-induit de production de glutamate chez *C. glutamicum* 2262

Cette partie du travail est présentée sous forme d'un projet de publication.

L'importance de la mycomembrane lors du procédé de production de glutamate est encore mal connue. Afin de préciser le rôle de cette mycomembrane, un mutant, *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, incapable de synthétiser des acides corynomycoliques et dépourvu de bicouche lipidique externe, a été construit. Pour construire ce mutant, une stratégie de remplacement allélique a été mis en œuvre au cours de laquelle le gène de la polyketide synthase (*pks13*), enzyme nécessaire à la synthèse des acides corynomycoliques, a été éliminé et remplacé par un gène de résistance à la kanamycine (*aph3*). Ce mutant sans mycomembrane a ensuite été analysé d'un point de vue cinétique et enzymatique au cours du procédé thermo-induit. Par ailleurs, un suivi de l'expression des protéines de stress et une analyse de la composition de l'enveloppe ont été effectués chez ce mutant et comparés avec ce qui est observé chez la souche parentale *C. glutamicum* 2262.

Importance of the corynomycolic acid bilayer for glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 during the temperature triggered producing process

Kenza-Amel Boulahya[1], Franck Grattepanche[1,3], Stéphane Delaunay[1], Marielle Tropis[2], Emmanuel Guedon[1], Joseph Boudrant[1], Mamadou Daffé[2] and Jean-Louis Goergen[1]

[1] Laboratoire Réaction et Génie des Procédés, UPR CNRS 3349, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy Université, 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[2] Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR CNRS 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

[3] present address: Laboratory of Food Biotechnology, Institute of Food Science and Nutrition, Schmelzbergstrasse 7, ETH Zentrum LFV C 16, 8092 Zürich, Switzerland

Abstract:

The role of the corynomycolic acid bilayer of *Corynebacterium glutamicum* 2262 during the temperature triggered glutamate producing process remains unclear. To give clues regarding the importance of this outer membrane, a mutant, *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, which is not able to synthesize corynomycolic acids have been constructed. This mutant, which exhibits a reduced growth rate compared to the wild type strain, lost the ability to produce glutamate. Contrary to the wild type strain, *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* was not able to sense the change in the culture temperature which induces the glutamate production: no over expression of thermal stress protein was determined. As a probable consequence, in the mutant strain, the ODHC activity was not reduced by the regulatory protein OdhI and no glutamate was excreted. The presence of the corynomycolate bilayer or one of its components is then crucial for the induction of the signal-transduction pathway leading to the production of glutamate by *C. glutamicum* 2262.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, glutamate, corynomycolic acid, outer membrane, oxoglutarate dehydrogenase, stress protein, OdhI

Introduction

Corynebacterium glutamicum has been used since 1957 for the production of glutamate (Kinoshita *et al.,*1957). Currently, the annual production of this amino acid reaches approximately 2,000,000 tons (Sano, 2009). The glutamate is mainly used as a flavour agent. It can be produced by cultivating *C. glutamicum* in a biotin deficient medium (Shiio *et al.,* 1962) or upon an addition in the culture medium of surfactant (Takinami *et al.,* 1965) or of antibiotics such as penicillin (Nunheimer *et al.,* 1970) or ethambutol (Radmacher *et al.,* 2005) or of cerulenin (an inhibitor of the fatty acid synthase complex) or, at last, by a temperature upshift (Delaunay *et al.,* 1999). Up to now, the precise cellular mechanisms responsible for the glutamate production remain unclear.

It was clearly demonstrated that glutamate efflux was correlated to a change in cell metabolism at the 2-oxoglutarate branch point (Kimura, 2002). The deletion of *odhA* in *C. glutamicum* ATCC 13869, encoding for the E1 subunit of oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) resulted in a glutamate production without induction (Nakamura *et al.,* 2006). Niebisch *et al*. (2006) have shown that ODHC activity was regulated through the phosphorylation status of OdhI. The decrease in the ratio phosphorylated form to unphosphorylated form of OdhI induced a dramatic reduction in the ODHC activity during the glutamate producing process using *C. glutamicum* 2262 (Boulahya et al., 2010).

As the layer of the cell envelope in contact with the external medium, the corynomycolic acid layer could play a crucial role in the transduction of an external signal such as a temperature increase, leading to the glutamate excrétion. It was previously postulated that the corynomycolate layer does not uniformly cover the cell surface (Kumagai *et al.,* 2005; Puech *et al.,* 2001). However, very recently, it was demonstrated that, as in Mycobacteria, the corynomycolic acid form an external membrane bilayer in the envelope of *C. glutamicum* (Zuber *et al.,* 2008). The structure and biosynthesis of mycolic acids have been intensively studied for many decades (Takayama *et al.,* 1979), but still little is known regarding the modulation of their composition in response to changes in the bacterial environment, especially a temperature variation. Very recently, an envelope lipids regulation factor was identified in *C. glutamicum* RES167 upon a heat shock from 30°C to 42 or 45°C (Meniche *et al.,* 2009). The transcription of this factor triggered an increase in the mycolic acid synthesis and a simultaneous decrease in the phospholipids synthesis. In the same work, a heat shock from 30 to 42°C was also shown to induce an increase in the ratio saturated mycolates to unsaturated mycolates which should provoke a modification in the fluidity of the outer

membrane. Simultaneously, an important variation in the mycolic acids to fatty acids ratio was observed.

Recent analysis showed that a larger number of genes in *Corynebacterium glutamicum* are differentially expressed under moderate (40°C) and severe (50°C) heat shock conditions, and this includes genes involved in cell wall biogenesis and lipid metabolism (Barreiro *et al.,* 2009). The response of *C. glutamicum* at heat stress from 33°C to 50°C for 7 min can be separated in two steps. A primary response sufficient for adaptation to moderate heat stress through the synthesis of chaperones (like Dnak, GrpE, DnaJ, ClpB or GroEL) and a drastic secondary response which is induced upon severe heat stress where proteases synthesis (ClpP1, ClpP2 and ClpC) might be essential to degrade protein aggregates, which cannot be refolded by chaperones (Barreiro *et al.,* 2005; Barreiro *et al.,* 2004; Engels *et al.,* 2004; Muffler *et al.,* 2002).

In this paper, we investigated the role of the corynomycolic acid bilayer on the intracellular regulations involved in the glutamate overproduction by *C. glutamicum* 2262 triggered by an increase in the culture temperature from 33 to 39°C. The glutamate excrétion, the ODHC activity, the OdhI phosphorylation status and the synthesis of stress proteins were compared between *C. glutamicum* 2262 and a mutant defective in corynomycolic acids production, during the glutamate producing process.

Materials and methods

Bacterial strains and medium composition

Strains used in this study were *Corynebacterium glutamicum* 2262 (biotin-auxotrophic) and *Corynebacterium glutamicum* 2262Δ*pks13* (see construction below).
The composition of the glutamate production medium was based on MCGC medium (Von der Osten *et al.,* 1989) in which citrate was replaced by deferoxamine (Delaunay *et al.,* 1999).
This medium consisted of: glucose (40 $g.l^{-1}$), Na_2HPO_4 (3 $g.l^{-1}$), KH_2PO_4 (6 $g.l^{-1}$), NaCl (2 $g.l^{-1}$), $(NH_4)_2SO_4$ (8 $g.l^{-1}$), $MgSO_4.7H_2O$ (0.4 $g.l^{-1}$), $FeSO_4.7H_2O$ (40 $mg.l^{-1}$), $FeCl_3$ (4 $mg.l^{-1}$), $ZnSO_4.7H_2O$ (1 $mg.l^{-1}$), $CuCl_2.2H_2O$ (0.4 $mg.l^{-1}$), $MnSO_4.H_2O$ (4 $mg.l^{-1}$), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (0.2 $mg.l^{-1}$), $Na_2B_4O_7.10H_2O$ (0.4 $mg.l^{-1}$), $CaCl_2$ (84 $mg.l^{-1}$), biotin (2 $mg.l^{-1}$), thiamine (20 $mg.l^{-1}$), deferoxamine (3 $mg.l^{-1}$) and glycine betaine (2 $g.l^{-1}$). In batch culture, this medium was supplemented with polypropylene glycol (1.3 gl^{-1}) used as anti-foaming agent.

Construction of *Corynebacterium glutamicum* 2262 Δ*pks13*

DNA extraction, amplification and restriction, analysis by agarose gel electrophoresis, and ligation were carried out according to standard procedures. Based on the partial *pks13* gene sequence of *C. glutamicum* 2262 (GenBank Accession Number DQ813498), primers pksdelf1/pksdelr1 and pksdelf2/pksdelr2 (Table 1) were designed to amplify two DNA fragments of 0.60 and 0.65 kb. These two fragments were inserted into plasmid pUC18 using *Hind*III/*Pst*I and *Sal*I/*Eco*RI as restriction sites. A kanamycin resistance cassette was then inserted between *Pst*I and *Sal*I to give plasmid pJP3. To protect pJP3 from restriction upon transformation of *C. glutamicum* 2262, this plasmid was methylated using co-electroporation with plasmid pAN1 (kindly provided by Dr. E.T. Papoutsakis) into *Escherichia coli* DH5ΔMCR (Mermelstein and Papoutsakis,1993; Schafer *et al.,*1994, Tauch *et al.,*1994; Vertes *et al.,* 1993). The resulting plasmid, pJP3M, was linearized with *Sca*I restriction enzyme and used to transform *C. glutamicum* 2262 competent cells according to (Van der Rest *et al.,* 1999). Three transformants were obtained on BHI plate containing kanamycin at 50 µg/ml. Allelic replacement was confirmed by PCR using the primers pairs: pksdelf1/kanr2, kanf1/pksdelr2 and pksdelf1/pksdelr2 (Table 1). The DNA of the wild type *C. glutamicum* 2262 was used as control.

Table 1: List of oligonucleotide primers. Restriction sites are underlined.

Name	Sequences (5'—>3')	Restriction enzyme
Pksdelf1	*CATAAGCTTATGGAACAGAGCCAATCGTCGGATC*	***Hind* III**
Pksdelr1	*GCACTGCAGGCGAGCGTACTCCAAAGCCTCCCAC*	***Pst*I**
Pksdelf2	*GAAGTCGACTCAGCGACCGCGATACCATGC*	***Sal*I**
Pksdelr2	*CGAGAATTCAGGGGCTTGCCCACGGTGAACGC*	***Eco*RI**
Kanf1	*CGACTGCAGATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAAGGATC*	***Pst*I**
Kanf2	*GCAGTCGACGTCGCGCGCGGTGAGCAC*	***Sal*I**

Cultures conditions

Glutamate production was triggered by a temperature upshock from 33 to 39°C. The precultures were performed in shake flasks at 33°C containing the modified MCGC medium, supplemented with Na_2HPO_4 (to reach 15 $g.l^{-1}$ as final concentration) and urea (1.9 $g.l^{-1}$). The glucose concentration was diminished to 34 $g.l^{-1}$ and pH initially set 7.6 with NaOH. The initial inoculum was pre-cultured overnight. Then 6 ml of this overnight culture were used to inoculate a second culture and 50 ml of this second culture were used to inoculate a 2 l bioreactor (Applikon, France) containing 1.5 l of modified MCGC. The pH set point was 7.6 regulated with NH_3 9 N. When the biomass concentration reached 1 $g.l^{-1}$, corresponding to the exponential growth phase, the culture temperature was increased to 39°C to induce glutamate excrétion. To prevent oxygen limitation, the dissolved oxygen was controlled at 20% of the saturation level by increasing agitation and air flow rate all over the culture.

Analytical methods

During cultivation, samples were collected to determine biomass, glucose and glutamate concentrations. The cell concentration was determined by absorbance at 570 nm (Hitachi 2000, Japan) and by gravimetric method. After centrifugation of culture samples (13.000 rpm, 5 min at room temperature, Beckman, Avanti™ 30), titers of glutamate and glucose in the culture supernatant were determined enzymatically (r-Biopharm, Germany). Protein concentrations were assayed according to the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Enzyme assays

Cells collected from the culture were harvested (7000 rpm, 10 min at 4°C, Beckman, Avanti™ 30), then resuspended in N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES)-NaOH buffer (100mM, pH 7.7) containing 30% ($v.v^{-1}$) glycerol. Cells, kept in ice during treatment, were disrupted by sonication (40 kHz, 8 cycles of 30s and 90s spaced out). The cell debris were removed by centrifugation at 4°C for 10 min at 10.000 rpm (Beckman, , Avanti™ 30). Therefore, a gel filtration was performed at 4°C on a PD10 column (LKB-Pharmacia). The supernatant was rapidly used for the assay of ODHC and pyruvate dehydrogenase complex (PDHC). PDHC and ODHC were assayed at 30°C spectrophotometrically (Beckman DU 7500). Activities were determined by following the production of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride) (INT-formazan, ε=12.4 $m.M^{-1}.cm^{-1}$), an artificial electron acceptor, at 500 nm (Hinman and Blass, 1981) or of 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (APADH, ε=9.02 mM^{-1} cm^{-1}) at 365 nm (Shiio and Ujigawa-Takeda, 1980). To avoid PDHC and ODHC overestimation, endogenous activity was quantified without pyruvate or oxoglutarate, respectively.

Lipids extraction and analysis

Cells collected from the culture using *C. glutamicum* 2262 or *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* were harvested (7, 000 rpm, 10 min, 4°C, Beckman Avanti™ 30) washed twice in KCl (9 $g.l^{-1}$) and stored at -80°C. The lipids (extractible and non-extractible corynemycolic and fatty acids) were obtained from cells of *C. glutamicum* 2262 or of 2262 Δ*pks13* using a (1:2, $v.v^{-1}$) mixture of chloroform/methanol and analyzed as described by Meniche *et al.* (2009).

Western blot analysis

Cells from 45 ml samples were harvested, washed with 0.9% KCl, and resuspended in 2 ml phosphate-buffered saline buffer (100 mM, pH7) containing complete EDTA-free protease inhibitor (one lozenge anti protease resuspended in buffer phosphate (NaH_2PO_4, pH 7, 100 mM) 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 1mM diisopropylfluoro-phosphate (Sigma-Aldrich). The cells kept in ice during the treatment were disrupted by sonication (40 kHz, 3 cycles of 30s and 60s spaced out). The cell debris were removed by centrifugation for 20 min at 18,000 g, and the supernatant was used for Western Blotting. Twenty micrograms

of proteins were analyzed to determine the OdhI phosphorylation status as previously described (Schultz *et al.,* 2007). The relative amounts of phosphorylated and unphosphorylated OdhI were quantified by a densitometric method using Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). The results were analyzed by a Student's t-test (Statbox pro software (v. 6.2) available at www.grimmersoft.com).

Proteome analysis

Cells collected from the culture were harvested (7000 rpm, 10 min at 4°C, Beckman Avanti^{TM} 30), resuspended in N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid-NAOH buffer (100mM, pH 7.7) containing 30% (v.v^{-1}) glycerol. Cells, kept in ice during treatment, were disrupted by sonication (40 kHz, 8 cycles of 30s and 90s spaced out). The cell debris were removed by centrifugation at 4°C for 10 min at 10.000 rpm. Therefore, a gel filtration was performed at 4°C on a PD10 column (LKB-Pharmacia). Four hundred micrograms of proteins were resuspended in one volume pure water, and then 5 volumes of acetone were added. These proteins were stored at -20°C (at least 2 hours), then centrifuged for 20 min, at 4°C, 13000 rpm. The proteins were resuspended in the lysis buffer (5.8 g urea, 0.5 g CHAPS, 6 ml water and 5 mg.ml^{-1} DiThioThreitol which were added extemporarily).
Analysis of stress proteins was realized by two-dimensional gel electrophoresis. 400 □g proteins were deposed on a precast immobilized pH gradient strip with a linear pH gradient from 4 to 7. After the isoelectric focusing step, the second dimension was carried out as described by Herman *et al*. (2000). The gel was stained with Coomassie Blue G-250 (Coomassie G-250 0.1 g.l^{-1}, methanol 40%, acetic acid 7.5%). The identification of the stress proteins visualized on the two-dimensional gel was acquired by comparison with *C. glutamicum* ATCC13032 proteomic maps (Bendt *et al.,* 2003; Hermann *et al.,* 2000; Schaffer *et al.,* 2001).

Results

3.1-Influence of a temperature increase on the growth, glucose consumption, glutamate production of *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum 2262* Δ*pks13*.

C. glutamicum 2262 and the derivative mutant strain *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* were grown in MCGC medium with glucose as sole carbon source and with a biotin excess (2 mg.l^{-1}). During cultures, growth, glucose consumption and glutamate production were investigated and compared between the two strains (Fig.1). In these batch cultures, the culture temperature

was increased from 33 to 39°C during the exponential growth phase (after 3 and 25 h culture at 33°C for *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* respectively).

When the wild-type strain and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* were cultivated at 33°C, the specific growth rate increased and reached a maximum value of 0.6 h^{-1} and 0.1h^{-1} after 3h and 25h culture respectively. During this period, no glutamate was produced by both strains. The maximal biomass concentration, *i.e.* 8 $g.l^{-1}$ and 2 $g.l^{-1}$ for *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* respectively, was reached after 12 and 39 hours of culture. The shift towards glutamate producing behaviour occurred at a biomass concentration of 1$g.l^{-1}$ and was followed by a decrease in the specific growth rates for both strains. No more growth was observed for *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* mutant 15h after the temperature increase. Three hours upon the temperature shift, the specific rate of glutamate production reached a maximum of 0.48 $g.g^{-1}h^{-1}$ in the wild-type strain. This value then decreased to reach 0.3 $g.g^{-1}.h^{-1}$ at the end of the culture. With *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13,* no glutamate was accumulated in the culture medium. The concentration of the main co-product, lactate, reached 1.5 $g.l^{-1}$ for the both strains at the end of the culture (data not show). The glucose was exhausted during the culture with the wild-type strain (Fig 1A). The specific rate of glucose consumption reached 1.1 $g.g^{-1}.h^{-1}$ during the growth phase at 33°C and remained constant at this maximal value for 3 h after the temperature shift. The sugar consumption rate further decreased progressively to reach 0.8 $g.g^{-1}h^{-1}$at the end of the glutamate producing phase. During culture with *C. glutamicum* 2262 *Δpks13*, glucose was not entirely consumed. The specific rate of glucose consumption reached 0.65 $g.g^{-1}h^{-1}$ (Fig 1B) and decreased immediately after the change in the culture temperature. At the end of the process this specific rate of glucose consumption was only 0.1 $g.g^{-1}h^{-1}$.

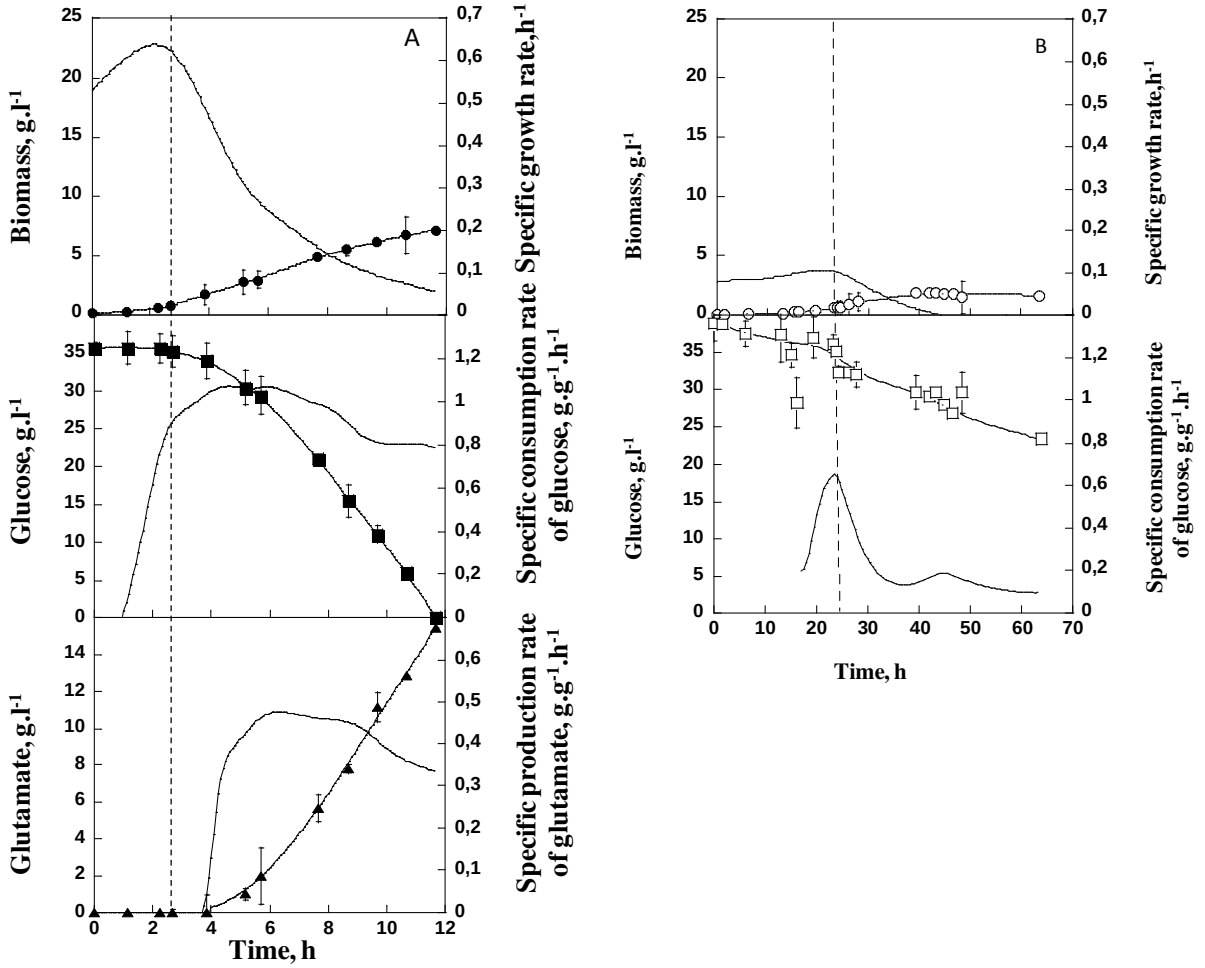


Figure 1: Effect of a temperature shift on the concentrations of biomass (●, ○), glucose (■, □) and glutamate (▲), and on the specific rates of growth, glucose consumption and glutamate production in *C. glutamicum* 2262 (A) and *C. glutamicum* 2262Δ*pks13* (B). The vertical dashed line indicates the time when the temperature was increased from 33°C to 39°C.

3.2-Analysis of the lipids extractible and covalently bound to the cell wall in *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*

As envelope composition was shown to be modified after a heat shock from 30 to 42°C in *C. glutamicum* RES167 (Meinche *et al.,* 2009), it was interesting to analyze the lipid composition of the wild-type strain and the Δ*pks13* mutant during the glutamate producing process triggered by an only 6°C increase in the medium temperature. *C. glutamicum* is known to synthesize different classes of corynomycolates, mainly $C_{32:0}$, $C_{34:0}$, $C_{34:1}$ and to a lesser extent $C_{36:2}$, $C_{36:1}$ and $C_{36:0}$. In this study, we focused on the main corynomycolates (Table2).

At 33°C, the ratio satured extractible corynomycolates ($C_{32:0}$, $C_{34:0}$) to unsatured extractible corynomycolates ($C_{34:1}$) (rMA) was 9.5 ± 2.3 for the wild type strain. No corynomycolate was detected in *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* which confirmed the inactivation of the *pks13* gene in this mutant strain. The shift to 39°C had a dramatic effect on the ratio saturated ($C_{32:0}$ and $C_{34:0}$) to unsaturated ($C_{34:1}$) mycolates (saturated MA/unsaturated MA = 18.6 ± 2 and 22.7 ± 0, after 1h and 3h at 39°C respectively, see Table 2). Regarding the corymycolates bound to the cell wall, the change in the ratio satured corynomycolates to unsatured corynomycolates was similar for the wild-type strain (data not shown). These changes in ratios were due to an increase in the saturated corynomycolates part. The modification in the MA composition was not the only change induced by the temperature change, a variation in the MA to fatty acids (FA) ratio was determined as well. This ratio represents the amounts of trehalose dicorynomycolates (TDCM) plus trehalose monocorynomycolates (TMCM) relative to glycerophospholipids (GPL). It increased about three times (MA/FA= 0.74 ± 0 at 33°C, MA/FA = 2 ± 0.4 after 3h at 39°C) for extractible lipids in the wild-type strain (Table 2).

As can be seen in Table 2, in *C. glutamicum* 2262, the ratio extractible saturated FA (C_{16}) to extractible unsaturated FA ($C_{18:1}$) increased by a factor 1.6 when the culture temperature was increased. No significant difference was determined with the lipids bound to the cell wall. In the same way, when the temperature was changed from 33°C to 39°C in the culture with *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, the ratio satured FA to unsaturated FA was increased about two times from 33°C to 3h at 39°C (satured FA/unsatured FA = 2.6 ± 0.1 and satured FA/unsatured FA = 5.4 ± 0 at 33°C and after 3h at 39°C respectively).

Table 2: Analysis of the extractible lipids from the cell wall of *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262Δ*pks13* cultivated in MCGC. Each ratio was determined from at least two independent experiments.FA: fatty acid, MA: mycolic acid, ND : not detected

C. glutamicum strain	Saturated FA/unsaturated FA ($C_{16}/C_{18:1}$)	Saturated MA/unsaturated MA ($C_{32}+C_{34}/C_{34:1}$)	MA/FA
2262 (33°C)	**0.76 ± 0.3**	**9.5 ± 2.3**	**0.74 ± 0**
2262 (1h at 39°C)	**1.18 ± 0.0**	**18.6 ± 2.0**	**1.75 ± 0.6**
2262 (3h at 39°C)	**1.17 ± 0.0**	**22.7 ± 0.0**	**2.0 ± 0.4**
2262Δ*pks13* (33°C)	**2.6 ± 0.1**	**ND**	**ND**
2262Δ*pks13* (1h at 39°C)	**2.5 ± 0.1**	**ND**	**ND**
2262Δ*pks13* (3h at 39°C)	**5.4 ± 0**	**ND**	**NE**

3.3-Influence of the temperature shift on the synthesis of stress proteins in *C. glutamicum 2262 and 2262 Δpks13*

The induction of heat shock proteins (HSP) is considered as an important protective response to temperature and environmental stress in all organisms. In this study, we compared the HSP profiles of *C. glutamicum* 2262 and 2262 Δ*pks13* cultivated on MCGC with a temperature increase from 33 to 39°C.

Equal amounts of proteins were separated on 2D gel. The analysis revealed some differences in spots intensity between cells collected at 33°C and cells collected at 39°C for *C. glutamicum* 2262. As shown in Fig 2A, the expression level of three proteins in the wild-type strain was increased after 3h at 39°C. These three spots were identified as three HSP, DnaK, GroEL and EFTU. On the contrary in the same culture condition, no difference in spots intensity was noticed with *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* (Fig 2B).

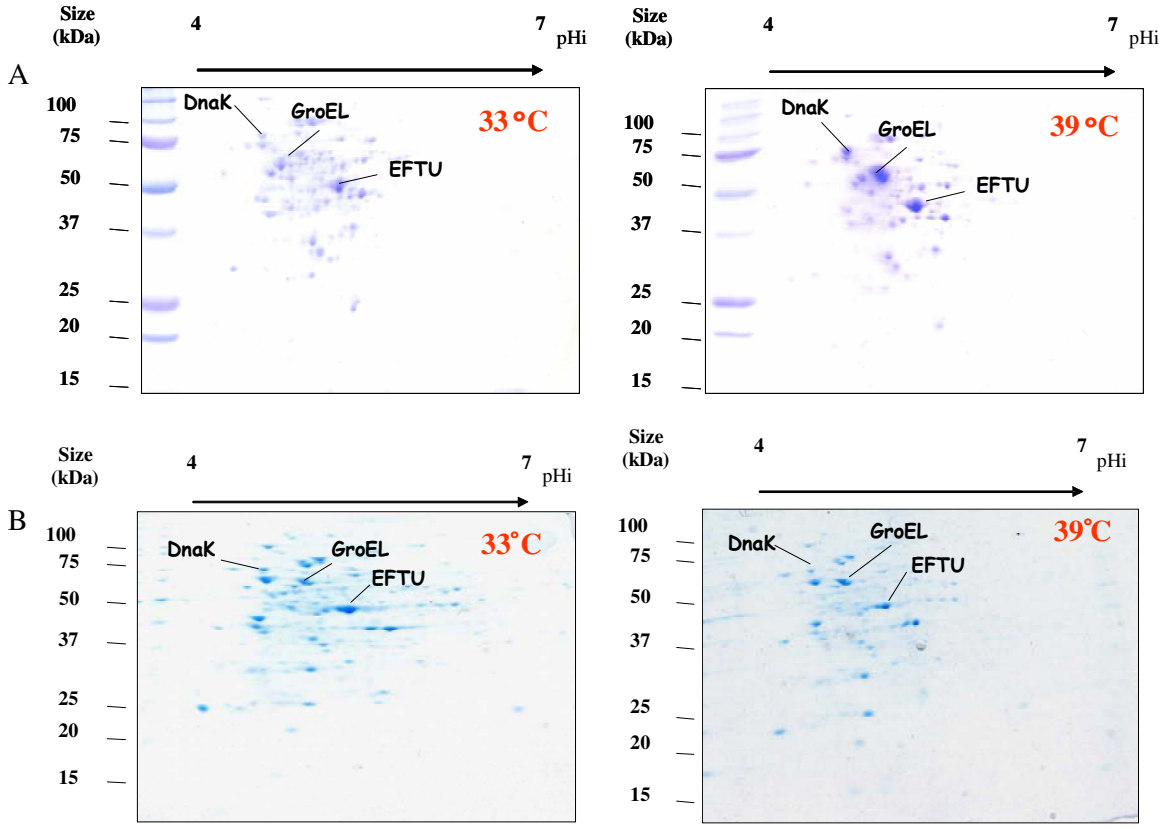


Figure 2: Effect of a temperature shift from 33 to 39°C on the proteome (soluble proteins) of *C. glutamicum* 2262 (A) and *C. glutamicum* 2262Δ*pks13* (B). DnaK, GroEL and EFTU were identified by comparison with *C. glutamicum* ATCC13032 proteomic maps (Hermann *et al.,* 2003; Bendt *et al.,* 2003). All cultures and analyses were performed in duplicate.

3.4-Influence of a temperature shift on the ODHC and PDHC activities in *C. glutamicum* 2262 and 2262 Δ*pks13*.

The specific activities of two enzymes involved in the glutamate synthesis pathway, PDHC and ODHC, were assayed during the temperature triggered glutamate producing process with *C. glutamicum* 2262 and 2262 Δ*pks13*.

When the wild type strain was cultivated at 33°C, ODHC displayed an activity around 4± 1.4 $nmol^{-1}.min^{-1}.mg^{-1}$ of protein, then 1 hour after the increase in the culture temperature, a dramatic decrease (0.35± 0.7 $nmol^{-1}.min^{-1}.mg^{-1}$) was determined and, 3 hours after the temperature shift, the ODHC acticity was undetectable. A similar pattern was observed for the PDHC activity but the decrease was not so drastic. At 33°C, PDHC displayed an activity around 19± 2.5 $nmol^{-1}$ $min^{-1}.mg^{-1}$ of protein, 1hour after the temperature shift, the activity decreased rapidly to reach 10 ± 1.7$nmol^{-1}$ $min^{-1}.mg^{-1}$ of protein and 7 ± 1 $nmol^{-1}$ $min^{-1}.mg^{-1}$ of protein 3 hours after the temperature shift (Table 3).

As shown in Table 3, at 33°C, a similar ODHC activity around 4± 1$nmol^{-1}$ $min^{-1}.mg^{-1}$ of protein was determined in *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Contrary to the wild type strain, this activity remained at a similar level, 3.5 ±1 and 3 ± 2.5 $nmol^{-1}$ $min^{-1}.mg^{-1}$ of protein 1h and 3h after the temperature shift to 39°C respectively. Concerning the PDHC activity, an increase was determined after the change in the culture temperature. Whereas at 33°C, the PDHC activity was 10 ± 2.5 $nmol^{-1}min^{-1}.mg^{-1}$ of protein, it reached 18 ± 5 $nmol^{-1}min^{-1}.mg^{-1}$ of protein after 1hour at 39°C, and 15± 1.8 $nmol^{-1}min^{-1}.mg^{-1}$ of protein, after 3 hours at 39°C. Thus, in *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, the ODHC and PDHC activities were not significantly affected by the temperature increase and remained at high levels even 3 hours after the temperature shift.

Table 3: PDHC and ODHC activities during the temperature triggered glutamate producing process using *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, at 33°C and 1 or 3 h after the increase in the culture temperature to 39°C. All cultures and enzymatic assays were performed in triplicate

	ODHC (nmol/min.mg protein)			PDHC (nmol/min.mg protein)		
	33°C	39°C (1h)	39°C (3h)	33°C	39°C (1h)	39°C (3h)
C. glutamicum 2262	**4 [+/-1.4]**	**0.35[+/-0.7]**	**0[+/-0]**	**19[+/-2.5]**	**10[+/-1.7]**	**7[+/-1]**
C. glutamicum 2262Δ*pks13*	**4[+/-1]**	**3.5[+/-1]**	**3[+/-2.5]**	**10[+/-2.5]**	**18[+/-5]**	**15[+/-1.8]**

3.5-Influence of a temperature increase on the phosphorylation status of OdhI in C. glutamicum 2262 and 2262 Δpks13

In a previous study (Niebisch *et al.,* 2006), it was shown that the OdhI protein of *C. glutamicum* acted as an inhibitor of ODHC activity in its unphosphorylated state by interacting with the E1 subunit, OdhA. As ODHC plays a key role in the induction of glutamate excrétion, it was interesting to analyze the effect of the *pks13* gene deletion on the OdhI phospholylation during the temperature triggered glutamate producing process. Samples of the cultures were collected at 33°C and 39°C, and equal amounts of protein were used for western blot analysis.

As shown in Fig 3, two immunoreactive protein bands were observed with anti-OdhI antibodies in extracts from *C. glutamicum* 2262 cells. It was observed that, in the wild type strain, the phosphorylated form of OdhI was present at 33°C, then decreased 1 hour after the increase in temperature and became almost undetectable 3 hours after the temperature shift whereas the unphosphorylated form was accumulated during the same period.

As shown in Fig 3, in *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* the pattern of the ratio phospholyrated form to unphosphorylated form was very different. In this mutant strain, no variation in the ratio was determined between 33 and 39°C.

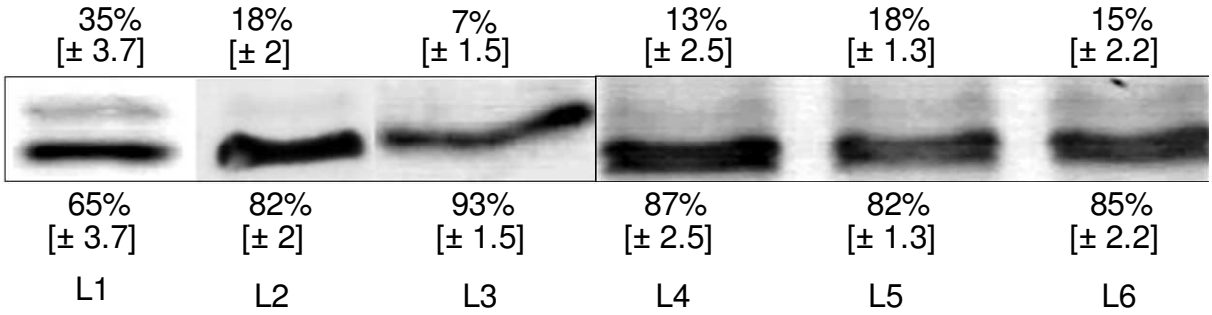


Figure 3: Western blot analysis of phosphorylated and unphosphorylated OdhI in crude cell-free extracts of *C. glutamicum* 2262 (L1, L2, and L3) and 2262 Δ*pks13* (L4, L5 and L6) cultivated in MCGC medium before (L1 and L4, 33°C) and 1h(L2 and L5) or 3h (L3 and L6) after a temperature shift to 39°C. Percentage values indicate relative amounts of phosphorylated (upper band) and unphosphorylated (lower band) OdhI quantified by a densitometric method using Bio-Profil software (Vilbert-Lourmant, France). All cultures and western blot analyses were performed in triplicate. A Student t test gave P-value < 0.05 for all comparisons of OdhI/OdhI-P ratios between samples at 33°C and 39°C. 20 µg protein of *C. glutamicum* 2262 and 2262 Δ*pks13* were deposed in gel electrophoresis.

Discussion

To evaluate the importance of corynomycolic acid layer during the temperature triggered glutamate production using *C. glutamicum* 2262, kinetics, PDHC and ODHC specific activities, OdhI phosphorylation status and expression of HSP were compared between *C. glutamicum* 2262 and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. The GC analysis of the cell envelope confirmed the complete absence of corynomycolates in the mutant strain. Gebhardt *et al.* (2007) established that the absence of mycolates had no influence on the production and structural features of the cell wall arabinogalactan. One can then presume that the only change in the cell envelope of *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* was the lack in the corynomycolic acid bilayer.

Recently, it has been shown that the mycolic acids are essential for the growth of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*, and important but not indispensable to the survival of *C.glutamicum* (Portevin *et al.,* 2004; Tropis *et al.,* 2005). Our results confirmed that the presence of *pks13* gene, and as a consequence of MA, is not essential for the survival of *C. glutamicum* 2262*;* nevertheless the growth (0.1 h^{-1} instead of 0.6 h^{-1} for the reference strain) and the glucose consumption were dramatically affected by the absence of mycolates. A major result of our work was the demonstration that *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* was unabled to produce glutamate suggesting that mycolic acids layer could be crucial for an efficient glutamate production.

In the cellular envelope of *C. glutamicum*, two lipid bilayers may be affected by an increase in the culture medium temperature, the plasmic membrane and the corynomycolate bilayer. Concerning the plasmic membrane, the influence of a 6°C increase on the saturated to unsaturated FA ratio (extractible FA) in *C. glutamicum* 2262 was previously studied during a fed-batch process (Gourdon, 1999). It was shown that this ratio increased by a factor 7.3 at the end of a 24h-culture. However, the ratio saturated to unsaturated FA was 2.5 fold increased when the glutamate yield was maximal (0.6 $g.g^{-1}$), after 3hours at 39°C. This result is in agreement with the results presented in our study, during a batch process, where the $C_{16:0}/C_{18:1}$ ratio increased by a factor of 1.6 after 3h of culture at 39°C. When a similar determination was carried out with *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, the $C_{16:0}/C_{18:1}$ ratio also increased by a factor 2 after 3h of culture at 39°C. These results suggested that the temperature increase has a similar effect on the $C_{16:0}/C_{18:1}$ ratio in both strains even though *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* was unable to produce glutamate. The modification in this ratio appeared to be rather

a consequence of the temperature increase than of the physiological changes which led to the glutamate production.

At the level of the corynomycolate bilayer, the 6°C increase in the culture medium temperature induced in *C. glutamicum* 2262 a raise in the saturated MA to unsaturated MA ratio by a factor 2.4. It is well known that in various *Mycobacterium* species the MA composition is affected by the change in the growth temperature (Baba *et al.,* 1989; Kremer *et al.,* 2002; Toriyama *et al.,* 1980). Very recently, it was shown that, in *C. glutamicum* RES167 cultivated at 42°C, the saturated MA to unsaturated MA ratio was 3.88±0.27 instead of 1.04 ± 0.1 when the strain was grown at 30°C (Meniche *et al.,* 2009). Our study confirms that the culture temperature clearly impacts the MA composition. Moreover, *C. glutamicum* is able to adjust very rapidly the MA composition in its cellular envelope since the variation we determined occurred only 1 h after the change in the culture medium temperature. Overproduction of glutamate by *C. glutamicum* may be induced by different treatments. Using some of these treatments, changes in corynomycolic acids synthesis were determined. For instance, (Hashimoto *et al.,* 2006) showed that the cellular content in corynomycolic acids decreased under biotin limitation or after the addition in the culture medium of specific detergents, sub-lethal amounts of penicillin or cerulenin. Radmacher *et al*. (2005) reported that the content of mycolic acid was reduced in *C. glutamicum* ATCC13032 treated with ethambutol to induce glutamate excrétion. Modification of MA composition was not the only change induced by the temperature increase; an important variation in the MA/FA ratio was also observed. This ratio, which represents the amounts of TDCM and TMCM relative to GPL, increased 2 fold when glutamate excrétion was triggered by increasing the culture temperature from 33°C to 39°C. A similar variation in the MA/FA ratio was recently observed in *C. glutamicum* RES167. When this strain was transitorily cultured at 42°C instead of 30°C, this ratio was seven times increased (Meniche *et al.,* 2009). Taken together, these results indicate that the 6°C temperature upshock applied the glutamate producing process was accompanied by structural changes of corynomycolic acid layer.

A well-known effect of an increase in the culture temperature is the induction of the transcription of thermal stress proteins. One of the main roles of these proteins is to maintain the protein folding. The induction of the glutamate production in *C. glutamicum* 2262 by the temperature shift from 33 to 39°C led to a higher synthesis level of several proteins. Three of them were identified using a comparison with proteomic maps from *C. glutamicum* ATCC 13032. Two were chaperone proteins (DnaK, GroEL) and the third one, an elongation factor (EFTU). The temperature increase applied during the glutamic acid production process can be

considered as a moderate heat shock (Barreiro *et al.,* 2009). Application of such a temperature increase on *C. glutamicum* ATCC13032 induced the overexpression of DnaK, GroEL1 and GroEL2 among several proteins (Barreiro *et al.,* 2005; Barreiro *et al.,* 2009). The genes coding for these 3 proteins belong to SigH regulon, *dnaK* is also included in the HspR regulon and *groEL1* and *groEL2* in HrcA regulon in *C. glutamicum* R (Yukawa *et al.,* 2007). These 3 regulators are responsible for the transcriptional modifications observed after an increase in the temperature culture medium in *C. glutamicum* (Ehira *et al.,* 2009). Up to now, no change in EFTU expression or transcription was determined in the heat shock response in *C. glutamicum*. However, EFTU, in addition to its role in the translation, exhibited a chaperone property in *Escherichia coli* suggesting that it might be involved in protection from stress (Caldas *et al.,* 1998). Interestingly and contrary to *C. glutamicum* 2262, no change was observed between the two proteomic maps from *C. glutamicum* 2262 *Δpks13* at 33 and 39°C. These results suggest that *C. glutamicum* 2262 *Δpks13* was unable to sense the temperature increase. As a consequence, the presence of the corynomycolic acids layer, or one of its components, appears to be crucial for the sensing of some environmental changes such as the culture temperature. The sensing of temperature has been studied in various micro-organisms. It often involves a two-component system (TCS) (Mascher *et al.,* 2006). In *Bacillus subtilis*, the DesK/DesR system is able to sense changes in culture temperature through modification in the plasmic membrane fluidity (Albanesi *et al.,* 2004). 13 genes pairs coding for TCS systems have been identified in *C. glutamicum* genome (Kocan *et al.*, 2006). None of those which have been described are involved in the temperature sensing. MtrAB is involved in the osmoprotection and cell wall biosynthesis (Brocker and Bott, 2006; Kramer, 2009; Möker *et al.,* 2004) PhoRS in the regulation of the consequences of a phosphate starvation (Kocan *et al.,* 2006) and CitAB in the citrate concentration sensing (Brocker *et al.,* 2009). The presence of a similar system in the outer membrane of *C. glutamicum* 2262 could explain the lack of temperature sensing in the corynomycolate layer defective mutant. However, the sensitive part of TCS is usually located in the plasmic membrane or in the periplasm, to our knowledge, such systems have not been identified to date in the mycolate layer. Very recently Ncgl2775, an ortholog of Rv3802 from *Mycobacterium smegmatis*, was identified in *C. glutamicum* RES167 (Meniche *et al.,* 2009). The authors suggested that this protein was membrane anchored. Its activation, which occurred under heat stress conditions, was correlated with an increase in the mycolic acids biosynthesis and a concomitant decrease in the glycerophospholipids synthesis. These modifications led to a remodelling of the outer

membrane. A similar temperature induced protein might be involved in the regulation cascade leading to the glutamate excrétion in the temperature sensitive *C. glutamicum* 2262.

The glutamate excrétion is correlated with an attenuation of the ODHC activity leading to an increase in the carbon flow towards the glutamate synthesis (Kawahara *et al.,* 1997). Recently, the regulation of the ODHC activity in the glutamate producing *C. glutamicum* strains was elucidated including the temperature sensitive *C. glutamicum* 2262 (Boulahya *et al.,* 2010). This mechanism involved the regulatory protein OdhI (Niebisch *et al.,* 2006). When dephosphorylated by protein kinases (Fiuza *et al.,* 2008; Schultz *et al.,* 2007), OdhI strongly inhibits the ODHC activity. As expected, in *C. glutamicum* 2262, ODHC activity was dramatically decreased after the increase in the culture temperature. A simultaneous raise in the OdhI unphosphorylated form was determined. On the contrary, in *C. glutamicum* 2262 Δ*pks 13*, no change in the enzyme activities and in the phosphorylation status of OdhI was observed in the absence of the corynomycolic acid bilayer.

In summary, the presence of corynomycolic acid bilayer appears to be necessary for the induction of the glutamate production by *C. glutamicum* 2262. The lack of temperature sensing in the absence of this bilayer suggests that a temperature sensor could be located in the outer membrane. When the bacterium is able to sense the change in the culture temperature, the ODHC activity is dramatically reduced through its regulation by the unphosphorylated form of OdhI. This reduction in ODHC activity is then responsible for the deviation of the carbon flow toward the synthesis of glutamate. Some steps of the hypothetical signal-transduction pathway leading to the glutamate excrétion remain unclear. To date, the temperature sensor is not identified and the mechanisms occurring between the sensing of the environmental change and the phosphorylation of OdhI by protein kinases have to be elucidated. These two points constitute the perspectives of this work.

Acknowledgements:

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through the “Corypar” project (ANR-05-JCJC-0069-01).

References

Albanesi D., M. C. Mansilla et D. de Mendoza (2004) The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator J Bacteriol **186:** 2655-2663.

Baba T., K. Kaneda, E. Kusunose, M. Kusunose et I. Yano (1989) Thermally adaptive changes of mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis* J Biochem **106:** 81-6.

Barreiro C., E. González-Lavado, S. Brand, A. Tauch et J. F. Martín (2005) Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone J Bacteriol **187:** 884-9.

Barreiro C., E. González-Lavado, S. Brand, A. Tauch et J. F. Martín (2005) Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone J Bacteriol **187:** 884-9.

Barreiro C., D. Nakunst, A. T. Huser, H. D. de Paz, J. Kalinowski et J. F. Martin (2009) Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum* Microbiology **155:** 359-72.

Bendt A. K., A. Burkovski, S. Schaffer, M. Bott, M. Farwick et T. Hermann (2003) Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum* Proteomics **3:** 1637-46.

Boulahya K. A., E. Guedon, S. Delaunay, C. Schultz, J. Boudrant, M. Bott et J. L. Goergen (2010) OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum* Appl Microbiol Biotechnol **87:** 1867-74.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem **72:** 248-54.

Brocker M. et M. Bott (2006) Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum* FEMS Microbiol Lett **264:** 205-12.

Brocker M., S. Schaffer, C. Mack et M. Bott (2009) Citrate utilization by *Corynebacterium glutamicum* is controlled by the CitAB two-component system through positive regulation of the citrate transport genes citH and tctCBA J Bacteriol **191:** 3869-80.

Caldas T. D., A. El Yaagoubi, M. Kohiyama et G. Richarme (1998) Purification of elongation factors EF-Tu and EF-G from *Escherichia coli* by covalent chromatography on thiol-sepharose Protein Expr Purif **14:** 65-70.

Delaunay S., P. Gounon, P. Lapujade, E. Mailly, E. Oriol, J.-M. Engasser, N. D. Lindley et J.-L. Goergen (1999) An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum* Enz Microbiol Technol **25:** 762-768.

Ehira S., H. Teramoto, M. Inui et H. Yukawa (2009) Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA J Bacteriol **191:** 2964-72.

Engels S., J. E. Schweitzer, C. Ludwig, M. Bott et S. Schaffer (2004) clpC and clpP1P2 gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH Mol Microbiol **52:** 285-302.

Fiuza M., M. J. Canova, I. Zanella-Cleon, M. Becchi, A. J. Cozzone, L. M. Mateos, L. Kremer, J. A. Gil et V. Molle (2008) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division J Biol Chem **283:** 18099-112.

Gebhardt H., X. Meniche, M. Tropis, R. Kramer, M. Daffe et S. Morbach (2007) The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in Corynebacterineae Microbiology **153:** 1424-34.

Gourdon P. (1999). Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: Quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production L'institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse Toulouse.

Hashimoto K., H. Kawasaki, K. Akazawa, J. Nakamura, Y. Asakura, T. Kudo, E. Sakuradani, S. Shimizu et T. Nakamatsu (2006) Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* Biosci Biotechnol Biochem **70:** 22-30.

Hermann T. (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria J Biotechnol **104:** 155-72

Hermann T., M. Finkemeier, W. Pfefferle, G. Wersch, R. Kramer et A. Burkovski (2000) Two-dimensional electrophoretic analysis of *Corynebacterium glutamicum* membrane fraction and surface proteins Electrophoresis **21:** 654-9.

Hinman L. M. et J. P. Blass (1981) An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates J Biol Chem **256:** 6583-6

Kawahara Y., K. Takahashi-Fuke, E. Shimizu, T. Nakamatsu et S. Nakamori (1997) Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum* Biosci Biotechnol Biochem **61:** 1109-12.
coryneform bacteria J Biosci.

Kimura E. (2002) Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in Bioeng **94:** 545-51.

Kinoshita Y., S. Udaka et M. Shimono (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol **3:** 193-205.

Kocan M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch et M. Bott (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response J Bacteriol **188:** 724-732.

Kramer R. (2009) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection
Amino Acids **37:** 487-97.

Kremer L., Y. Guerardel, S. S. Gurcha, C. Locht et G. S. Besra (2002) Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile* Microbiology **148:** 3145-54.

Kumagai Y., T. Hirasawa, K. Hayakawa, K. Nagai et M. Wachi (2005) Fluorescent phospholipid analogs as microscopic probes for detection of the mycolic acid-containing layer in *Corynebacterium glutamicum*: detecting alterations in the mycolic acid-containing layer following ethambutol treatment Biosci Biotechnol Biochem **69:** 2051-6.

Mascher T., J. D. Helmann et G. Unden (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases Microbiol Mol Biol Rev **70:** 910-38.

Meniche X., C. Labarre, C. de Sousa-d'Auria, E. Huc, F. Laval, M. Tropis, N. Bayan, D. Portevin, C. Guilhot, M. Daffe et C. Houssin (2009) Identification of a stress-induced factor of *Corynebacterineae* that is involved in the regulation of the outer membrane lipid composition J Bacteriol **191:** 7323-32.

Mermelstein L. D. et E. T. Papoutsakis (1993) In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Appl Environ Microbiol **59:** 1077-81.

Möker N., M. Brocker, S. Schaffer, R. Krämer, S. Morbach et M. Bott (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection Mol Microbiol **54:** 420-38.

Muffler A., S. Bettermann, M. Haushalter, A. Horlein, U. Neveling, M. Schramm et O. Sorgenfrei (2002) Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose J Biotechnol **98:** 255-68.

Nakamura J., S. Hirano, M. Yamaguchi et H. Ito (2006) International Patent (W095/34672).

Niebisch A., A. Kabus, C. Schultz, B. Weil et M. Bott (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein J Biol Chem **281:** 12300-7.

Nunheimer T. D., J. Birnbaum, E. D. Ihnen et A. L. Demain (1970) Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid Appl Microbiol **20:** 215-7.

Portevin D., C. De Sousa-D'Auria, C. Houssin, C. Grimaldi, M. Chami, M. Daffe et C. Guilhot (2004) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms Proc Natl Acad Sci U S A **101:** 314-9.

Puech V., M. Chami, A. Lemassu, M. A. Laneelle, B. Schiffler, P. Gounon, N. Bayan, R. Benz et M. Daffe (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane Microbiology **147:** 1365-82.

Radmacher E., K. C. Stansen, G. S. Besra, L. J. Alderwick, W. N. Maughan, G. Hollweg, H. Sahm, V. F. Wendisch et L. Eggeling (2005) Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum* Microbiology **151:** 1359-68.

Sano C. (2009) History of glutamate production American Journal of Clinical Nutrition **90:** 7285-7325.

Schafer A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach et A. Puhler (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum Gene **145:** 69-73.

Schaffer S., B. Weil, V. D. Nguyen, G. Dongmann, K. Gunther, M. Nickolaus, T. Hermann et M. Bott (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum* Electrophoresis **22:** 4404-22.

Schultz C., A. Niebisch, L. Gebel et M. Bott (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG Appl Microbiol Biotechnol **76:** 691-700.

Shiio I., S. I. Otsuka et M. Takahashi (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular premeability of amino acids J Biochem **51:** 56-62.

Shiio I. et K. Ujigawa-Takeda (1980) Presence and regulation of a-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium favum* Agric Biol Chem **44:** 1897-1904.

Takayama K., E. L. Armstrong, K. A. Kunugi et J. Kilburn (1979) Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis* Antimicrobial Agents and Chemotherapy **16:** 240-242.

Takinami K., H. Yoshii, H. Tsuri et H. odaka (1965) Biochemical effect of fatty and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and growth of *Brevibacterium lactofermentum* Agric Biol Chem **29:** 351-359.

Tauch A., O. Kirchner, L. Wehmeier, J. Kalinowski et A. Puhler (1994) *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli* FEMS Microbiol Lett **123:** 343-7.

Toriyama S., I. Yano, M. Masui, E. Kusunose, E. Kusunosm et et N. Akimori (1980) Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria. I. Temperatures induced changes in mycolic acid molecular species and related compounds in *Mycobacterium phlei.* Journal of Biochemistry **88:** 211-221.

Tropis M., X. Meniche, A. Wolf, H. Gebhardt, S. Strelkov, M. Chami, D. Schomburg, R. Kramer, S. Morbach et M. Daffe (2005) The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in Corynebacterineae J Biol Chem **280:** 26573-85.

Van der Rest M. E., C. Lange et D. Molenaar (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA Appl Microbiol Biotechnol **52:** 541-5.

Vertes A. A., M. Inui, M. Kobayashi, Y. Kurusu et H. Yukawa (1993) Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in coryneform bacteria Res Microbiol **144:** 181-5.

Von der Osten C. H., C. Gioannetti et A. J. Sinskey (1989) Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. Biotechnol Lett **11:** 11-16.

Yukawa H., C. A. Omumasaba, H. Nonaka, P. Kos, N. Okai, N. Suzuki, M. Suda, Y. Tsuge, J. Watanabe, Y. Ikeda, A. A. Vertes et M. Inui (2007) Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R Microbiology **153:** 1042-58.

Zuber B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths et M. Daffe (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state J Bacteriol **190:** 5672-80.

Principales contributions de l'article :

Les travaux présentés dans cet article ont mis en évidence l'importance de la bicouche mycolique lors du procédé de production du glutamate thermo-induit chez *C. glutamicum* 2262. Les cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production du glutamate, ainsi que les activités enzymatiques ODH et PDH, l'état de phosphorylation de la protéine OdhI et l'expression des protéines de stress ont été comparés entre *C. glutamicum* 2262 et le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Nous avons établi que la présence des acides mycoliques n'est pas essentielle à la survie de *C. glutamicum* 2262. Cependant leur absence affecte sévèrement la croissance cellulaire, ainsi que la consommation de glucose et la production du glutamate puisque ce dernier est absent dans le milieu extérieur après une élévation de température de 33 à 39°C. Par ailleurs, lorsque les acides mycoliques sont absents, l'élévation de la température n'affecte plus les activités ODH et PDH puisque celles-ci se maintiennent. En revanche, cette absence influence la phosphorylation de la protéine OdhI. En effet, une faible proportion de forme phosphorylée est observée avant et après l'élévation de la température. De plus, le mutant dépourvu de la bicouche mycolique ne surexprime pas les protéines de stress suite à l'élévation de la température. Enfin la composition de la membrane plasmique du mutant est différente de celle du sauvage. En effet, avant toute induction, le rapport entre $C_{16}/C_{18:1}$ des lipides extractibles est 2 fois plus élevé chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* et cette différence s'accentue après élévation de la température.

La présence de la mycomembrane ou de composants localisés dans celle-ci semble donc primordiale pour assurer une production de glutamate. De ces observations, deux questions se posent, soit la faible croissance du mutant est à l'origine de la faible productivité, soit il s'agit du mécanisme d'excrétion du glutamate qui est affecté. Cependant le fait que *C. glutamicum* 2262 Δ*pks*13 ne soit plus capable de ressentir le stress thermique, que les activités ODH, PDH se maintiennent et que le ratio d'OdhI phosphorylée/OdhI non phosphorylée demeurent constant suite au changement de température, semble indiquer que le métabolisme de ce mutant n'est pas orienté vers la production du glutamate. Il est donc probable que la transduction du signal permettant le déclenchement de l'excrétion du glutamate soit interrompue chez ce mutant dépourvu de la bicouche mycolique.

Afin de compléter les travaux présentés dans le projet de publication, une analyse de la composition de l'enveloppe a été réalisée également chez le variant non producteur de glutamate, *C. glutamicum* 2262 NP.

II. Composition de l'enveloppe de *C. glutamicum* 2262 NP suite à une variation de température de 33 à 39°C

Comme discuté précédemment, un changement de température de 33 à 39° C n'a aucun effet notable sur la croissance chez *C. glutamicum* 2262 NP et n'induit pas la production de glutamate. L'évolution de la composition en acides mycoliques et en acides gras a été suivie chez ce variant et comparée à celle de *C. glutamicum* 2262 dans les mêmes conditions de culture.

Tableau 7 : Analyse des lipides de l'enveloppe de *C. glutamicum* 2262 et 2262 NP suite à un changement de la température du milieu de culture de 33 à 39°C. Pour chaque échantillon sont données les valeurs obtenues à partir des lipides extractibles (LE, en parenthèses) et à partir des lipides liés. AG $C_{16}/C_{18:1}$ est représentatif du rapport entre les acides gras saturés et les acides gras insaturés, AM $C_{32}+C_{34}$ $/C_{34:1}$; du rapport acides mycoliques saturés sur acides mycoliques insaturés et AM/AG du rapport acides mycoliques sur acides gras. ND : non détecté.

	AG $C_{16}/C_{18:1}$ Résidu et (**LE**)	AM $C_{32}+C_{34}/C_{34:1}$ Résidu et (**LE**)	AM/AG Résidu et (**LE**)
***C. glutamicum* 2262** **(33°C)**	**1,4 ± 0,4** **(0,8 ± 0,3)**	**11,5 ± 2,5** **(9,5 ± 2,3)**	**0,5 ± 0,0** **(0,7 ± 0,0)**
***C. glutamicum* 2262** **(39°C, 1h)**	**ND** **(1,2 ± 0,0)**	**16,3 ± 2,4** **(18,6 ± 2)**	**1,5 ± 0,0** **(1,7 ± 0,6)**
***C. glutamicum* 2262** **(39°C, 3h)**	**1,0 ± 0,0** **(1,17 ± 0,0)**	**18,6 ± 1,9** **(22,7 ± 0,0)**	**2,1± 0,8** **(2,0 ± 0,4)**
***C. glutamicum* 2262 NP** **(33°C)**	**ND** **(0,9 ± 0,2)**	**2,4 ± 0,0** **(2,1 ± 0,5)**	**ND** **(0,4 ± 0,1)**
***C. glutamicum* 2262 NP** **(39°C, 1h)**	**0,5 ± 0,0** **(1,1 ± 0,6)**	**2, 0 ± 0,3** **(2,3 ± 0,4)**	**0,5 ± 0,0** **(0,4 ± 0,1)**
***C. glutamicum* 2262 NP** **(39°C, 3h)**	**0,7 ± 0,0** **(1,1 ± 0,2)**	**2,2 ± 0,2** **(3,5 ± 1,0)**	**1,0 ± 0,0** **(0,6 ± 0,0)**

Les procédés utilisés pour induire l'excrétion du glutamate provoquent un changement significatif du rapport entre acides gras saturés et insaturés (Gourdon, 1999; Kanzaki *et al.*, 1967). Cependant le changement seul de la composition lipidique associé à une diminution de la quantité en phospholipides est nécessaire mais non suffisant pour l'excrétion du glutamate (Hoischen and Kramer, 1990). A l'inverse, aucune étude ne relate l'évolution de la composition des acides mycoliques pendant le procédé thermo-induit de production de

glutamate. Au cours de la culture, trois prélèvements ont été réalisés, le premier en phase de croissance, le second 1 heure après l'élévation de la température et le dernier 3 heures après. Le tableau 7 rapporte les rapports entre les acides gras saturés et insaturés, entre les acides mycoliques saturés et insaturés et celui entre acides mycoliques et acides gras. Deux types de lipides ont été analysés, les lipides extractibles (présentés entre parenthèses) et les lipides qui restent liés à la cellule (appelés «résidus»). Chez *C. glutamicum* 2262, le rapport des lipides extractibles entre les acides gras saturés et insaturés passe de 0,8 ± 0,3 avant induction à 1,17 ± 0,0 après 3 heures à 39°C. L'évolution de ce rapport chez *C. glutamicum* 2262 au cours de la phase de production de glutamate a été également établie par Gourdon (1999), ses travaux avaient rapporté une augmentation du rapport acides gras saturés / insaturés (rapport S/I) qui passait de 1,7 en croissance à 2,8 aprés les 3 premières heures de la phase de production et à 7,3 en fin de culture. Ces résultats sont tout a fait cohérents avec la littérature. Celle-ci rapporte les mécanismes d'adaptation thermique chez les micro-organismes par modification de composition en acides gras (Russell, 1984; Suutari and Laakso, 1994). Par ailleurs, le rapport des lipides extractibles entre les acides gras saturés / insaturés chez le variant *C. glutamicum* 2262 NP n'évolue que très peu après le passage à 39°C, il est respectivement de 0,9 ± 0,2 et de 1,1 ± 0,2 à 33°C et 39°C.

De la même manière, chez *C. glutamicum* 2262, le rapport des lipides extractibles (ou liés) entre les acides mycoliques saturés et insaturés augmente après élévation de température à 39°C, alors que ce rapport évolue très peu chez *C. glutamicum* 2262 NP (tableau 7).
Très récemment, Meniche *et al.* (2009) ont étudié la composition des acides mycoliques suite à l'élévation de température de 30°C à 42°C chez *C. glutamicum* RES 167. Ils ont observé une augmentation importante du rapport entre les acides mycoliques saturés et insaturés suite à l'élévation de la température, en parfaite adéquation avec nos résultats.

Par ailleurs, à 33°C, la composition en corynomycolates entre les souches est différente. *C. glutamicum* 2262 présente un rapport entre les acides corynomycoliques saturés et les acides corynomycoliques insaturés au niveau des lipides extractibles 4 fois supérieur à celui de *C. glutamicum* 2262 NP. Après l'augmentation de la température, cette différence entre les 2 souches s'accentue. *C. glutamicum* 2262 présente un rapport 6 fois supérieur à celui de *C. glutamicum* 2262 NP, après 3 heures de culture à 39°C. Cette variation plus importante de ce rapport chez la souche productrice de glutamate pourrait se traduire par une modification des propriétés physiques de la bicouche lipidique externe. Ces modifications pourraient ne pas être aussi importantes chez *C. glutamicum* 2262 NP.

Enfin, le rapport de lipides extractibles entre les acides mycoliques et les acides gras évolue chez *C. glutamicum* 2262 alors qu'il reste constant chez *C. glutamicum* 2262 NP. Lorsque la production du glutamate est effective, il apparaît donc que les trois rapports présentés dans le tableau 7 sont augmentés, ce qui n'est pas le cas en absence de production. A ce stade, une relation entre l'évolution de la composition de la bicouche mycolique et la production de glutamate pourrait être envisagée.

III. Conclusion

Afin de déterminer le rôle des acides mycoliques dans les modifications intracellulaires au cours de la fermentation glutamique chez *C. glutamicum* 2262, les activités enzymatiques ODH et PDH, la régulation de l'activité ODH (état de phosphorylation d'OdhI) et l'expression des protéines de stress ont été comparées entre *C. glutamicum* 2262, *C. glutamicum* 2262 NP *et C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. L'absence d'acide mycolique chez ce dernier a un effet sur la croissance, la consommation du glucose et la production du glutamate. En effet, du point de vue cinétique, peu de glucose est consommé par rapport à la souche de référence, la vitesse spécifique de croissance maximale n'est que de 0,1 h^{-1} et aucune excrétion du glutamate n'est observée. Des modifications intracellulaires ont également été observées, les activités enzymatiques sont maintenues et aucun stress thermique ne semble être ressenti par le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Les résultats des chapitres précédents ont montré que *C. glutamicum* 2262 produit du glutamate uniquement lorsque ressent le stress thermique est ressenti et que les deux activités enzymatiques l'ODH et la PDH sont diminuées. Ces deux conditions ne sont pas établies chez le mutant, ce qui semble avoir pour conséquence l'incapacité à déclencher l'excrétion du glutamate. L'ensemble de ces résultats chez le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* suggère le rôle prépondérant de la bicouche d'acide mycolique ou d'un de ses composants pour induire la cascade d'événements permettant l'excrétion du glutamate.

Par ailleurs, nous avons également observé qu'une modulation de la composition en acides mycoliques de la souche *C. glutamicum* 2262 et du variant non producteur du glutamate se produisait au cours d'une culture avec élévation de la température de 33 à 39°C. Nous avons observé une différence entre les deux souches avant induction, le rapport acides mycoliques saturés/insaturés dans les lipides extractibles est 4 fois supérieur chez la souche de référence. Cette différence était encore plus importante 3 heures après induction. Ces observations peuvent s'expliquer par un remaniement de la membrane mycolique plus important chez la souche de référence. Récemment, la littérature a rapporté des changements

de composition de la mycomembrane au cours d'un procédé thermo-induit de production du glutamate chez *C. glutamicum*. Par mesure de l'anisotropie de fluorescence, la fluidité globale de celle-ci a été suivie aussi bien chez la souche de référence que chez le variant non producteur. Chez *C. glutamicum* 2262, 1 heure après le passage de 33 à 39°C, la fluidité était augmentée, son niveau maximal étant atteint alors que la vitesse spécifique de production atteignait sa valeur maximale (Bokas *et al.*, 2007). Ces mêmes auteurs rapportent que la fluidité est maintenue constante au cours du procédé de production du glutamate chez *C. glutamicum* 2262 NP. L'élévation de température aurait donc un effet sur le métabolisme lipidique et induirait des modifications de la composition en acides corynomycoliques à l'origine d'un changement de la fluidité de la bicouche lipidique externe, en parfaite corrélation avec la capacité du micro-organisme à excréter du glutamate (Bokas *et al.*, 2007). L'augmentation de la fluidité de l'enveloppe nécessite une augmentation des proportions en acides gras et mycoliques insaturés chez *C. glutamicum* 2262. Or, l'analyse de la composition lipidique de l'enveloppe de cette souche (tableau 7) rapporte plutôt une augmentation des rapports saturés/insaturés aussi bien des acides gras que des acides mycoliques. De ce fait, les analyses physiques (mesure de la fluidité) et les analyses biochimiques (analyse de la composition lipidique) de *C. glutamicum* 2262 semblent contradictoires. Les données de la littérature concernant d'autres micro-organismes rapportent plutôt l'augmentation de ces rapports lors de l'élévation de la température afin de s'adapter à ce changement environnemental. Par ailleurs, la modulation de l'enveloppe au cours d'un procédé thermique a également été étudiée chez *C. glutamicum* RES 167. Dans cette étude, le gène *NCgl2775* présent dans un cluster de gènes avec les gènes *pks13*, *accd4* et *fadD32*, impliqués dans la dernière étape de condensation des acides mycoliques a été identifié. *NCgl2775* est transcrit uniquement lors d'un stress thermique. La protéine NCgl2775 serait impliquée dans le processus de réorganisation de la bicouche mycolique suite à l'augmentation de la température (Meniche *et al.*, 2009). De façon similaire, *C. glutamicum* 2262 semble entreprendre des changements pour remanier sa couche mycolique directement en contact avec le milieu extérieur afin de se protéger des dommages dus à cette élévation de température. Par ailleurs, les travaux de Hashimoto *et al* (2006) rapportent un changement de la composition des acides mycoliques et de leur contenu suite à differents traitements aboutissant à l'excrétion du glutamate chez *C. glutamicum* ATCC 13869. Enfin, le contenu en acide mycolique est diminué suite à l'ajout de l'éthambutol chez *C. glutamicum* ATCC 13032 (Radmacher *et al.*, 2005b). Il est possible que *C. glutamicum* 2262 NP ne procède pas à ces remaniements ce qui aurait pour conséquence l'absence de production du glutamate.

La comparaison cinétique et métabolique des deux souches, *C. glutamicum* 2262 et 2262 Δ*pks13,* nous a permis de supposer que la bicouche mycolique est essentielle au déclenchement de la cascade aboutissant à l'excrétion du glutamate. Cependant, la présence de la bicouche chez *C. glutamicum* 2262 NP n'en fait pas une souche productrice du glutamate. Il est possible qu'au sein de cette bicouche mycolique soient présents des éléments clés responsables du ressenti du stress thermique et par la suite, à l'origine des modifications intracellulaires chez *C. glutamicum* 2262. Ces éléments clés restent à caractériser.

La bicouche mycolique renferme des protéines dont des porines. Ces porines constituent des canaux ioniques hydrophiles traversant la mycomembrane des *Corynebacteriaceae*. Elles ont été isolées chez *C. glutamicum* en 1995 (Niederweis *et al.*, 1995). Les auteurs de ces travaux décrivent quatre porines (PorA, PorB, PorC et PorH). Deux porines sont spécifiques des cations (PorA et PorH) et deux sont spécifiques des anions (PorB et PorC). Elles semblent être des candidats potentiels pour la traversée des molécules chargées et donc potentiellement le glutamate à travers la bicouche mycolique. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes donc intéressés à l'expression des porines PorB et PorC qui pourraient être responsables du passage du glutamate à travers la mycomembrane.

Chapitre IV : Caractérisation des porines localisées dans la mycomembrane de *C. glutamicum*

IV.A. Introduction

La mycomembrane, d'un point de vue fonctionnel, est encore mal connue à ce jour. Pourtant, plusieurs protéines ont été identifiées telles que les mycoloyl transférases impliquées dans des étapes clés de l'assemblage de la mycomembrane, ou bien encore les protéines formant des canaux ioniques (ou porines). Ces dernières permettent à certains solutés de traverser cette barrière hydrophobe. La présence de ces canaux ioniques a d'abord été mise en évidence dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Nikaido, 1994; Nikaido *et al.*, 1993), puis leur présence a été confirmée chez des bactéries du sous ordre des *Corynebacterineae.* Par exemple cela a été montré chez les espèces du genre *Mycobacterium* (Lichtinger *et al.*, 1999; Niederweis *et al.*, 1999), mais aussi chez les Corynébactéries comme *C. glutamicum* (Niederweis *et al.*, 1995) et plus récemment *C. diphteriae* (Schiffler *et al.*, 2007).Des études précédentes ont mis en évidence des fonctions essentielles de ces porines, notamment celles d'assurer l'entrée des nutriments hydrophiles nécessaires à la croissance (Stephan *et al.*, 2005) et d'éliminer certains produits du métabolisme cellulaire. De plus, les travaux menées par Meniche *et al*. (2007) ont permis d'établir une relation entre la présence de la mycomembrane et l'activité des porines. En absence d'acides mycoliques, PorA est exprimée mais non active (Meniche, 2007). Cette absence d'activité dans un extrait brut d'un mutant dépourvu de ces acides mycoliques serait donc plutôt liée à un problème de structuration de la protéine. Par ailleurs, une modification post-traductionnelle de Por A par un acide corynomycolique a été montrée pour la première fois chez les *Corynebacterineae* est importante pour son activité (Huc *et al.*, 2010; Meniche, 2007).

Bien que plusieurs transporteurs d'acides aminés aient été identifiés au niveau de la membrane plasmique, le transport de ces acides aminés à travers la mycomembrane n'a pas encore été élucidé. Toutes les hypothèses émises dans la littérature se tournent vers les porines comme des candidats potentiels au franchissement de cette barrière mycolique. En effet, le L-glutamate est un acide aminé hydrophile chargé négativement. Il pourrait donc emprunter la voie des porines anions sélectives PorB/PorC pour traverser la mycomembrane. D'après la littérature, PorB et PorC seraient co-produits et possèdent chacune une masse moléculaire apparente et théorique de 10 kDa. Des études récentes rapportent que PorA et PorH sont aussi co-produits et pour la première fois révèlent que chacune des porines constitue un polypeptide, la présence des deux polypeptides étant nécessaire pour former la porine cation

sélective fonctionnelle (Barth *et al.*, 2010) De façon similaire, ces mêmes auteurs pensent que PorB et PorC seraient aussi deux polypeptides et la présence des deux serait nécessaire pour former un canal anion sélectif fonctionnel. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au lien potentiel entre la présence de ces porines (notamment PorB et PorC) et l'excrétion du glutamate au cours du procédé thermo-induit. L'une des hypothèses est que si le glutamate traverse la barrière mycolique par les porines alors, ces dernières doivent être surexprimées lors du procédé thermo-induit de production de glutamate. Avant de pouvoir établir le lien entre la production de glutamate par *C. glutamicum* 2262 et la présence de porines dans la couche mycolique, il était important de vérifier si la surexpression de ces porines n'était pas corrélée à la croissance. Puis nous avons pu vérifier la présence de PorB/PorC avant et après passage de 33 à 39°C chez *C. glutamicum* 2262, chez *C. glutamicum* 2262 NP et chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*.

IV.B. Application de la technique d'extraction des porines à *C. glutamicum* 2262

Dès les années 1970, Benz et son équipe identifient et caractérisent des porines chez *E. coli* (Benz *et al.*, 1978; Benz *et al.*, 1979). En 1995, Niederweis *et al*. mettent en évidence une activité porine dans un extrait protéique de parois solubilisées avec des détergents chez *C. glutamicum* (Niederweis *et al.*, 1995). Puis chez cette dernière, la méthode d'extraction des porines est mise au point pour la première fois par Lichtinger *et al*. (1998). Toutefois, les méthodes présentées dans la littérature ont été appliquées essentiellement sur la souche *C. glutamicum* ATCC 13032. Au cours de notre étude, nous avons voulu vérifier que la méthode d'extraction établie précédemment chez cette souche était efficace chez *C. glutamicum* 2262. Des électrophorèses de protéines SDS-PAGE à 15% acrylamide/bis acrylamide ont donc été réalisées.

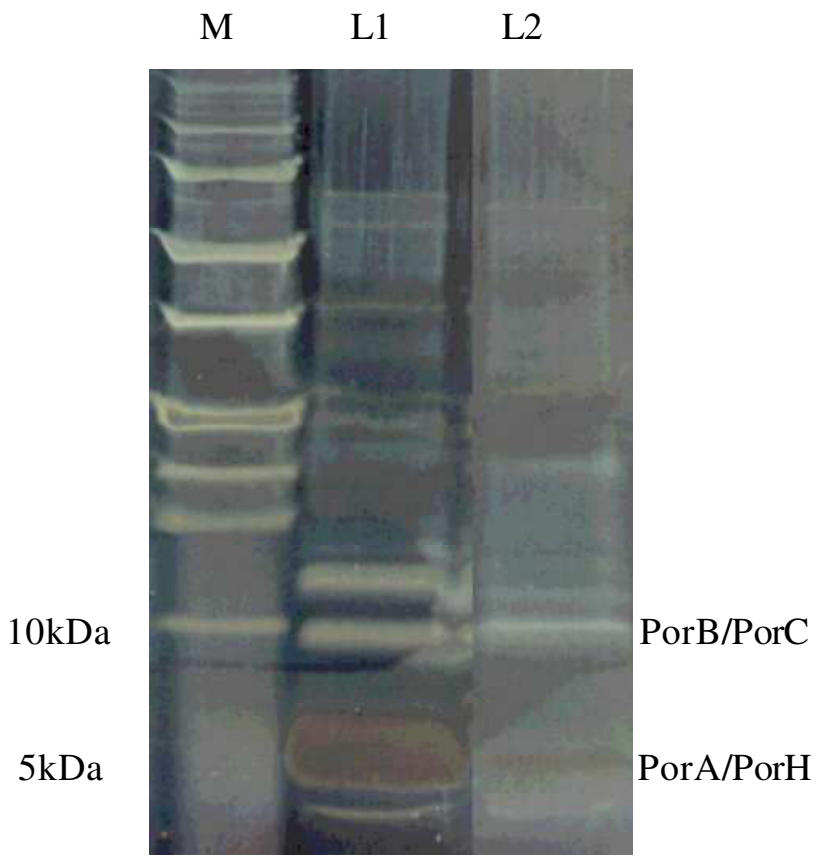


Figure 45 : Séparation des porines sur gels SDS-PAGE à 15% acrylamide/bis acrylamide suite à leur extraction à partir de culture de *C. glutamicum* 2262 et ATCC 13032 selon la méthode de Lichtinger (1998). **M**: marqueur de taille ; **L1**: *C. glutamicum* ATCC 13032. **L2** : *C. glutamicum* 2262. 20 µg de protéines ont été déposés sur gel.

Après coloration du gel au nitrate d'argent, nous avons pu observer d'une part des protéines, pouvant corresponde à PorB/PorC dont les masses moléculaires sont de 10 kDa, ainsi qu'à PorA/PorH dont les masses moléculaires sont de 5 kDa. D'après la littérature, PorA est la protéine majoritaire dans le mélange d'extraction chez *C. glutamicum* ATCC 13032 (Meniche, 2007). De façon similaire, les protéines dont la masse moléculaire est de l'ordre de 5 kDa apparaissent comme étant majoritaires chez *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figure 45).

Néanmoins des protéines autres que les porines présentes dans l'extrait brut peuvent aussi migrer au même niveau. Puisque PorB et PorC sont anions sélectifs, nous avons focalisé notre étude sur ces 2 porines. Afin de vérifier que les protéines présentes sur le gel correspondaient bien aux porines, des anticorps polyclonaux anti-Por B et anti Por C ont été utilisés pour identifier les porines Por B et Por C par Western Blot (Figure 46).

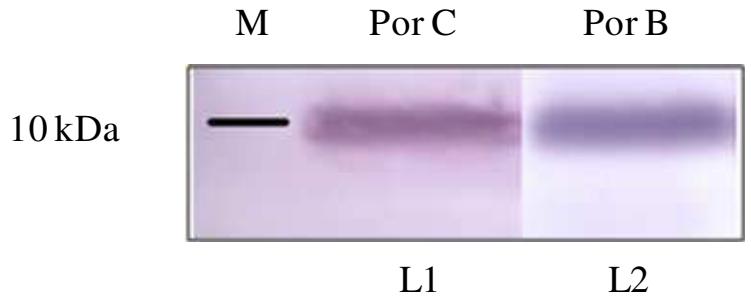


Figure 46 : Identification par Western Blot des protéines PorB/PorC chez *C. glutamicum* 2262 cultivé dans un milieu minimun MCGC+ glucose. M: marqueur de taille. **L1** Extrait acellulaire de *C. glutamicum* 2262 cultivé à 33°C et révélé avec l'anticorps primaire anti-PorC. **L2**: Extrait acellulaire de *C. glutamicum* 2262 cultivé à 33°C et révélé avec l'anticorps primaire anti-PorB.

L'analyse par Western Blot révèle la présence de deux protéines qui migrent à 10 kDa. Ce qui confirme la présence de PorB et PorC chez *C. glutamicum* 2262. Afin de vérifier que le niveau d'expression des porines n'était pas dépendant de la phase de croissance chez *C. glutamicum* 2262, nous avons comparé l'expression des protéines PorB/PorC en début et en fin de phase croissance (Figure 47). Une même quantité de protéines a été déposée sur gel SDS-PAGE 15%.

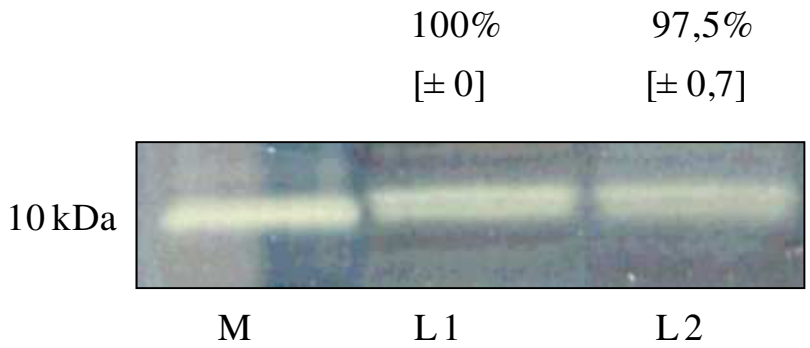


Figure 47 : Effet de la croissance sur l'expression des protéines PorB et PorC chez *C. glutamicum* 2262 cultivé dans le milieu MCGC+ glucose. M: marqueur de poids moléculaire. L1: échantillon prélevé en phase stationnaire de croissance, L2: échantillon prélevé en phase exponentielle de croissance. Le pourcentage indique les concentrations relatives des porines PorB/PorC quantifiées d'une part pour un échantillon prélevé en phase exponentielle de croissance et d'autre part pour un échantillon prélevé en phase stationnaire de croissance. La quantification a été réalisée par densitométrie en utilisant le logiciel Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). Toutes les cultures et les analyses ont été reproduites deux fois.

Deux échantillons ont été prélevés lors de la culture de *C. glutamicum* 2262 sur milieu MCGC à 33°C. Le premier échantillon a été prélevé lorsque les cellules étaient en phase exponentielle (1 $g.l^{-1}$ de biomasse) et le second en phase stationnaire de croissance. Nous avons procédé à une analyse par quantification des porines PorB/PorC pour chaque

échantillon. La quantification de l'échantillon prélevé en phase stationnaire a été fixée à 100%, puis celle de l'échantillon prélevé en phase de croissance a été estimée à 97,5%. Le niveau d'expression diffère très peu entre les deux échantillons prélevés à ces différentes phases de croissance. De ce fait, le niveau d'expression des porines ne semble pas évoluer avec la croissance.

IV.C. Analyse de l'expression des protéines PorB/PorC au cours du procédé thermo-induit de production du glutamate.

Lors du procédé de production du glutamate, suite à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C, *C. glutamicum* 2262 est capable d'excréter le glutamate à hauteur de 85 $g.l^{-1}$ dans des conditions adéquates (Delaunay, 1999). Cependant peu ou pas de glutamate est produit par le variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP et par *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de PorB/PorC dans ces trois souches. La présence de porines a pu être mise en évidence chez, *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* 2262 NP alors qu'elles sont absentes chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* cultivé au cours du procédé thermo-induit avec élévation de la température de 33 à 39°C (Figure 48).

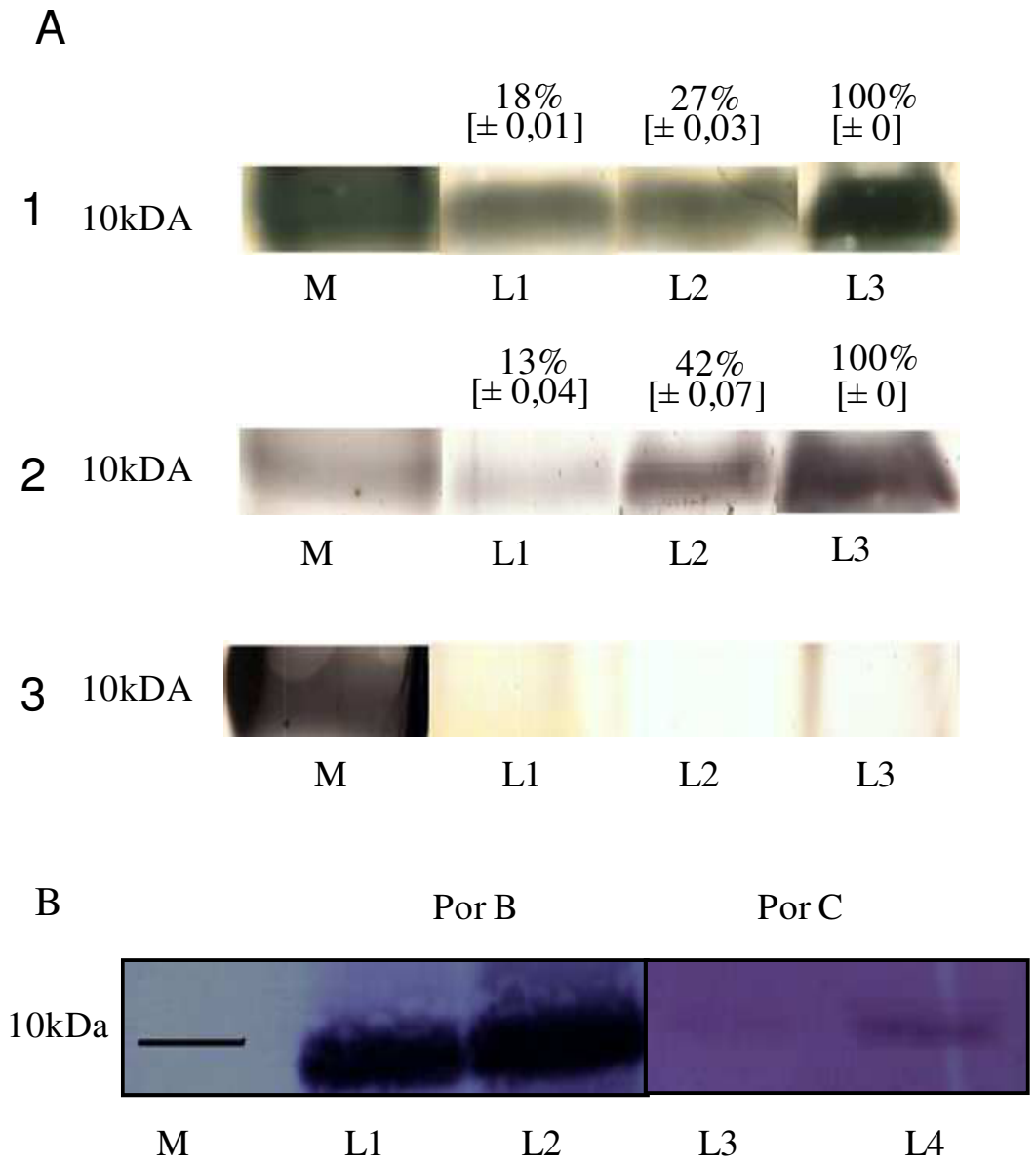


Figure 48 : Analyse par SDS-PAGE (A), et par Western Blot (B) des protéines PorB/PorC exprimées chez *C. glutamicum* 2262 lors d'un procédé de production du glutamate thermo-induit. *C. glutamicum* 2262 est cultivée dans le milieu MCGC+ glucose. **(A)** M: marqueur de poids moléculaire, L1: échantillon prélevé à 33°C, L2: échantillon prélevé après une heure à 39°C (1h) et L3: échantillon prélevé après trois heures à 39°C **(1)** *C. glutamicum* 2262 **(2)** *C. glutamicum* 2262 NP **(3)** *C. glutamicum* 2262 Δ*pks* **(B)** Western blot des extraits bruts de *C.glutamicum* 2262 révélé avec l'anticorps anti-PorB ; L1**:**échantillon prélevé à 33°C et L2: échantillon prélevé après 3heures à 39°C. Révélation avec l'anticorps. anti-PorC ; L3: échantillon prélevé à 33°C et L4 : échantillon prélevé à 39°C. 20 µg de protéines sont déposés sur gel. Le pourcentage indique les concentrations relatives des porines PorB/PorC quantifiées d'une part pour un échantillon à 33°C, une heure et 3 heures après induction à 39°C. La quantification a été réalisée par densitométrie en utilisant le logiciel Bio-Profil software (Vilbert-Lourmat, France). Toutes les cultures et les analyses ont été reproduites deux fois.

L'analyse par SDS-PAGE des extraits acellulaires, montre que les protéines PorB/PorC sont bien exprimées à 33°C chez *C. glutamicum* 2262. A cette température, aucune production de glutamate n'est détectée. Cependant, suite à l'élévation de la température de 33 à 39°C, une augmentation progressive de l'expression des porines PorB/PorC a été observée (Figure 48. A-1). Le niveau d'expression des porines évolue de plus de 80% entre les échantillons prélevés à 33°C et ceux prélevés après 3 heures à 39°C. Ceci est en parfaite corrélation avec la production du glutamate. En effet la vitesse spécifique de production du glutamate atteint son maximum 3 heures après induction (Figure 35). Il est intéressant de constater que le variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP, qui ne produit pas de glutamate dans les mêmes conditions de culture présente une augmentation des protéines PorB/PorC similaire à celle observée chez la souche productrice (Figure 48 A-2). Le niveau d'expression augmente de plus de 80% entre les échantillons prélevés à 33°C et ceux prélevés après 3 heures à 39°C. L'analyse des protéines extraites chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* montre une absence totale de porines avant et après induction (Figure 48 A-3). Ces résultats confirment les données de la littérature qui rapportent une localisation mycomembranaire de ces porines. Par ailleurs, les résultats obtenus sur le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* ne permettent pas de conclure quant à l'expression des porines. Il est possible que ces dernières soient exprimées mais non fonctionnelles en absence de la bicouche mycolique. Récemment, les travaux de Meniche (Meniche, 2007) avaient rapporté, chez un mutant *C. glutamicum* ATCC 21527 Δ*AYS* dépourvu d'acides corynomycoliques, l'expression de la protéine PorA mais celle-ci n'était pas fonctionnelle.

Afin de confirmer que le niveau d'expression des protéines PorB/PorC évoluent entre les 2 températures du procédé, à 33°C et 3 heures après à 39°C, une analyse par Western Blot a été réalisée chez *C. glutamicum* 2262 avant et après élévation de la température. Cependant l'analyse par Western Blot a été réalisée uniquement chez *C. glutamicum* 2262 et non chez *C. glutamicum* 2262 NP parce qu'un profil similaire des porines sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 15% avait été observé. Ainsi le niveau d'expression de PorB et PorC est augmenté avec l'élévation de la température de 33 à 39°C (Figure 49.B). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés récemment par Benz *et al.* (2010) montrant une co-transcription des deux gènes codant PorB et PorC nécessaires à la formation d'un canal actif au sein de la mycomembrane.

Pour la première fois chez *C. glutamicum* 2262 le niveau d'expression des porines a été suivi au cours d'un procédé de production du glutamate. Les résultats mettent en évidence que même en absence de production du glutamate, le passage de 33 à 39°C provoque la

surexpression des protéines PorB/PorC chez *C. glutamicum* 2262 NP. Ces résultats supposent que l'étape limitante dans la production du glutamate chez ce variant non producteur n'est pas située au niveau des porines ou encore que le glutamate ne traverserait pas la mycomembrane via PorB/PorC.

La mycomembrane est essentielle à la localisation des porines, puisque une délétion de celle-ci a pour conséquence une absence totale de porines lors de l'extraction des protéines de l'enveloppe. Afin d'approfondir le lien existant entre l'excrétion du glutamate et la présence de porines, nous nous somme intéressés à un mutant délété de toutes ses porines. L'équipe du Pr. Benz de l'université de Würzburg a construit un mutant délété dans les quatre gènes codants les quatre porines identifiées à ce jour chez *C. glutamicum* ATCC 13032. Nous avons donc caractérisé dans un premier temps le mutant fourni par le Pr. Benz.

IV.D. Caractérisation métabolique du quadruple mutant *C. glutamicum* ATCC 13032Δ porABCH

Dans la littérature, ces porines sont décrites comme des canaux essentiels à la traversée des nutriments nécessaires à la croissance bactériennes et a l'élimination des produits de dégradation éventuellement toxiques pour la bactérie (Nakae, 1976; Stephan *et al.*, 2005). Cependant, aucune différence en termes de croissance, de consommation de glucose ou de production de glutamate n'a été observée chez le quadruple mutant *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *porABCH* comparativement à la souche *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figure 49).

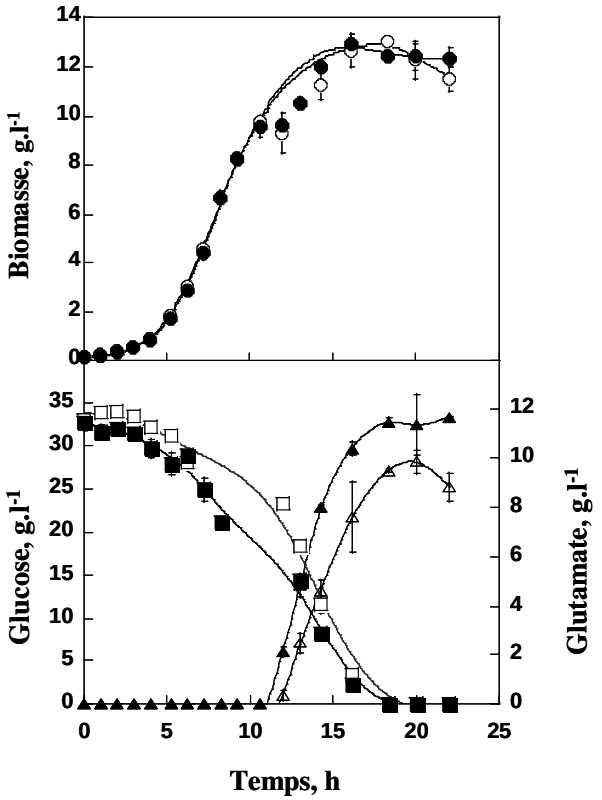


Figure 49 : Cinétique de *C. glutamicum* ATCC 13032 et *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *porABCH*. Croissance (cercles), consommation de glucose ($g.l^{-1}$) (rectangles) et production de glutamate (triangles) de *C. glutamicum* ATCC 13032 *(symboles fermés)* et *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *porABCH* (symboles ouverts) en culture discontinue et en limitation en biotine.

Afin de s'assurer de l'absence totale de porines dans les extraits acellulaires chez le mutant Δ *por ABCH*, une analyse protéique par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 15% et par Western Blot a été réalisée (Figure 50). L'analyse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au nitrate d'argent des extraits bruts, montre un profil protéique différent entre le mutant Δ *porABCH* et *C. glutamicum* ATCC 13032. Il semble que l'absence des porines affecte la présence des autres protéines de l'enveloppe; peu de protéines sont présentes sur le gel SDS-PAGE chez le mutant *C. glutamicum* 13032 Δ *PorABCH.* Par ailleurs nous avons observé la présence de protéines dont la masse moléculaire est très proche de celui de PorB/PorC. Il est probable que PorB/PorC soient confondues avec ces protéines qui ont une masse moléculaire très proche chez *C. glutamicum* ATCC 13032. Pour la suite de l'étude, ces protéines confondues avec les protéines PorB/PorC seront désignées protéines supplémentaires. Afin de distinguer les deux types de protéines, porines et « protéines supplémentaires », nous avons réalisé une analyse

par Western Blot avec l'anticorps anti-PorB et anti-PorC. Après révélation du gel de la membrane de nitrocellulose avec l'anticorps, nous avons pu identifier une faible présence d'une protéine détectée uniquement avec l'anticorps anti-PorB (Figure 50 B) chez le mutant *C. glutamicum* 13032 Δ *porABCH.* Il est peu probable que cette protéine soit la protéine PorB, puisque la masse moléculaire de la protéine supplémentaire est plus faible que celui de la protéine PorB. Ces résultats, en apparence étranges et contradictoires, s'expliquent par le manque de spécificité de l'anticorps anti-PorB. Ce dernier a été produit chez le lapin avec une préparation protéique partiellement pure, et semble réagir avec des protéines supplémentaires. De plus, les travaux de l'équipe de Benz rapportent une co-transcription des gènes codants PorH et PorA. En effet ces mêmes travaux ont montré que la présence des deux formes de porine était nécessaire afin de former un canal ionique fonctionnel au sein de la bicouche lipidique. Por B et PorC sont aussi co-exprimés, il est probable que la présence de PorB et PorC soit aussi nécéssaire pour former un canal ionique. L'expression des deux protéines a pu être mise en évidence chez *C. glutamicum* 2262 (Figure 48 B). Or, ici, aucune synthèse de Por C n'a pu être détéctée (Figure 50 B piste P4)

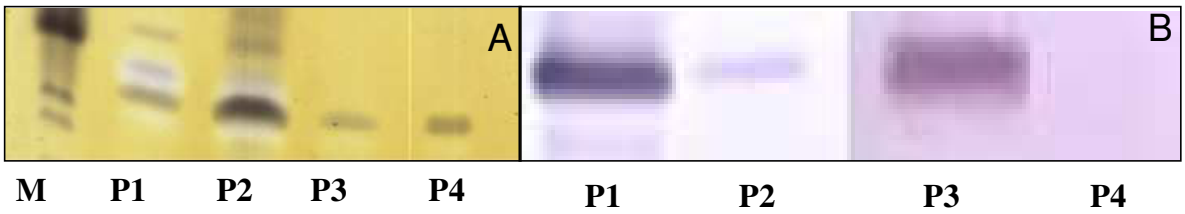


Figure 50 : Analyse par gel SDS-PAGE des extraits bruts de *C. glutamicum* ATCC 13032 et de *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*porABCH*/(A) et analyse par Western Blot des extraits bruts (B) chez *C.glutamicum* ATCC 13032 et du mutant Δ*porABCH*. (A) Gel SDS-PAGE 15% coloré au nitrate d'argent M : marqueur de taille ; P1 : *C. glutamicum* ATCC 13032 ; P2 : *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*porABCH*. **(B)** gel révélé avec des anticorps anti-PorB (P1 : *C. glutamicum* ATCC 13032, P2 : *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*porABCH*), ou anti-PorC (P3: *C. glutamicum* ATCC 13032 et P4 : *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*porABCH*).

Chez *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* 2262 NP, la surexpression de PorB/PorC est donc induite suite à l'élévation de la température de 33 à 39°C, mais semble indépendante de l'excrétion du glutamate. Quant à la souche *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* dépourvue d'acides mycoliques, elle ne présente aucune porine au niveau de l'extrait protéique de l'enveloppe. De plus le mutant *C. glutamicum* ATCC 13032 délété des quatre gènes codant les porines identifiées à ce jour, présente une croissance et une production de glutamate similaires à celles de la *C. glutamicum* ATCC 13032. Les expériences que nous avons menées

ne nous permettent donc pas d'établir un lien entre la présence des porines dans la mycomembrane de *C. glutamicum* 2262 et la production de glutamate.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiologiques aboutissant à la production de glutamate en réalisant une étude comparative entre une souche thermosensible productrice de glutamate, *C. glutamicum* 2262, son variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP, et un mutant dépourvu de sa couche mycolique *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Des avancées significatives ont été obtenues, ce qui permet aujourd'hui d'établir un modèle métabolique original reprenant les différentes modifications physiologiques successives aboutissant à l'induction de l'excrétion du glutamate.

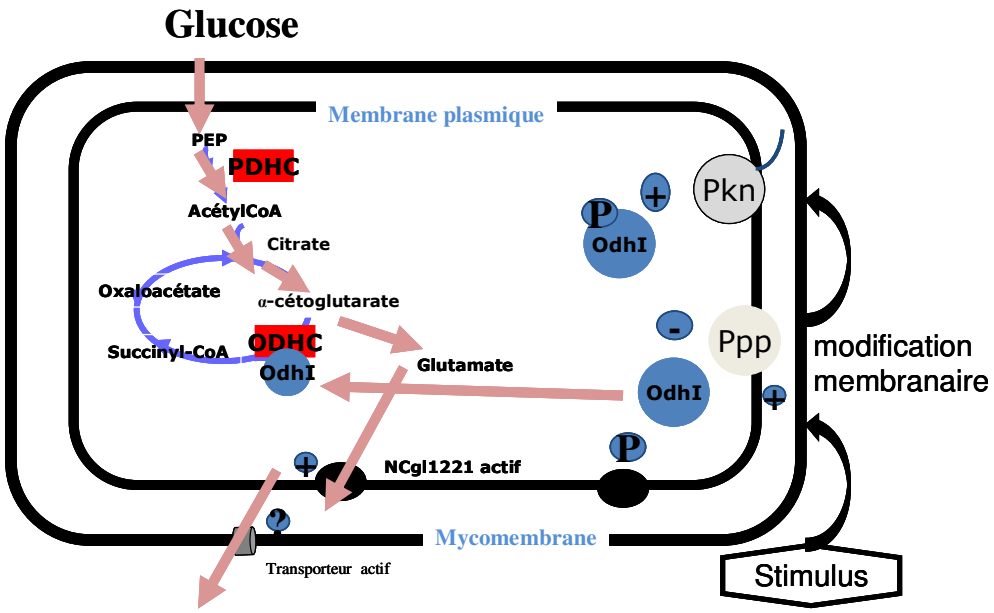


Figure 51 : Schéma hypothétique du ressenti du stress chez *C. glutamicum*. Suite à un stimulus extérieur, des modifications membranaires apparaissent, provoquant d'une part l'activation des protéines kinases et phosphatases impliquées dans la régulation de l'activité enzymatique ODH via la protéine OdhI, d'autre part l'activation des transporteurs plasmiques et mycomembranaires du glutamate. La majorité du flux carbone est dévié vers la production du glutamate.

Afin de déterminer le lien entre l'excrétion du glutamate et les variations de température, nous avons réalisé une analyse protéomique à différents gradients de températures permettant ou pas d'induire l'excrétion du glutamate. Nous avons pu montrer que le ressenti du stimulus par *C. glutamicum* se traduit par la surexpression de protéines de stress chez *C. glutamicum* 2262. Lorsque la température est augmentée de 3°C, seule la protéine de stress GroEL parmi les 3 protéines suivies est surexprimée et la production du glutamate n'est pas observée. Par contre lorsque la température est augmentée de 4 ou 6°C, le ressenti du stimulus se traduit par une surexpression des protéines de stress et une induction de l'excrétion du glutamate. Cependant le variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP ne

surexprime pas de protéines de stress suite à l'élévation de la température à 39°C et ne produit pas de glutamate. Toutefois l'élévation de la température à 43°C rend ce variant sensible de nouveau à la température, ce qui se traduit par une surexpression des protéines de stress et une production du glutamate. L'ensemble des données obtenues nous a permis d'établir un lien entre le ressenti du stress et la production du glutamate. Cependant à ce stade de l'étude, nous ne pouvons conclure quant à l'existence d'un lien direct entre la surexpression des protéines de stress et la production du glutamate.

Par ailleurs, l'étude du variant non producteur *C. glutamicum* 2262 NP a été réalisée uniquement dans des conditions avec variation de température. Il était judicieux de vérifier si ce variant non producteur de glutamate est capable de produire également dans le cadre du procédé de limitation en biotine. Ce variant semble ne pas produire du glutamate dans ces conditions (données non montrées). Cependant il reste à reproduire ces résultats afin de les confirmer. Si ces résultats corroborent l'étude débutée en limitation de biotine, il est possible que le verrou présent chez ce variant et empêchant l'excrétion du glutamate après thermo induction soit le même quel que soit le procédé de production utilisé.

Chez le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, aucun stress n'est ressenti, l'activité ODH n'est pas inhibée et le glutamate n'est pas excrété suite à l'élévation de la température. Ceci suggère que la bicouche lipidique externe renferme des éléments clés responsables de la transduction du signal vers les autres couches de l'enveloppe cellulaire. Elle participerait au déclenchement de la régulation de la protéine OdhI et de la surexpression des protéines de stress.

Le stress thermique induit une modification de la composition de la bicouche lipidique externe, et ainsi qu'un changement de sa fluidité (Bokas *et al.*, 2007). Chez *C. glutamicum* 2262, le rapport acides mycoliques saturés/insaturés est augmenté d'un facteur 2,5 après élévation de température de culture alors qu'il évolue très peu pour *C. glutamicum* 2262 NP. Ces résultats mettent en évidence un changement important au niveau de la bicouche mycolique chez *C. glutamicum* 2262 lors du procédé thermo-induit de production du glutamate. Ce remaniement de la bicouche lipidique lors d'une application d'un stress thermique est aussi observé chez d'autres Corynébactéries et *Nocardia*. Chez les Mycobactéries, la composition des acides mycoliques changent rapidement dès lors que la température de culture est augmentée de 20 à 50°C (Toriyama *et al.*, 1980). Il serait judicieux de réaliser une analyse de la composition de la membrane plasmique et de la mycomembrane chez le variant non producteur lors d'un procédé de production du glutamate thermo-induit à

33-43°C. Cette étude, permettrait d'envisager un lien entre la compostion de l'enveloppe (membrane plasmique et mycolique) et la production du glutamate.

Les études comparatives entre le variant non producteur et la souche de référence mettent clairement en évidence la nécessité d'inhiber l'activité ODH pour induire l'excrétion du glutamate. Ce résultat était attendu puisque cette inhibition a déjà été montrée quelles que soient les conditions d'induction de l'excrétion du glutamate. Une diminution de l'activité PDH est également observée dans notre étude, notamment 3 heures après l'induction thermique. Cette diminution de l'activité PDH n'a été que très peu mentionnée dans la littérature. En effet, plusieurs travaux réalisés au sein du laboratoire ont montré la diminution de l'activité PDH lors d'un procédé de production du glutamate (Uy, 2003). Cette diminution est également rapportée par les travaux de Gourdon (Gourdon, 1999) qui explique l'inhibition de l'activité PDH par de forts rapports $NADH/NAD^+$ dans la deuxième moitié de la phase de production du glutamate. L'augmentation du rapport $NADH/NAD^+$ favoriserait une déviation du flux glycolitique vers la production de lactate en activant la lactate déshydrogénase, au détriment de la production du glutamate.

L'inhibition de l'activité ODH est à relier à la déphosphorylation de la protéine OdhI. Celle-ci intervient très rapidement après l'induction de l'excrétion du glutamate. Cette inhibition engendre une réorientation du flux carboné vers la synthèse du glutamate (figure 51). Chez *C. glutamicum* 2262 NP (pour une élévation de température inférieure à 6°C) et *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, le ratio d'OdhI phosphorylée sur OdhI non phosphorylée n'évolue pas. De ce fait, aucune production du glutamate n'est observée. Par ailleurs la régulation de la protéine OdhI nécessite des kinases, PknA, PknB, PknL et PknG ainsi que la phosphatase PPP. L'absence de la bicouche mycolique chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* aboutit à un disfonctionnement des kinases ainsi que de la phosphatase, car peu de forme phosphorylée d'OdhI a été observée tout au long de la cinétique et aucune évolution du rapport OdhI-P/OdhI n'a été observé chez ce mutant. Par ailleurs chez le variant non producteur, la phosphatase pourrait être non active lors de la culture de ce dernier à 33-39°C. En effet, contrairement au mutant, la forme phosphorylée était bien présente avant et après induction à 39°C, puisque le ratio OdhI-P/OdhI restait inchangé. Ces résultats soulignent donc le rôle important des kinases et phosphatases dans le procédé de production du glutamate. En effet même si dans la majorité des cas, la forme non phosphorylée d'OdhI est majoritaire, l'évolution du ratio OdhI-P/OdhI est nécessaire à l'excrétion du glutamate. D'autre part, toutes les protéines kinases (PknA, PknB et PknL) exceptée PknG ainsi que la protéine phosphatase (PPP) ont une localisation transmembranaire. Les deux kinases PknB et PknL

possédent un domaine PASTA extracytoplasmique. D'après la littérature, le domaine PASTA de PknB semble initier de multiples signaux chez *M. tuberculosis* (Barthe *et al.*, 2010). Une étude plus approfondie de ce domaine chez *C. glutamicum* 2262 permettrait d'établir un lien entre le ressenti du signal et l'excrétion du glutamate.

La délétion de la protéine kinase PknG s'est traduite par une amélioration de la vitesse spécifique de production du glutamate. Cette kinase apparaît donc comme une kinase secondaire chez *C. glutamicum* 2262. La délétion ou la surexpression artificielle des gènes codant les protéines kinases et phosphatases chez *C. glutamicum* 2262 permettrait de mieux comprendre le rôle de chacune dans la succession d'évènements aboutissant à l'excrétion du glutamate chez *C. glutamicum*.

L'ensemble de ces résultats souligne clairement le rôle primordial de la bicouche lipidique externe de *C. glutamicum 2262* dans la transduction du signal lors du procédé de production du glutamate thermo-induit. Afin de comprendre le mécanisme d'excrétion du glutamate, il apparaît donc opportun de mettre en place des stratégies de modification de cette bicouche lipidique, puisque sa délétion totale conduit à des modifications au niveau physiologique et métabolique très importantes, aboutissant à la perte d'excrétion du glutamate. Une délétion individuelle de chaque composant de la mycomembrane permettrait d'identifier le rôle prépondérant d'un ou plusieurs composants sur le mécanisme d'excrétion du glutamate. Cette étude a déjà débutée par la délétion des porines qui sont enchâssées dans cette mycomembrane.

La synthèse de PorB, est fortement accrue après l'induction thermique. Cette protéine qui forme un canal anion sélectif avec une autre protéine PorC, constitue, un candidat de choix pour permettre la sortie du glutamate. Cependant chez *C. glutamicum* ATCC 13032, la délétion de la totalité des porines connues n'affecte pas la croissance et l'excrétion du glutamate. De ce fait, l'absence de ces porines n'empêche pas la sortie du glutamate du milieu intérieur vers le milieu extérieur. L'hypothèse selon laquelle, le glutamate emprunterait ces porines est donc à reconsidérer. Selon nos résultats, le glutamate traverserait la bicouche mycolique et cela malgré l'absence des porines. A ce niveau de l'étude nous proposons deux hypothèses, (i) en absence de porines, la couche mycolique deviendrait plus perméable, (ii) la couche mycolique pourrait renfermer d'autres protéines dont des porines non identifiées à ce jour permettant l'excrétion du glutamate et le passage des solutés.

Il serait intéressant de continuer à caractériser le mutant *C. glutamicum* 13032 Δ*por ABCH*. Tout d'abord en vérifiant, notamment par des analyses en spectrométrie de masse la nature des protéines qui interfèrent avec PorB/PorC. Il serait également intéressant de vérifier

si PorB/PorC sont modifiées post-traductionnellement tout comme la protéine PorA (Huc *et al*., 2010) et si la mutation du gène codant un polypeptide (PorB) affecte la fonction de l'autre polypeptide (PorC) et inversement.

Par ailleurs chez le mutant *C. glutamicum* 13032 Δ*porABCH* l'absence de porine pourrait induire des réarrangements au niveau de la quantité et/ou de la nature de lipide de l'enveloppe. Il serait donc intéressant de comparer la composition lipidique et notamment en acides mycoliques chez le mutant et la souche sauvage.

Enfin par analogie avec le mutant *C. glutamicum* 13032 Δ*porABCH*, un mutant délété de toutes ses porines devrait être construit chez *C. glutamicum* 2262. L'excrétion du glutamate chez cette souche peut elle être affectée par l'absence de ces porines?

Comme mentionné précédemment, un transporteur au niveau de la membrane plasmique a été identifié depuis peu par une équipe japonaise (Figure 51) (Nakamura *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2009). Ce transporteur semble être indispensable à l'excrétion du glutamate, puisque sa délétion se traduit par une absence de production du glutamate. Inversement, la surexpression du gène codant ce transporteur entraine une augmentation de production du glutamate. Nous envisageons de poursuivre l'étude de ce transporteur enchassé dans la membrane plasmique en, (i) comparant les séquences du gène codant le transporteur entre le variant non producteur et *C. glutamicum* 2262, puis (ii) en étudiant la structure et la localisation de ce transporteur au niveau de la membrane plasmique. En effet, un des domaines protéiques du transporteur présent dans le périplasme pourrait être responsable de la transmission du signal dans la cellule. Si la conformation du transporteur n'est pas correcte, ce domaine pourrait ne pas transmettre le signal au niveau intracellulaire.

Matériels et méthodes

I. Souches utilisées et conditions de culture

I.A. Souches utilisées

I.A.1. Caractéristiques de la souche *C. glutamicum* 2262

Le principal micro-organisme utilisé au cours de ce travail est *Corynebacterium glutamicum* 2262, la production du glutamate par cette souche est thermo-inductible. Les caractéristiques générales de *C. glutamicum* sont présentées dans le Tableau (Collins and Cummins, 1986). La composition élémentaire générale de *C. glutamicum* est $C_{4,5}$ H_8 $O_{2,2}$ N avec 9% de cendre (Cocaign, 1992).

Caractères principaux :
-Bactérie à Gram positif
-Bacille : droit ou légèrement incurvé, ovale, massue, souvent réarrangées en V
-Colonies jaunes pâles à jaune, régulières et lisses sur gélose
-Dimension : 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm
-Auxotrophe pour la biotine
-Non-sporulant
-Non-mobile
-Alcoolo-acido-résistantes
-Aérobie facultative
-Production d'acide glutamique
-% G+C: 53 à 58 %
-Paroi: présence d'acide méso-diaminopimélique et d'arabinogalactane
Conditions de culture :
-p H optimal de croissance : 7, 3 à 7,4
-Température optimale de croissance : 25 à 37°C
Substrats consommés (+) ou non consommées (-) :
-(+) Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose, Tréhalose et Mannose
-(-) Rhamnose, Galactose, Raffinose, Arabinose, Lactose, Xylose, Dextrine, Salicine, Amidon
Activités enzymatiques caractéristiques :
-Catalase +
-Uréase +
-Hydrolyse gélatine –
-Hydrolyse caséine –
-Réduction de nitrate en nitrite +
-Esculine –
-Hippurate+

Tableau 8 : Caractéristiques générales de l'espèce *C. glutamicum* d'après Collins et Cummins, (1986).

I.A.2. Autres Souches de *C. glutamicum*

Deux souches ont été construites au cours de ce travail :

- *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* dépourvue du gène codant la condensase
- *C. glutamicum pknG::kan.* Le gène codant la protéine kinase *pknG* est rendu non fonctionnel par insertion du gène de résistance à la kanamycine (*kan*).

Trois autres souches ont été utilisées :

- *C. glutamicum* 2262 NP, variant non producteur de glutamate suite à un changement de la température du milieu de culture de 33 à 39°C, isolé au cours de travaux antérieurs (Uy, 2003).
- *C. glutamicum* ATCC 13032, souche de collection qui fait l'objet de très nombreux travaux publiés à ce jour.
- *C. glutamicum* ATCC 213032 *ΔporABCH,* souche dépourvue des gènes codant les porines identifées chez *C. glutamicum*. Cette souche nous a été fournie par le Pr. Benz (université de Würzburg, Allemagne).

I.B. Conditions de culture

I.B.1 Composition des milieux de culture

La composition du milieu de culture est basée sur le milieu MCGC dans lequel le citrate a été remplacé par la déféroxamine (Von der Osten *et al.*, 1989). La composition du milieu MCGC diffère légèrement qu'il soit préparé en vue d'une culture en fiole chicanée ou en fermenteur (**Tableau 9**).

I.B.2 Préparation du milieu de culture

Les sels de base, les solutions (A et B) et le glucose sont stérilisés séparément à 121°C pendant 20 minutes afin de limiter les précipitations. En revanche, les vitamines, la bétaine et le calcium sont stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm.

I.B.3 Mise en culture des souches

- Conservation des souches

Afin de conserver à long terme les souches, celles-ci sont conservées à -20°C, en présence de 20 % de glycérol (glycérol stock). Lors d'une culture en fiole d'Erlenmeyer, lorsque les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance dans le milieu MCGC (DO_{570} = 20), leur croissance est arrêtée et un volume de glycérol (20%) est rajouté à la suspension cellulaire. Puis ce mélange bactérie-glycérol est réparti dans des microtubes de 1,5 ml (préalablement stérilisés) puis congelé à -20°C. Ces microtubes constituent la banque cellulaire qui nous permettra de disposer des cellules dans le même état physiologique tout au

long de ce travail. Un test de contamination est effectué en étalant sur milieu gélosé (BHI ou LB supplémenté d'agar) une goutte de cette suspension cellulaire.

- Préparation des pré-cultures

Lorsque les cinétiques sont effectuées en fiole d'Erlenmeyer chicanée ou en réacteur, plusieurs pré-cultures sont préparées. La 1ère pré-culture (en fiole chicanée) est faite à partir d'un microtube dans 50 ml de milieu MCGC + glucose. La culture est incubée à 33°C, sous agitation à 200 rpm, toute une nuit. Puis la 2eme pré-culture est une culture ensemencée à partir de la 1ère pré-culture (5 ml à DO_{570}= 60), lorsque les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance. Cette dernière suspension cellulaire peut-être utilisée pour inoculer le réacteur.

Tableau 9 : Composition du milieu MCGC

Composition	Volume utilisé (ml)	Culture en fiole chicanée	Volume utilisé (ml)	Culture en réacteur de 2 l
Sels de base	**40**	**Pour 1000 ml** -18,2 g Na_2HPO_4 -3,6g KH_2PO_4 -1,2 g NaCl -4,8g $(NH_4)_2SO_4$ -900 ml H_2O -pH =7,6 -H_2O qsq 1000 ml -Autoclavé à 121°C, 20 min	**1240**	**Pour 1240 ml** -4,5 g Na_2HPO_4 -9 g KH_2PO_4 -3 g NaCl -12 g $(NH_4)_2SO_4$ -900 ml H_2O -pH =7,6 -H_2O qsq 1240 ml -Autoclavé à 121°C, 20 min
Supplément	**10**	**Pour 175,5 ml :** **-100 ml de glucose à 300 g l^{-1}** **-10 ml de sels A**: -40g $MgSO_4$ $7H_2O$ -4 g $FeSO_4$ $7H_2O$ -0,4g $FeCl_3$ -H_20 qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min **-1 ml de sels B**: -1g $ZnSO_4$ $7H_2O$ -0,4 g $CuCl_2$ $2H_2O$ -4g $MnSO_4$ H_2O -0,2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24.}4H_2O$ -0,4 g $Na_2B_4O_{7.}10H_2O$ -H_20 qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min **-Vitamines**: -0,5 ml $CaC1_2$ 1,5 M -2 ml Biotine 1.g.l^{-1} -2 ml Thiamine 10.g.l^{-1} -30 µl Déféroxamine 100 g.l^{-1} -1,7 g Bétaine -60 ml H_20 **Stérilisation par filtration (0,22 µm)**	**236,5**	**Pour 236,5 :** **-200 ml de glucose à 300 g l^{-1}** **-15 ml de sels A**: -40g $MgSO_4$ $7H_2O$ -4 g $FeSO_4$ $7H_2O$ -0,4g $FeCl_3$ -H_20 qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min **-1 ml de sels B**: -1g $ZnSO_4$ $7H_2O$ -0,4 g $CuCl_2$ $2H_2O$ -4g $MnSO_4$ H_2O -0,2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24.}4H_2O$ -0,4 g $Na_2B_4O_{7.}10H_2O$ -H_20 qsq 1l -Autoclavé à 121°C, 20 min **-Vitamines**: -0,75 ml $CaC1_2$ 1,5 M -3 ml Biotine 1.g.l^{-1} -3 ml Thiamine 10.g.l^{-1} -45 µl Déféroxamine 100 g.l^{-1} -3 g Bétaine -13,2 ml H_20 **Stérilisation par filtration (0,22 µm)**
Urée	**0,65**	Solution à 300g.l^{-1}		

- Culture en réacteur en mode discontinu

Des réacteurs d'un volume total de 1,5 ou 5 litres (Applikon, Pays-Bas) ont été utilisés au cours de ce travail. Le milieu de culture utilisé est du MCGC (voir tableau 9). La calibration de la sonde pH (pH = 4 et pH = 7) est faite avant la stérilisation du réacteur, alors que celle de l'oxygène (100% avec de l'air et 0% avec de l'azote) est réalisée avant l'ensemencement. Le volume de la pré-culture est calculé afin de débuter la fermentation avec une DO_{570} = 1. La température de la culture est initialement de 33°C afin d'atteindre la phase d'exponentielle de croissance (environ 4 h) et est augmentée à la température désirée. La concentration en glucose est de l'ordre de 30-35 $g.l^{-1}$ en début de culture.
Le pH est régulé à 7,6 pendant toute la culture par ajout d'une solution d'ammoniaque 12N ou de HCl 2N.
Le taux d'oxygène dissous est contrôlé par la variation d'agitation et le débit d'air. Le débit d'air varie de 60 à 100 $l.h^{-1}$ et l'agitation de 500 à 1200 rpm.
De l'anti mousse (polypropylène glycol 1,3 $g.l^{-1}$) est ajouté goutte à goutte dès que la mousse apparait au cours de la fermentation.

- Culture en fiole d'Erlenmeyer en mode discontinu

Pour les cultures en fiole d'Erlenmeyer chicanées de 500 ml, une pré-culture est réalisée dans le milieu MCGC à pH 7,6 pendant une nuit à 33°C et sous agitation à 200 rpm. Cette pré-culture est ensuite utilisée pour l'ensemencement de 50 ml de milieu MCGC à une DO_{570} initiale de 0,5. La concentration de glucose initiale est de 34 $g.l^{-1}$. Cette culture est réalisée à 33°C et à une agitation de 200 rpm pour éviter la limitation en oxygène. Une fois la phase exponentielle de croissance atteinte (biomasse environ à 1$g.l^{-1}$ soit une DO_{570} = 4), un choc thermique est appliqué en augmentant rapidement la température de 33°C à 39°C, ou 41°C, ou 43°C ou 45°C. Ce procédé est effectué pendant 24h.

II. Techniques de biologie moléculaire

II.A. Construction du mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan*

Le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan* dépourvu de la protéine kinase PknG est construit par insertion du gène de résistance à la kanamycine dans le gène *pknG*. Les deux amorces pknG_am et pknG_av (voir tableau 12) ont été utilisées pour amplifier un fragment d'ADN de 0,8 kb par PCR issu du gène *pknG*. Comme le génome de *C. glutamicum* 2262 n'est pas encore séquencé, la séquence du gène est identifiée à partir du génome de *C.*

glutamicum ATCC 13032 (Genbank BX927147). Le produit PCR est cloné dans le vecteur Zéro-Blunt (Invitrogen), ce plasmide contient une cassette codant la résistance à la kanamycine. Le plasmide Zéro-Blunt contenant le gène d'intérêt est incorporé chez *C. glutamicum* 2262 par électroporation. Les transformants ayant intégré le plasmide sont sélectionnés sur milieu BHI contenant 50 µg. ml^{-1} de kanamycine et incubés à 33°C.

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification d'un fragment de 0,8 kb du gène *pknG*

Amorces	Séquences
pknG_am	CGA-ATT-CCT-CGC-CGA-CAT-CAC-CAC
pknG_av	AGA-ATT-CGC-ATA-GGA-GGA-TCC-GGA-GAG-CAT-A

II.A.1. Amplification du gène codant la protéine kinase PknG par PCR

L'amplification *in vitro* de fragment d'ADN de 0,8 kb par PCR, est effectuée à l'aide d'une enzyme polymérase haute fidélité (PFX) et d'un thermo-cycleur Applied Biosystems (PCR SYSTEM 2700).

Le mélange réactionnel contient (100 µl):

ADN matrice 5 ng, (2µl de l'ADN dilué au 20ème)
Amorces (*pknG_am et pknG_av*) 100 pmol pour chaque amorce (1µl)
dNTP, 2,5mM (10µl)
Tampon réactionnel 10X (10µl)
$MgSO_4$ 50 mM (2µl)
Polymérase PFX 2,5 unités (1µl)
Eau ultrapure stérile (75 µl)

L'étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C est suivie de 30 cycles d'amplification composés par 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 53°C, et 2 minutes d'élongation à 72 °C. Enfin une étape d'élongation terminale de 7 minutes à 72°C est appliquée à l'échantillon.

II.A.2. Vérification du produit PCR par électrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN amplifiés ont été déposés en présence du tampon de charge (Annexe II) sur un gel d'agarose 1% (1g d'agarose dans 100 ml de tampon Tris/Borate/EDTA (TBE) (0,5X)) (Annexe II). Le produit PCR est révélé à l'aide de Syber Safe (10.000X concentré dans du DMSO). Après migration du gel d'électrophorèse dans un tampon TBE (0.5 X) à une

tension comprise entre 80 et 100V, la bande qui correspond à un poids moléculaire de 0,8 kb est découpée du gel, et stockée à -20°C jusqu'à l'extraction du produit PCR.

II.A.3 Extraction de l'ADN amplifié du gel d'agarose

Afin de purifier l'ADN amplifié, une étape d'extraction de l'ADN du gel d'agarose est donc nécessaire. L'extraction d'ADN est effectuée avec le kit NucleoSpin Extract II (PCR clean-up gel extraction) suivant les instructions du fournisseur Macherey-Nagel. Le produit PCR purifié du gel est déposé sur gel d'agarose 1% + Syber Safe afin de vérifier sa pureté.

- Ligation du Produit PCR

Le plasmide utilisé pour la ligation est le plasmide Zéro Blunt PCR (Invitrogen), il a une taille de 3,5 kb et contient la cassette de résistance à la kanamycine.

Le mélange réactionnel (10 µl) contient:

Plasmide zéro Blunt PCR à 10ng/µl,	0,5 µl
Tampon de ligation à (5X)	2,0 µl
Produit PCR purifié	7,5 µl
Ligase à (100U/ µl) (ajouté au dernier moment)	0,3µl.

Le mélange est bien homogénéisé et laissé à température ambiante jusqu'à son utilisation.

- Préparation des cellules compétentes

***E. coli* DH5 α**

Un microlitre du stock glycérol de *E. coli* DH5α (Tableau 13) a été étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB+Agar (20 $g.l^{-1}$ de LB et 20 $g.l^{-1}$ agar). La boîte de Pétri est incubée toute une nuit à 37°C. Une colonie sur boite est remise en culture dans du milieu LB à 37°C et sous agitation pendant une nuit. Puis, une seconde culture en milieu LB est ensemencée à partir de la culture de nuit. Lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (DO_{600} = 0,7), elles sont bloquées immédiatement dans un mélange glace, H_2O et NaCl. Les cellules sont par la suite centrifugées pendant 7 minutes à 9000 rmp (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) à 0°C puis lavées deux fois par de l'eau milliQ glycérolée (10%) stérile à 4°C. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé en partie, seules quelques dizaines de microlitre du surnageant sont gardées afin de resuspendre les cellules. Enfin les cellules rendues ainsi compétentes à la transformation sont conservées à -80°C en aliquots de 50µl.

Tableau 11 : Présentation des souches bactériennes utilisées lors des clonages

	Description des souches
***E. coli* DH5α**	F^- φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA*1 *endA*1 *hsdR*17(rk^-, mk^+) *phoA supE*44 λ^- *thi*-1 *gyrA*96 *relA*1
***E.coli* DH5αMCR**	F^- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA*1 *endA*1 *hsdR*17(rk^-, mk^+) *phoA supE*44 λ^- *thi*-1 *gyrA*96 *relA*1

***C. glutamicum* 2262**

Les bactéries sont cultivées dans du milieu MCGC+ 3,4% glucose jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance (Biomasse = 1,5 $g.l^{-1}$). La culture est stoppée dans un bain froid (la température < - 5°C). Les cellules sont rapidement centrifugées à 5000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 15 minutes et à 4°C. Le culot est lavé deux fois par de l'eau milliQ glycérolée (10%) stérile à 4°C, afin d'éliminer les sels et de fragiliser les enveloppes cellulaires. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé en partie, quelques dizaines de microlitre du surnageant sont gardées afin de resuspendre les cellules. Enfin les cellules rendues ainsi compétentes à la transformation sont conservées à -80°C en aliquots de 50µl.

- Transformation des bactéries par électroporation

E. coli

Le choc électrique est effectué à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de Biorad réglé à 2500 V, 25 µF et 200 Ω sur un mélange préalablement incubé 5 minutes dans la glace, contenant 50 µl de cellules compétentes de *E. coli* DH5α et 2µl de produit de ligation dans une cuvette de 2 mm. Après le choc électrique, le mélange cellule/ADN est alors repris rapidement dans 500 µl de milieu riche LB et mis en culture pendant 45 minutes à 37°C.

***C. glutamicum* 2262**

Cette technique, décrite à l'origine pour *E. coli*, a été adaptée pour la transformation des Corynébactéries (Bonamy *et al.*, 1990).

Pour *C. glutamicum* 2262, le choc électrique est effectué à 1800 V, 25 µF et 400 Ω. Contrairement à la transformation avec *E. coli* DH5α, *C. glutamicum* est repris dans du milieu riche BHI après transformatrion. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min à 30°C. Elles sont finalement concentrées par centrifugation.

Les cellules concentrées sont étalées sur boite soit contenant du milieu BHI et 50 µg.ml^{-1} de Kanamycine pour *C. glutamicum* 2262 soit contenant du milieu LB et 50 µg.ml^{-1} Kanamycine pour *E. coli* DH5α. Les boites sont incubées à 30 et 37°C pour *C .glutamicum* et *E .coli* DH5α respectivement pendant 24 heures. Les colonies sur boites correspondent à *E. coli* DH5α contenant le plasmide avec l'insert d'intérêt et le mutant *C. glutamicum* 2262 *pknG::kan*.

- Extraction et purification du plasmide et vérification de l'insert par digestion chez *E. coli* DH5α

L'extraction du plasmide est effectuée selon le kit d'extraction plasmidique NucleoSpin plasmid et suivant les instructions du fournisseur Macherey-Nagel.

La purification du plasmide est effectuée selon le kit High-copy plasmid purification plasmidique (AX 100) et dont le fournisseur est Macherey-Nagel. L'isopropanol est rajouté à la suspension purifiée, puis celle-ci est stockée 30 minutes à -80°C. La suspension est par la suite centrifugée pendant 30 minutes à 14500 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) à 4°C. Après centrifugation, le surnageant et éliminé le culot est relavé trois fois avec de l'éthanol 80% stérile froid (-20°C). Après la dernière centrifugation à 14500 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 13 min à 4°C, le culot est repris dans 10 µl d'eau ultra-pure et laissé pendant 1h30 à température ambiante. Un gel d'agarose est réalisé afin de vérifier si le plasmide migre bien à la taille attendue.

II.B. Construction du mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*

Le mutant *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* délété du gène codant la condensase (enzyme qui catalyse l'une des dernières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques) a été construit au cours de ce travail. Les différentes étapes utilisées afin de construire ce mutant sont similaires à celles décrites dans le paragraphe B-1. Cependant dans la partie précédente, il s'agissait d'une mutation du gène par insertion alors que dans ce paragraphe nous avons procédé à la délétion d'une partie du gène *pks13* en suivant la stratégie décrite dans la figure 52 Comme le génome de *C. glutamicum* 2262 n'est pas encore séquencé, la séquence du gène a été identifiée à partir de *C. glutamicum* ATCC 13032 (Genbank BX927147). Une partie située au milieu du gène de 1,7 kb a été délétée. Deux couples d'amorce ont été définis pour amplifier deux fragments d'ADN de 0,65 et 0,60 kb (Tableau 14). Ces deux fragments sont respectivement en amont et en aval de la portion du gène à déléter. D'autre part un troisième couple d'amorce est utilisé pour amplifier le gène codant la cassette de résistance à la kanamycine (Tableau 14).

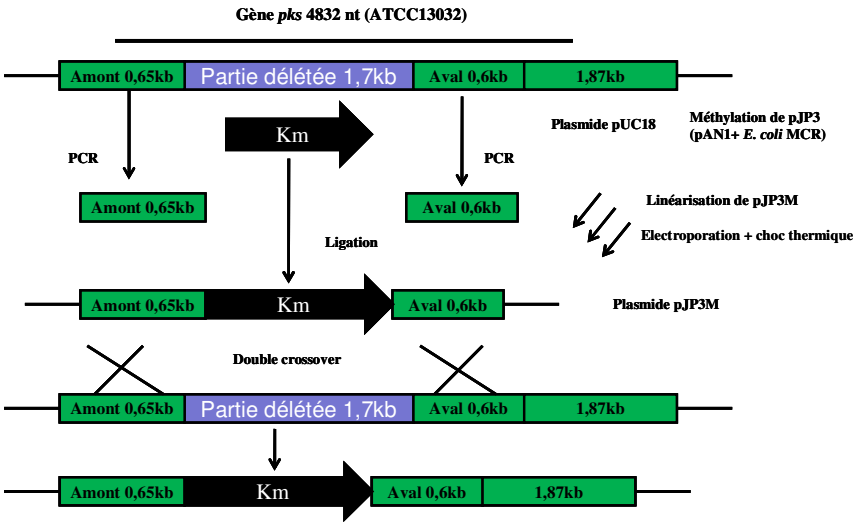


Figure 52 : Stratégie utilisée pour construire *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*

Après amplification et digestion par les enzymes de restriction *Pst*I / *Sal*I le gène codant la cassette de résistance à la kanamycine est inséré dans le plasmide puC18 lui même digéré par les mêmes enzymes de restriction. Après digestion, purification, extraction et ligation, une étape d'électroporation est réalisée afin de transformer une souche *E. coli* DH5α (Tableau 13) avec le plasmide pUC18 contenant le gène codant la cassette de résistance à la kanamycine. Les deux fragments amplifiés sont insérés par la suite dans le plasmide pUC18/kanamycine en utilisant les deux sites de restrictions *Hind*III / *Pst*I et *Sal*I / *Eco*RI. Ce nouveau plasmide est appelé pJP3.

Tableau 12: Séquences des amorces utilisées pour la délétion partielle du gène *pks13* chez *C. glutamicum* 2262

Nom	Sequences (5'—>3')	Enzymes de restriction
Pksdelf1	*CATAAGCTTATGGAACAGAGCCAATCGTCGGATC*	***Hind* III**
Pksdelr1	*GCACTGCAGGCGAGCGTACTCCAAAGCCTCCCAC*	***Pst*I**
Pksdelf2	*GAAGTCGACTCAGCGACCGCGATACCATGC*	***Sal*I**
Pksdelr2	*CGAGAATTCAGGGGCTTGCCCACGGTGAACGC*	***Eco*RI**
Kanf1	*CGACTGCAGATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAAGGATC*	***Pst*I**
Kanf2	*GCAGTCGACGTCGCGCGCGGTGAGCAC*	***Sal*I**

Afin d'éviter toute destruction du plasmide pJP3 lors de la transformation de *C. glutamicum* 2262, le plasmide pJP3 est méthylé chez *E coli* DH5αMCR (Tableau 13) en utilisant un plasmide co-résident condant une méthylase (pAN1) fourni par le Dr. Papoutsakis (Mermelstein and Papoutsakis, 1993)

Le plasmide pJP3M obtenu après méthylation est ensuite linéarisé avec l'enzyme de restriction *ScaI*. Les transformants ayant intégré le plasmide sont sélectionnés sur milieu BHI contenant 50 µg. ml^{-1} de kanamycine et incubés à 33°C. Le remplacement allélique de la partie du gène à déléter par le gène de 1,4 kb codant la kanamycine est vérifié par PCR en utilisant les couples d'amorces suivants pksdelf1/kanr2, kanf1/pksdelr2 et pksdelf1/pksdelr2 (Tableau 14).

III. Méthodes analytiques

Les cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production de glutamate et de lactate ont été reproduites trois fois pour chaque culture. Sur chaque cinétique présentée dans ce travail apparaîtront la moyenne de ces trois mesures ainsi que l'écart-type.

III.A. Biomasse

Le suivi de la biomasse au cours de la fermentation est effectué par mesure de la densité optique à 570 nm avec un spectrophotomètre (Hitachi 2000, Japan). Le coefficient de conversion de la densité optique en biomasse est de 0,27 (DO*0,27=biomasse ($g.l^{-1}$)). Ce dernier peut varier selon le spectrophotomètre utilisé.

III.B. Glucose et Lactate

A chaque prélèvement, la suspension cellulaire est centrifugée, puis le surnageant est récupéré pour doser le glutamate, le glucose et le lactate. Les concentrations de glucose et de lactate sont mesurées à l'aide d'un automate de laboratoire. Ces analyses utilisent des kits enzymatiques (Elitech, France pour le glucose et Biomérieux, France pour le lactate). Le principe des réactions colorimétriques sont les suivants :

(i). Glucose

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Phénol} + \text{4-Amino-4-antipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Quinonéimine}$$

(ii). Lactate

$$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow{\text{Lactate oxydase}} \text{Pyruvate} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-Chlorophénol} + \text{Amino-4-antipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Quinonéimine} + 2H_2O_2 + HCl$$

Les gammes de linéarité sont respectivement de 0 à 0,4 $g.l^{-1}$ et de 6 à 900 $mg.l^{-1}$ pour le glucose et le lactate.

L'apparition de la quinonéimine est détectée à 480 nm pour le glucose et à 446 nm pour le lactate. L'intensité de coloration de la quinonéimine mesurée est proportionnelle à la quantité de lactate et de glucose dans l'échantillon.

III.C. Glutamate

Le glutamate est dosé par un kit enzymatique (r-Biopharm, Roche). Le principe de la réaction colorimétrique est le suivant:

$$\text{L-Glutamate} + NAD^+ + H_2O \underset{}{\overset{\text{Glutamate déshydrogénase}}{\rightleftharpoons}} \text{2-Oxoglutarate} + NADH + NH_4^+$$

$$NADH + \text{INT} \xrightarrow{\text{Diaphorase}} \text{Formazan} + NAD^+$$

L'apparition du formazan est détectée à 492 nm (Spectrophomètre Multiskan MCC/340 Tiertek). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glutamate. Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,07 $g.l^{-1}$ de glutamate permet de déterminer la concentration en glutamate des échantillons.

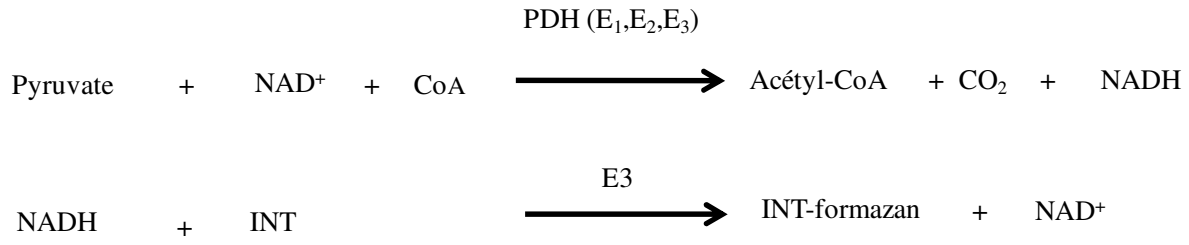
IV. Dosages des activités enzymatiques

IV.A. Traitement des échantillons

Les échantillons prélevés au cours de la fermentation sont maintenus dans la glace puis rapidement centrifugés à 7000 rmp pendant 15 min à 4°C (Aventi J-E, Centrifuger Beckman Coulter). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans une solution tampon N-Tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminothane sulfonate (TES/NaOH), 100 mM, pH=7,7 contenant 30% de glycérol. Cette suspension est rapidement congelée à -80°C

jusqu'à utilisation (dans un délai maximum de 24 h). Pour obtenir l'extrait brut, une sonication (20 KHz et 200 Watts) est effectuée dans la glace (8 cycles de 30 secondes de sonication avec un intervalle de 1 min qui permet le refroidissement de l'extrait). Après sonication, l'échantillon est centrifugé à 10000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 30 min à 4°C. A l'issue de la centrifugation, le surnageant est rapidement récupéré puis dessalé par passage sur une colonne PD10 (LKB-Phamacia) à 4°C préalablement équilibrée avec le même tampon TES/NaOH, 100 mM, pH =7,7. La fraction protéique dessalée (3ml) est utilisée rapidement pour le dosage des activités PDH et ODH.

IV.B. Mesure de l'activité pyruvate déshydrogénase (PDH)



La PDH transforme le pyruvate, le NAD^+ et CoA en acétyl-CoA, CO_2 et NADH. L'activité PDH est mesurée par spectrophotométrie (Beckman DU 7500). Le principe de mesure de celle-ci est basée sur la méthode de Hinman et Blass (1981). L'apparition du 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényltétrazolium chloride soluble dans l'éthanol (formazan, ε (coefficient d'extinction molaire) =12,4 $mM^{-1}.cm^{-1}$) est suivie à 500 nm. Afin d'éliminer l'activité parasite, une réaction sans pyruvate est réalisée, puis soustraite de l'activité avec le pyruvate (Figure 53).Le mélange réactionnel pour la mesure de l'activité PDH est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 13 : Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité PDH

Réactifs	**Concentrations finales**
Tampon phosphate de sodium, pH=7,8	100 mM
$MgCl_2$	5 mM
NAD^+ (Nicotinamide adénine dinucléotide)	2 mM
INT (Iodonitrotetrazolium formazan)	0,6 mM
DTT (Dithiothreitol)	0,3 mM
BSA	1 $mg.ml^{-1}$
TPP (Thiamine pyrophosphate)	0,2 mM
CoA (Acétyl-Coenzyme A)	0,2 mM
Volume Extrait dessalé	50 µl
Pyruvate	5 mM

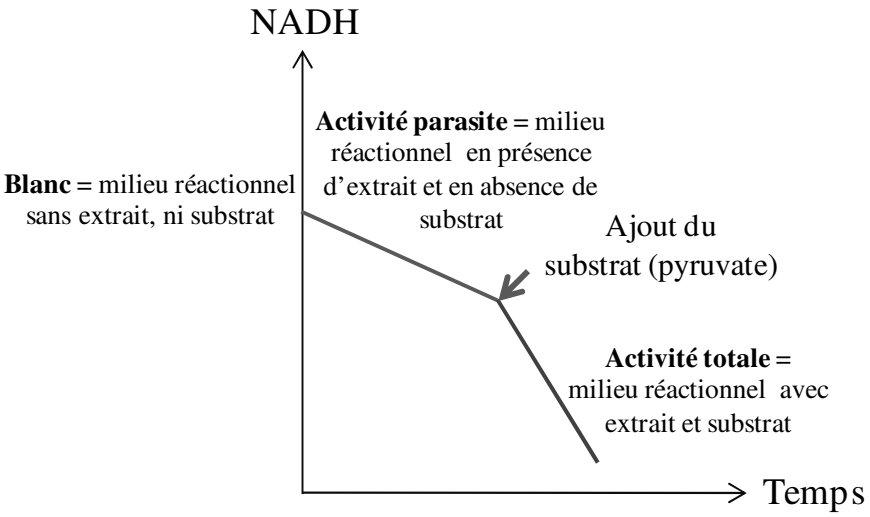


Figure 53 : Suivi de l'absorbance du NADH au cours du dosage de l'activité PDH.

IV.C. Mesure de l'activité l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH)

$$\alpha\text{- cétoglutarate} + \text{APAD} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{ODH}} \text{Succinyl-CoA} + CO_2 + \text{APADH}$$

L'ODH transforme l'α-cétoglutarate, le CoA et l'APAD en succinyl-CoA, CO_2 et APADH. Le principe de mesure est basé sur la méthode de Shiio et Ujigawa (1980). L'apparition du 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (APADH, ε = 9,02 $mM^{-1}cm^{-1}$) est suivie à 356 nm. Comme l'activité ODH est très faible et très difficile à détecter en raison

d'une activité parasite très forte, le NAD^+ est remplacé par l'APAD. Ce dernier a une structure homologue à celle du NAD^+. L'activité parasite, sans α-cétoglutarate, est quantifiée puis soustraite de l'activité avec l'α-cétoglutarate, le principe est le même que pour la mesure de l'activité PDH (Figure 53). Le mélange réactionnel pour la mesure de l'activité ODH est présenté dans le Tableau 11. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

Tableau 14 : Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité ODH

Réactifs	**Concentrations finales**
Tampon TES/NAOH 30% glycérol, pH=7,7	94 mM
$MgCl_2$	4,7 mM
APAD (acétylpyridine adénine dinucléotide)	3,7 mM
TPP (Thiamine pyrophosphate)	0,3 mM
Cystéine	2,8 mM
CoA (Acétyl-Coenzyme A)	0,2 mM
Volume extrait dessalé	100 (µl)
α-cétoglutarate	0,94 mM

Les différents substrats sont aliquotés à -20°C jusqu'à utilisation. La solubilisation de ces substrats se fait juste avant leur utilisation. Les différents substrats sont solubilisés dans de l'eau excepté l'INT qui est repris dans de l'éthanol. La réaction enzymatique se fait à 30°C dans des cuves en quartz équipées d'un barreau aimanté afin de maintenir le mélange sous agitation. Le Co-enzyme A est solubilisé en dernier car il est très instable en solution.

IV.D. Dosage des protéines

Le dosage de protéines a été réalisé sur les extraits bruts ou dessalés afin de déterminer l'activité spécifique des enzymes (en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines). Nous avons utilisé la méthode de Bradford (1976). Le bleu de coomassie présent dans le réactif de Bradford réagit avec les protéines en solution en formant un complexe protéique de couleur bleue qui absorbe la lumière visible à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir de concentrations croissantes (de 0 à 1 $mg.ml^{-1}$) d'albumine de sérum bovin (BSA) (Bradford, 1976).

IV.E. Calcul de l'activité enzymatique

L'activité spécifique totale est calculée à partir de l'essai contenant le substrat: α-cétoglutarate pour l'activité ODH et pyruvate pour l'activité ODH.

-Activité spécifique (nmol. $min^{-1}.mg^{-1}$) **=** (ΔA/min)*(1/ε)*(Volume totale dans la cuve (µl)/Volume d'extrait (µl)*(1/[protéines de l'extrait dessalé]($mg.ml^{-1}$)).

(1) ΔA: pente de la droite donnée par le spectrophotomètre (ΔDO /min)

(2) ε (coefficient d'extinction molaire) (en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)**:** APADH (9020) et Formazan (12400)

(3) Volume total dans la cuve (µl): 1065 µl pour l'activité ODH et 1000 µl pour l'activité PDH

(4) Volume d'extrait (µL): 100 µl pour l'activité ODH et 50µl pour l'activité PDH.

V. Analyse de l'état de phosphorylation de la protéine OdhI

V.A. Préparation de l'échantillon

Les cellules sont mises en culture soit en réacteur ou en fiole d'Erlenmeyer. 45 ml de cellules sont prélevés (i) en début de phase de croissance ($1g.l^{-1}$) à 33°C, puis deux autres prélèvements sont effectués (ii) 1 heure après ce passage à 39°C et (iii) 3 heures après ce passage à 39°C. Les prélèvements se font le plus rapidement possible et sont maintenus dans la glace. Les échantillons sont centrifugés à 7000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 10 minutes à 4°C, puis les culots cellulaires sont suspendus dans 2 ml d'une solution tampon (100mM NaH_2PO_4, pH 7) contenant une solution d'anti-protéase (complete Mini EDTA-free (Roche)), d'inhibiteur de phosphatase (phénylméthylsulfonyl fluoride 1 mM, diisopropyl fluorophosphate 1 mM (Sigma)) et du PMFS (phénylméthylsulfonyfluoride 1mM (Sigma)). Ces suspensions cellulaires sont soniquées dans la glace (20 KHz, 200 Watts, 4 cycles de 30 secondes de sonication avec un intervalle de 1 min de refroidissement de l'extrait), puis le surnageant et les débris cellulaires sont séparés par une centrifugation à 10000 (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) rpm pendant 20 min à 4°C. Les protéines du surnageant sont dosées selon la méthode de Bradford afin d'estimer la quantité de protéines à déposer sur gel. 20 µg de protéines ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel à 15%.

V.B. Préparation des gels SDS-PAGE

La préparation des gels ainsi que les tampons de migration et de dépôt sont détaillées dans les Annexes I et II. Tout d'abord, nous avons procédé à la polymérisation du gel de séparation 15% acrylamide/bis acrylamide, puis du gel de concentration 4% acrylamide/bis acrylamide. Les extraits protéiques sont d'abord précipités dans de l'acétone (1 volume de protéine pour 5 volume d'acétone pendant au minimum 2 h à -20°C), puis centrifugés à 13000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 20 min à 4°C. Le culot protéique est dissout dans la solution de dépôt supplémentée au dernier moment avec 5% de ß-mercaptoéthanol (Annexe II). Le culot repris dans la solution de dépôt et de ß-mercaptoéthanol est chauffé 5 min à 100°C.

- Analyse par Western blot

Les protéines sont transférées à partir du gel sur une membrane de PVDF pendant 1 heure à 100V dans un tampon de transfert (Annexe II). Avant son utilisation, la membrane de PVDF doit être imbibée d'éthanol ou de méthanol. Les protéines chargées migrent vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes entre la membrane et les protéines. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques de la membrane est réalisé en incubant la membrane dans une solution de blocage contenant des protéines (2 g de lait en poudre dans 40 ml de tampon TBS-Tween20 (Annexe II)) pendant toute une nuit à 4°C sous faible agitation. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps anti OdhI dilué au 1/1000 pendant 1 heure sous faible agitation. L'anticorps polyclonal anti OdhI a été produit chez le lapin (cet anticorps nous a été fourni par l'équipe du Pr. Bott à Juelich en Allemagne). La membrane est ensuite lavée (3 × 10 minutes) dans 20 ml de tampon de lavage (1 ml de Tween 20 dans 1 litre de tampon TBS) (Annexe II) sous agitation, puis incubée pendant 1 h à température ambiante sous faible agitation avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/2000. Pour finir, la membrane est lavée comme décrit précédemment, puis révélée par l'ajout de substrat BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium). La révélation est arrêtée après quelques minutes en ajoutant 10 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4, pH 7, 0,5M).

VI. Analyse protéomique par gels d'électrophorèse bidimensionnelle (gel 2D)

L'analyse du protéome a été réalisée par électrophorèse bidimensionnelle. L'identification des protéines visualisées sur les gels a été obtenue par comparaison avec les

cartes protéomiques disponibles chez *C. glutamicum* ATCC 13032 (Barreiro *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2001)

VI.A. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés selon le protocole décrit dans le paragraphe C.1. La fraction protéique dessalée est utilisée pour estimer la concentration en protéine, puis un volume de surnageant est précipitée dans l'acétone (1 volume d'échantillon + 5 volumes d'acétone) au minimum 2h à -20°C. Les échantillons subissent une centrifugation à 13000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 20 min à 4°C. Pour l'étape de lavage, le culot est resuspendu d'abord dans de l'eau ultra pure (200 µl afin d'éliminer les sels restants), puis 1 ml d'acétone est rajouté. L'étape de lavage est très importante, car elle permet de se débarasser des sels qui interfèrent lors de la migration, de ce fait plusieurs lavages sont conseillés. Après centrifugation, le culot est repris dans un tampon de lyse (Urée 5,8 g; Eau 6 ml, CHAPS 0,5 g, une pointe de cône de bleu de bromophénol) + DTT (5 $mg.ml^{-1}$ rajouté extemporanément dans le tampon de lyse) et laissé pendant 2h à température ambiante; puis 2,5 µl d'ampholytes libres sont ajoutés dans le mélange. Des gels constitués de polyacrylamide sur lequel des ampholites ont été fixées de manière covalente ont été utilisés, il s'agit de bandelettes (IPG-strip d'une longeur de 7 cm). Le gradient pH utilisé est compris entre 4 et 7 (IPG-strip pH 4-7, Biorad). L'échantillon est déposé au centre du support d'hydratation (Figure 54 A), tout en évitant les bulles. Le film protecteur de la bandelette ou IPG strip est enlevé puis celui-ci est déposé très délicatement sur l'échantillon afin d'éviter les bulles et permettre une bonne répartition de l'échantillon sur toute la bandelette (Figure 54 B C et D) Les strips sont submergés d'huile (BIO-RAD) afin d'éviter les évaporations et la cristallisation de l'urée (environ 2 ml), puis laissées se réhydrater en présence d'échantillon toute une nuit.

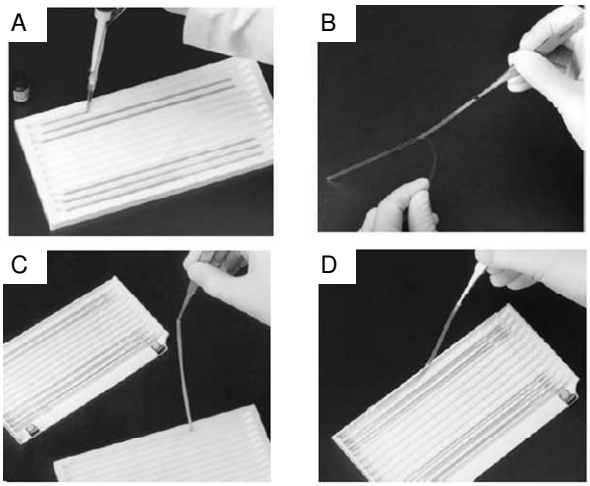


Figure 54 : Préparation des IPG-strips dans le support d'hydratation (Bio-Rad)

VI.B. Migration selon la première dimension

Après une nuit d'hydratation, les IPG-strips sont récupérés débarrassés de l'huile puis déposés dans l'IPGphor. Avant le dépôt des bandelettes, des petits papiers filtres (Bio rad) imbibés d'eau sont déposés au niveau des électrodes pour éviter tout déssèchement des IPG-strips. Enfin, les bandelettes sont recouvertes d'huile, le couvercle replacé et l'ensemble est mis sous tension. Les protéines migrent dans le gel avec une tension appliquée finale de 9000 $v.h^{-1}$, jusqu'à la valeur du pH égale à celle de leur point isoélectrique (pI) où leur charge est nulle. A l'issue de la migration, les IPG-strips peuvent être conservés à -20°C dans des tubes de type Falcon en attendant de préparer les gels selon 2ème dimension.

VI.C. Equilibration des strips (extemporanément)

L'étape d'équilibration est une étape nécessaire afin de saturer les IPG-strips en SDS (étape nécessaire à la 2ème migration). Cette étape d'équilibration est réalisée au dernier moment, après que le gel de séparation soit prêt à l'emploi.

Après migration, les IPG-strips sont retirés du support d'hydratation à l'aide de pinces, puis égouttés sur du papier absorbant afin d'enlever l'huile.

Chaque IPG-strips est placé délicatement dans un tube de type Falcon (le support plastique de IPG-strip est en contact avec la paroi du falcon), et mis au contact d'une solution d'équilibre contenant du DTT dite solution A (voir Annexe II) sous faible agitation pendant 10 min.

Les tubes sont par la suite vidés, et les IPG-Strips sont mis au contact d'une 2ème solution d'équilibration contenant du Iodoacétamide dite solution B (Voir Annexe II) sous faible agitation pendant 10 min.

Après équilibration, les IPG-strips sont égouttés puis utilisés immédiatement pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

VI.D. Migration selon la deuxième dimension

Le gel SDS-PAGE 2ème dimension permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire. Ce dernier est réalisé selon le protocole de l'annexe I. Seul le gel de séparation est préparé (le volume de ce dernier est multiplié par 4). Les IPG-strips issus de la première dimension sont scellés au sommet du gel SDS-PAGE polymérisé grâce à une solution gélifiante (Annexe II). Ce grand gel SDS-PAGE permettra de faire migrer les protéines contenues dans deux strips de façon simultanée.

Le gel migre dans une solution de migration d'électrophorèse (Annexe II) à 50 mA constant et à 200 V pendant 1h30. Après migration, le gel est fixé puis coloré toute une nuit dans une solution de Coomassie. La décoloration du gel se fait par plusieurs bains avec la solution décolorante (Annexe II) jusqu'à ce que les protéines soient bien visibles. Le gel est conservé dans une solution d'acide acétique à 5% (Annexe II).

VII. Analyse des lipides de l'enveloppe

VII.A. Préparation des cellules

Les cellules sont mises en culture soit en réacteur ou soit en fiole d'Erlenmeyer. 45 ml de cellules sont prélevés (i) en début de phase de croissance ($1 g.l^{-1}$) à 33°C, puis deux autres prélèvements sont effectués (ii) 1 heure après ce passage à 39°C et (iii) 3 heures après ce passage à 39°C. Les prélèvements sont maintenus dans la glace. Les échantillons sont centrifugés à 7000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) pendant 10 minutes à 4°C et les culots cellulaires sont lavés deux fois dans une solution de KCl 0,9 % puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

VII.B. Lipides extractibles

Les lipides solubles dans les solvants organiques sont extraits du culot bactérien humide avec un mélange chloroforme et méthanol. Trois mélanges $CHCl_3/CH_3OH$ sont préparés selon les proportions suivantes 1/2, 1/1 et 2/1 (V:V). Chacune des extractions est réalisée sur la nuit à température ambiante dans une fiole d'Erlenmeyer hermétiquement fermée et sous agitation. Les trois phases organiques sont réunies, puis filtrées sur un filtre préalablement taré. Le filtrat récupéré est séché à l'évaporateur rotatif puis les lipides séchés sont repris dans un mélange chloroforme/méthanol afin d'avoir 10 $mg.ml^{-1}$ de lipides extractibles. Ces derniers sont ensuite saponifiés. Pour cela, les 10 $mg.ml^{-1}$ de lipides extractibles sont traités pendant deux heures à 110°C dans 2 ml d'un mélange contenant de l'hydroxyde de potassium (KOH) (40%) et 7M/2-méthoxyéthanol selon un rapport 1/7 (V:V). A ce mélange réactionnel, 1 ml d'eau est rajouté puis une acidification (pH final égale à 1) est effectuée par ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique 20 % (vérification sur papier pH). Les acides gras sont extraits trois fois par 5 ml de diéthyléther dans une ampoule à décanter. La phase éthérée est ensuite lavée 3 fois à l'eau distillée. Si nécessaire du sulfate de sodium (Na_2SO_4) en poudre est rajouté pour éliminer les traces d'eau. Ensuite, la phase éthérée est évaporée. Les acides gras sont par la suite méthylés. Pour cela, 1 ml de diazométhane préparé extemporanément est ajouté au mélange d'acides gras pendant 30 minutes à température ambiante. Le mélange d'acides gras sous forme d'ester de méthyle est ramené à sec après méthylation. Puis une étape de triméthylsilylation (TMS) est nécessaire afin de dériver la position ß-hydroxy des acides gras avec un groupement O-triméthylsilyle (O-TMS). Au mélange d'acides gras sec sont ajoutés 6 gouttes de pyridine anhydre, 4 gouttes d'hexaméthyldislazanne et 2 gouttes de triméthylchlorosilane. Après 15 minutes à température ambiante, l'échantillon est séché sous flux d'azote et repris dans 1 ml d'éther de pétrole.

Quant aux bactéries délipidées retenues sur le filtre (appelés résidus bactériens), elles sont séchées à température ambiante pendant une la nuit puis pesées.

VII.C. Obtention des «lipides liés»

Les lipides non extraits par le mélange successif de $CHCl_3/CH_3OH$ sont dit «liés». Il s'agit des acides corynomycoliques liés de façon covalente à l'arabinogalactane. Ils sont obtenus par saponification des bactéries délipidées séchées. Pour cela les bactéries délipidées

sont écrasées avec une spatule, puis 4 ml du mélange KOH(40%) 7M /2-méthoxyéthanol (1/7, v:v) sont ajoutés pour effectuer la saponification. Puis, comme décrit précédemment, l'acidification, la méthylation et la triméthysilylation (TMS) sont effectuées.

VII.D. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse

La caractérisation des acides gras ainsi que les acides corynomycoliques présents dans les lipides extractibles ou des bactéries délipidées sont réalisées en chromatographie phase gazeuse (GC). La colonne utilisée est d'une longueur 2,5 m et de diamètre interne de 3,2 mm. Elle contient une phase stationnaire constituée par du SE30. La phase mobile est faite d'Hélium et le débit du gaz est de 20 ml/ minutes. La température du four est maintenue constante à 140°C, les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 250°C.

- Quantification des acides corynomycoliques et des acides gras :

La quantification des acides gras et corynomycoliques contenus dans les lipides extractibles et liés est définie à partir d'un pourcentage de rapport de masse.

VIII. Extraction des porines de la mycomembrane

VIII.A. Préparation des cellules

Les cellules sont prélevées lors d'une culture en réacteur. Trois prélèvements sont effectués, (i) un prélèvement à 33°C, (ii) un prélèvement à 39°C (1h) et (iii) un prélèvement à 39°C (3h). Les cellules sont collectées puis centrifugées à 7000 rpm (Aventi J-E, Centrifuger Beckman Coulter) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite lavées deux fois avec une solution de Tris-HCl 10 mM pH 8.

VIII.B. Extraction des porines

L'extraction des porines est réalisée sur les cellules entières ce qui limite la perte de matériel. Cette étape est réalisée dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml fermée avec un bouchon à jupe rabattable afin d'éviter l'évaporation du chloroforme.

Le culot est repris dans un mélange chloroforme / méthanol (1:2) selon le rapport suivant : un volume de culot pour 5 à 8 volumes de solvants. Cette suspension est placée à 30°C sous agitation à 130 rpm pendant environ 20 h. Elle est ensuite centrifugée, filtrée avec des filtres à solvant de 0,22 µm afin de récupérer le surnageant dans lequel se trouve les protéines dont les PorB et PorC. Le culot est une seconde fois repris dans le mélange

chloroforme / méthanol afin d'extraire un maximum de protéines. Une précipitation des protéines est réalisée en ajoutant au surnageant 9 fois son volume en diéthylether. Cette solution est placée au minimum une nuit à -20°C avant d'être centrifugée pendant 10 minutes à 10000 rpm (Aventi J-E, Centrifuger Beckman Coulter). Les protéines précipitées sont resuspendues dans une solution Tris-HCl 10 mM pH 8 avec 0,4 % de LDAO (N, N-diméthyldodécylamine-N-oxide).

Un dosage protéique par la méthode de Bradford est ensuite réalisé sur l'échantillon ainsi extrait pour déterminer la quantité à déposer sur un gel SDS-PAGE tricine.

VIII.C. Préparation des gels SDS-PAGE 10% tricine

Les échantillons déposés sur le gel sont préalablement concentrés pendant une nuit à l'acétone à -20°C. Le gel est constitué classiquement de 2 gels : le gel de concentration et le gel de séparation (Annexe III).

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford puis elles sont concentrées toute une nuit à l'acétone. Après centrifugation pendant 20 minutes à 13 000 rpm (Avanti ™ 30 Centrifuge, Beckman) à 4°C, le surnageant est éliminé pour garder uniquement le culot de protéines qui est repris dans une solution de dépôt (Annexe II) supplémenté par 5% de β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 100°C pendant 5 minutes. Une même quantité de protéine est déposée sur gel (20 µg).

La migration du gel se fait en présence de deux tampons de migration. Le tampon cathode et le tampon anode (Annexe III).

Les paramètres de migration sont fixés à 25 mA par gel et une tension maximael de 180 V est appliquée. Une fois la migration terminée, le gel est révélé au nitrate d'argent (Annexe III).

Annexes

Annexe I : Préparation des gels d'électrophorèse

Gel de séparation 15%, le volume total pour deux gels est de 20 ml

Réactifs	Volume
H_2O	4,7 ml
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	5 ml
SDS 10%	200 µl
Acryl/Bis 30: 0.8 %	10 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Gel de concentration 4%, le volume total pour deux gels est de 10 ml

Réactifs	Volume
H_2O	6,1 ml
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Acryl/Bis 30: 0.8 %	1,3 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Annexe II : Solutions et tampons utilisés

Solution de Coomassie colorante (pour 1L)

Coomassie R250 100 ml
Méthanol 400 ml
Acide acétique 75 ml
Qsp eau distillée

Solution décolorante (pour 1L)

Méthanol 400 ml
Acide acétique 75 ml
Qsp eau distillée

Tampon d'électrophorèse 10X (pour 1L)

Trisma (Tris Base) 30 g
Glycine 144 g
SDS 10 g

Solution acétique 5% (pour 1L)

Acide acétique 50 ml

Qsp eau distillée

Solution de dépôt des échantillons

H_2O 4,8 ml
Tris, 0,5M, pH 6.8 1,2 ml
(Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution d'HCl à 1 M)
Solution SDS 10% 2,0 ml
Glycérol 1,0 ml
Bleu de bromophénol 1pointe de cône

Tampon TBS à pH : 7,6+ Tween 20

-2,42 g Tris base (20 mM)
-8 g sodium chloride (137 mM)
} Ajuster pH avec HCl
Qsp eau distillée
Avant utilisation 1 ml de Tween 20 est rajouté à 1 litre de TBE.

Tampon de Transfert (pour 1 litre) :

Tris Base (25 mM)	3 $g.l^{-1}$
Glycine (192 mM)	14,4 $g.l^{-1}$
Méthanol ou éthanol 20%	200 $ml.l^{-1}$
Qsp eau distillé	

Solution gélifiante:

2% de gel d'agarose
98% de tampon de migration 1X
Une pointe de cône de bleu de Bromophénol
Bien homogénéiser et bien chauffer. Dès que cette préparation est tiède, elle est prête à l'emploi.

Solution A (Tampon I d'équilibre avec DTT)

6 M Urée
0,375 M et p H 8,8 Tris-HCl
(Le pH est ajusté à 8,8 avec une solution d'HCl à 1 M)
2% SDS
20% glycérol
2% ($^{w}/_{v}$) de DTT (extemporanément)

Solution B (Tampon II d'équilibre avec du Iodoacétamide)

6 M Urée
0,375 M et p H 8,8 Tris-HCl
(Le pH est ajusté à 8,8 avec une solution d'HCl à 1 M)
2% SDS
20% glycérol
2,5% ($^{w}/_{v}$) de Iodoacétamide (extemporanément)

Tampon de charge 5X

250µl glycérol 100%
200 µl H_2O ultra pure
50 µl EDTA 0.5 M pH: 8
1 pointe de cône de Bleu de Bromophénol

Tampon de charge 5X

1,3 M Tris
450 mM d'acide borique
25 mM d'EDTA.
H_2O

Annexe III : Solutions et tampons pour l'identification des porines

Composition des gels d'électrophorèse

(i) Gel de séparation 12,5% d'acrylamide (pour 20 ml)

Réactifs	Volume
Acryl/Bis 30: 0.8 %	6,66 ml
3X Tris-Tricine pH : 8,45	6,66 ml
Glycérol 100%	2 ml
H_2O	4,53 ml
Ammonium Persulfate (APS) 10%	125 µl
TEMED	10 µl

(ii) Gel de concentration 4 % d'acrylamide (pour 10 ml)

Réactifs	Volume
H_2O	7,75 ml
Tris-HCl 3M pH : 8.4	0,85 ml
SDS 10%	0,1 µl
Acryl/Bis 30: 0.8 %	1,3 ml
Ammonium Persulfate (APS) 10%	50 µl
TEMED	10 µl

3X Tris-Tricine (pH 8,45)

3 M Tris-HCl, pH 8,45
(Le pH est ajusté à 8,45 avec une solution d'HCl à 1 M)
0,3 % Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)

Tampon à la cathode, pH 8,25

0,1 M Tris
0,1 M Tricine
0,1 % ($^{w}/_{v}$) SDS
Vérifier le pH

Tampon à l'anode, 5X

1M Tris-HCl, pH 8,9

(Le pH est ajusté à 8,9 avec une solution d'HCl à 1 M)

Coloration du gel au nitrate d'argent

1ère étape: étape de fixation 20 minutes (au dernier moment)

200 ml méthanol

40 ml acide acétique

40 ml Fixative Enhancer Concentrate

120 ml d'eau distillée

Placer le gel dans cette solution pendant 20 min sous agitation.

2ème étape: étape de rinçage 20 minutes

Rincer le gel 2 fois 10 min avec de l'eau distillée.

3ème étape: étape de révélation (solution à préparer dans l'ordre 5 minutes avant son utilisation):

35 ml d'eau distillée

5 ml Silver Complex Solution

5 ml Reduction Moderator Solution

5 mL Image Development Reagent

50 mL Development Accelerator Solution*

*(peser 2,5 g de Development Accelerator Solution dans 50 mL d'eau distillée. A ajouter juste avant l'utilisation de cette solution.)

La révélation est maintenue jusqu'à l'apparation des protéines sur gel (entre 10 et 20 minutes)

4ème étape: arrêt de la réaction

Stopper la réaction avec une solution d'acide acétique à 5 %.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Abou-Zeid, C., Voiland, A., Michel, G. et Cocito, C. (1982). Structure of the wall polysaccharide isolated from a group of corynebacteria. *Eur J Biochem* **128**, 363-70.

Adam, A., Petit, J. F., Wietzerbin-Falszpan, J., Sinay, P., Thomas, D. W. et Lederer, E. (1969). L'acide N-glycolyl-muramique, constituant des parois de *Mycobacterium smegmatis* identification par spectrométrie de masse. *FEBS Lett* **4**, 87-92.

Aertsen, A., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Sermon, J., Hauben, K., Farewell, A., Nystrom, T. et Michiels, C. W. (2004). Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2660-6.

Anastassiadis, S. (2007). L-lysine fermentation. *Recent Pat Biotechnol* **1**, 11-24.

Ang, D., Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M. et Georgopoulos, C. (1991). Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* **266**, 24233-6.

Ankri, S. (1991). Structure et régulation de la glutamate déhydrogénase codée par gène gdh A chez *Corynebacterium glutamicum*, DEA CUST Clermont-Ferrand.

Archer, J. A., Solow-Cordero, D. E. et Sinskey, A. J. (1991). A C-terminal deletion in homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine. *Gene* **107**, 53-9.

Arsène, F., Tomoyasu, T. et Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**, 3-9.

Barksdale, L. (1970). *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev* **34**, 378-422.

Barreau, C., Bimet, F., Kiredjian, M., Rouillon, N. et Bizet, C. (1993). Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. *J Clin Microbiol* **31**, 2085-90.

Barreiro, C., González-Lavado, E., Brand, S., Tauch, A. et Martín, J. F. (2005). Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone. *J Bacteriol* **187**, 884-9.

Barreiro, C., González-Lavado, E., Pátek, M. et Martín, J. F. (2004). Transcriptional analysis of the groES-groEL1, groEL2, and dnaK genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J Bacteriol* **186**, 4813-7.

Barreiro, C., Nakunst, D., Huser, A. T., de Paz, H. D., Kalinowski, J. et Martin, J. F. (2009). Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**, 359-72.

Barth, E., Barcelo, M. A., Klackta, C. et Benz, R. (2010). Reconstitution experiments and gene deletions reveal the existence of two-component major cell wall channels in the genus *Corynebacterium*. *J Bacteriol* **192**, 786-800.

Barthe, P., Mukamolova, G. V., Roumestand, C. et Cohen-Gonsaud, M. (2010). The structure of PknB extracellular PASTA domain from *mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* **18**, 606-15.

Barthe, P., Roumestand, C., Canova, M. J., Kremer, L., Hurard, C., Molle, V. et Cohen-Gonsaud, M. (2009). Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism. *Structure* **17**, 568-78.

Belisle, J. T., Vissa, V. D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P. J. et Besra, G. S. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420-2.

Bellmann, A. (2000). Der lysinexportcarrier in *Corynebacterium glutamicum. Topologie und Regulation. Dissertation* **Universität Düsseldorf**.

Bellmann, A., Vrljic, M., Patek, M., Sahm, H., Kramer, R. et Eggeling, L. (2001). Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum. Microbiology* **147**, 1765-74.

Bendt, A. K., Burkovski, A., Schaffer, S., Bott, M., Farwick, M. et Hermann, T. (2003). Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum. Proteomics* **3**, 1637-46.

Beney, L. et Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 34-42.

Benz, R., Janko, K., Boos, W. et Lauger, P. (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli. Biochim Biophys Acta* **511**, 305-19.

Benz, R., Janko, K. et Lauger, P. (1979). Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli. Biochim Biophys Acta* **551**, 238-47.

Besra, G. S., Khoo, K. H., McNeil, M. R., Dell, A., Morris, H. R. et Brennan, P. J. (1995). A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 4257-66.

Bokas, D., Uy, D., Grattepanche, F., Duportail, G., Guedon, E., Delaunay, S. et Goergen, J. L. (2007). Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 773-81.

Bona, R. et Moser, A. (1997). Modeling of L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Bioproc Eng* **17**, 139-142.

Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F. et Leblond, G. (1990). Interspecies electro-transformation in corynebacteria. *FEMS Microbiology Letters* **66**, 263-270.

Booth, I. R., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U., Bartlett, W., Rasmussen, T., Rasmussen, A. et and Miller, S. (2007). Physiological analysis of bacterial mechanosensitive channels. *Methods Enzymol* **428**, 47-61.

Börmann-El Kholy, E. R., Eikmanns, B. J., Gutmann, M. et Sahm, H. (1993). Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum. Appl Environ Microbiol* **59**, 2329-2331.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

Brand, S., Niehaus, K., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2003). Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes cop1, cmt1, and cmt2 can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol* **180**, 33-44.

Brennan, P. J. et Lehane, D. P. (1971). The phospholipids of corynebacteria. *Lipids* **6**, 401-9.

Bucca, G., Brassington, A. M., Hotchkiss, G., Mersinias, V. et Smith, C. P. (2003). Negative feedback regulation of dnaK, clpB and lon expression by the DnaK chaperone machine in *Streptomyces coelicolor*, identified by transcriptome and in vivo DnaK-depletion analysis. *Mol Microbiol* **50**, 153-66.

Burkovski, A. (2003). Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 617-28.

Burkovski, A., Weil, B. et Kramer, R. (1996). Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **136**, 169-173.

Canova, M. J., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cleon, I., Cohen-Gonsaud, M., Cozzone, A. J., Becchi, M., Kremer, L. et Molle, V. (2008). The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c. *Proteomics* **8**, 521-33.

Castro, M. E., Molina, R., Díaz, W., Pichuantes, S. E. et Vásquez, C. C. (2008). The dihydrolipoamide dehydrogenase of *Aeromonas caviae* ST exhibits NADH-dependent tellurite reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **375** 91-4.

Chami, M., Bayan, N., Dedieu, J., Leblon, G., Shechter, E. et Gulik-Krzywicki, T. (1995). Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Biol Cell* **83**, 219-229.

Chami, M., Bayan, N., Peyret, J. L., Gulik-Krzywicki, T., Leblon, G. et Shechter, E. (1997). The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain. *Mol Microbiol* **23**, 483-92.

Clément, Y. et Laneelle, G. (1986). Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum* ? A working hypothesis. *J Gen Microbiol* **130**, 2589-2594.

Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A. et Lindley, N. D. (1996). Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 429-436.

Cocaign-Bousquet, M., Monnet, C. et Lindley, N. D. (1995). Batch kinectics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates : use of substrates mixtures to localise bottlenecks. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 526-530.

Cocaign, M. (1992). Croissance de *Corynebacterium glutamicum* sur divers substrats et répartion des flux dans les voies du métabolisme central.Thèse INSA Toulouse

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. et Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-44.

Collins, M. D. et Cummins, C. S. (1986). "Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neuhmann *1896*," Williams and Wilkins, Baltimore.

Collins, M. D., Goodfellow, M. et Minnikin, D. E. (1979). Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *J Gen Microbiol* **110**, 127-36.

Collins, M. D., Goodfellow, M. et Minnikin, D. E. (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J Gen Microbiol* **128**, 2503-9.

Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. et Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* **100**, 221-30.

Costa-Riu, N., Burkovski, A., Kramer, R. et Benz, R. (2003a). PorA represents the major cell wall channel of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **185**, 4779-86.

Costa-Riu, N., Maier, E., Burkovski, A., Kramer, R., Lottspeich, F. et Benz, R. (2003b). Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **50**, 1295-308.

Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., van Nues, R. W. et Wood, J. M. (1993). Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene proP reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J Mol Biol* **229**, 268-76.

Daffe, M. et Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**, 131-203.

Daffe, M., McNeil, M. et Brennan, P. J. (1993). Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacyerium, Rhodococcus*, and *Nocardia spp*. *Carbohydr Res* **249**, 383-398.

Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M. et Bork, P. (1999). Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem J* **343** 115-24.

De Sousa-D'Auria, C., Kacem, R., Puech, V., Tropis, M., Leblon, G., Houssin, C. et Daffe, M. (2003). New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 35-44.

Debay, F. (1997). Etude cinétique de la fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation physiologique par cytométrie en flux, Thèse INPL Nancy.

Delaunay, S. (1995). Détermination d'activités enzymatiques influençant la production d'acides aminés chez *Corynebacterium glutamicum.* DEA INPL Nancy.

Delaunay, S. (1999). Etude et modification du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate. Thèse INPL Nancy.

Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.-M., Lindley, N. D. et Goergen, J.-L. (1999b). An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enz Microbiol Technol* **25**, 762-768.

Delaunay, S., Lapujade, P., Engasser, J. M. et Goergen, J. L. (2002). Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 333-7.

Delaunay, S., Uy, D., Baucher, M. F., Engasser, J. M., Guyonvarch, A. et Goergen, J. L. (1999a). Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. *Metab Eng* **1**, 334-43.

Demain, A. L. et Birnbaum, J. (1968). Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Curr Top Microbiol Immunol* **46**, 1-25.

Deutscher, J., Galinier, A. et Martin-Verstraete, I. (2002). "Carbohydrate Uptake and Metabolism," American Society for Microbiology Press, Washington.

Dougan, D. A., Mogk, A. et Bukau, B. (2002). Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1607-16.

Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A., Letellier, L. et Shechter, E. (1992). Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim Biophys Acta* **1103**, 250-8.

Durocher, D. et Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Lett* **513**, 58-66.

Eggeling, L. et Bott, M. (2005). "*Corynebacterium glutamicum*, Taylor and Francis Group (ed). p616."

Eggeling, L. et Sahm, H. (1999). L-glutamate and L-lysine : traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 146-153.

Eggeling, L. et sahm, H. (2001). The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux *J Biosci Bioeng* **92**, 201-213.

Eggeling, L. et Sahm, H. (2003). New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **180**, 155-60.

Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M. et Yukawa, H. (2009). Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *J Bacteriol* **191**, 2964-72.

Engelhardt, H., Heinz, C. et Niederweis, M. (2002). A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **277**, 37567-72.

Engels, V., Lindner, S. N. et Wendisch, V. F. (2008). The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **190**, 8033-44.

England, P., Wehenkel, A., Martins, S., Hoos, S., André-Leroux, G., Villarino, A. et Alzari, P. M. (2009). The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling. *FEBS Lett* **583**, 301-7.

Faller, M., Niederweis, M. et Schulz, G. E. (2004). The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**, 1189-92.

Fiuza, M., Canova, M. J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A. J., Mateos, L. M., Kremer, L., Gil, J. A. et Molle, V. (2008). From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem* **283**, 18099-112.

Gaigalat, L., Schluter, J. P., Hartmann, M., Mormann, S., Tauch, A., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2007). The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol Biol* **8**, 104.

Gailly, C., Sandra, P., Verzele, M. et Cocito, C. (1982). Analysis of mycolic acids from a group of corynebacteria by capillary gas chromatography and mass spectrometry. *Eur J Biochem* **125**, 83-94.

Goergen, J. L., Debay, F. et Engasser, J. (1997). "Contraintes physiologiques favorables à la surproduction d'acide glutanique par corynebactéries," Société Française de Microbiologie, Paris.

Gourdon, P. (1999). Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: Quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Thèse INSA Toulouse

Gourdon, P. et Lindley, N. D. (1999). Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **1**, 224-31.

Gourdon, P., Raherimandimby, M., Dominguez, H., Cocaign-Bousquet, M. et Lindley, N. D. (2003). Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 77-85.

Grandvalet, C., Rapoport, G. et Mazodier, P. (1998). hrcA, encoding the repressor of the groEL genes in *Streptomyces albus* G, is associated with a second dnaJ gene. *J Bacteriol* **180**, 5129-5134.

Grandvalet, C., Servant, P. et Mazodier, P. (1997). Disruption of hspR, the repressor gene of the dnaK operon in *Streptomyces albus G*. *Mol Microbiol* **23**, 77-84.

Guillouet, S. et Engasser, J. M. (1995). Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth

rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**, 496-500.

Guillouet, S. et Engasser, J. M. (1996). Kinetics of volume variation of *Corynebacterium glutamicum* following saline osmotic upshifts. *Biotechnol Lett* **18**, 145-148.

Gunsalus, I. C. et Shuster, C. W. (1961). Energy-yielding metabolism in Bacteria. *The Bacteria* **2**, 1-28.

Gutmann, M., Hoischen, C. et Kramer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim Biophys Acta* **1112**, 115-23.

Guyot, S. (2007). Influence de la cinetique d'un stress thermique sur la physiologie cellulaire., Thése Dijon.

Hasegawa, T., Hashimoto, K., Kawasaki, H. et Nakamatsu, T. (2008). Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng* **105**, 12-9.

Hatakeyama, K., Hohama, K., Vertes, A. A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. et Yukawa, H. (1993a). Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the bioA-bioD genes from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* **4**, 177-84.

Hatakeyama, K., Kohama, K., Vertes, A. A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. et Yukawa, H. (1993b). Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: cloning and sequencing of the bioB gene from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* **4**, 87-93.

Haugland, R. P. (2002). "Handbook Fluorescent Probes and Research Chemichals," Molecular Probes.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Kobel, P. A., Gamo, F. J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M. et Paddon, C. (2001). Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* **183**, 7318-28.

Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. et Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6602-6.

Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**, 155-72.

Hermann, T., Finkemeier, M., Pfefferle, W., Wersch, G., Kramer, R. et Burkovski, A. (2000). Two-dimensional electrophoretic analysis of *Corynebacterium glutamicum* membrane fraction and surface proteins. *Electrophoresis* **21**, 654-9.

Hermann, T. et Kramer, R. (1996). Mechanism and Regulation of Isoleucine Excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3238-3244.

Hermann, T., Pfefferle, W., Baumann, C., Busker, E., Schaffer, S., Bott, M., Sahm, H., Dusch, N., Kalinowski, J., Puhler, A., Bendt, A. K., Kramer, R. et Burkovski, A. (2001). Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 1712-23.

Hoischen, C. et Kramer, R. (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**, 3409-16.

Hoischen, C. et Krâmer, R. (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum Arch Microbiol* **151**, 342-347.

Huc, E., Meniche, X., Benz, R., Bayan, N., Ghazi, A., Tropis, M. et Daffe, M. (2010). O-mycoloylated proteins from Corynebacterium: an unprecedented post-translational modification in bacteria. *J Biol Chem* **285**, 21908-12.

Huchenq, A. (1983). Excrétion du glutamate par *Corynebacterium glutamicum* : réexamen des altérations membranaires déclenchant l'excrétion, Toulouse.

Huchenq, A., Marquet, M., Welby, M., Montrozier, H., Goma, G. et Laneelle, G. (1984). Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann Microbiol (Paris)* **135B**, 53-67.

Hultgren, S. J., Normark, S. et Abraham, S. N. (1991). Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu Rev Microbiol* **45**, 383-415.

Hunten, P., Costa-Riu, N., Palm, D., Lottspeich, F. et Benz, R. (2005). Identification and characterization of PorH, a new cell wall channel of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochim Biophys Acta* **1715**, 25-36.

Ikeda, M. (2003). Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng* **79**, 2-35.

Ikeda, M. et Nakagawa, S. (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 99-109.

Imhoff, J. F. (1986). Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 57-66.

Ioneda, T., Lopes, S. C. et Gesztesi (1981). Mycolic acid-containing glycolipids of nocardiae and related organism. *Zentralbl Bakt Suppl* **11**, 401.

Ioneda, T. et Silva, C. L. (1979). Purification of 1-monoacylglycerols containing alpha-branched-beta-hydroxylated fatty acids from lipids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Chem Phys Lipids* **25**, 85-91.

Ishida, M., Kawashima, H., Sato, K., Hashiguchi, K., Ito, H., Enei, H. et Nakamori, S. (1994). Factors improving L-threonine production by a three L-threonine biosynthetic genes-amplified recombinant strain of *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 768-70.

Jap, B. K. (1988). High-resolution electron diffraction of reconstituted PhoE porin. *J Mol Biol* **199**, 229-31.

Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I. et Tauch, A. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**, 5-25.

Kamada, N., Yasuhara, A., Takano, Y., Nakano, T. et Ikeda, M. (2001). Effect of transketolase modifications on carbon flow to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 710-7.

Kang, C. M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C. et Husson, R. N. (2005). The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* **19**, 1692-704.

Kanzaki, T., Okazaki, H., Sugawara, A. et Fukuda, H. (1967). L-glutamic acid fermentation. Part IV. The remation between the cellular fatty acid contents and the productivity of L-glutamic acid. *Agric Biol Chem* **31**, 1416-1420.

Kanzaki, T., Sugiyama, Y., Kitano, K., Ashida, Y. et Imada, I. (1974). Quinones of *Brevibacterium*. *Biochim Biophys Acta* **348**, 162-5.

Kartmann, B., Stenger, S. et Niederweis, M. (1999). Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **181**, 6543-6.

Kato, K., Strominger, J. L. et Kotani, S. (1968). Structure of the cell wall of *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mechanism of hydrolysis by the L-3 enzyme and the structure of the peptide. *Biochemistry* **7**, 2762-73.

Kawahara, Y., Takahashi-Fuke, K., Shimizu, E., Nakamatsu, T. et Nakamori, S. (1997). Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate

dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1109-12.

Kennerknecht, N., Sahm, H., Yen, M. R., Patek, M., Saier Jr, M. H., Jr. et Eggeling, L. (2002). Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol* **184**, 3947-56.

Kim, J., Fukuda, H., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Nagai, K., Wachi, M. et Shimizu, H. (2009b). Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1-10.

Kim, J., Hirasawa, T., Sato, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C. et Shimizu, H. (2009a). Effect of odhA overexpression and odhA antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 1097-106.

Kimura, E. (2003). Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 37-57.

Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y. et Nakamatsu, T. (1996). Molecular cloning of a novel gene, dtsR, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1565-70.

Kimura, E., Yagoshi, C., Kawahara, Y., Ohsumi, T., Nakamatsu, T. et Tokuda, H. (1999). Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1274-1278.

Kinoshita, S. (1987). Amino acid and nucleotide fermentations: From their genesis to the current state. *Developments in industrial Microbiology* **28**, 1-12.

Kinoshita, Y., Udaka, S. et Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**, 193-205.

Kramer, R. (2009a). Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* **37**, 487-97.

Kramer, R. (2009b). Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection
Amino Acids **37**, 487-97.

Krämer, R. (1994). Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism *FEMS Microbiol Rev* **13**, 75-79.

Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Kramer, R., Sahm, H. et Eggeling, L. (1995). Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**, 1152-8.

Kuhry, J. G., Fonteneau, P., Duportail, G., Maechling, C. et Laustriat, G. (1983). TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys* **5**, 129-40.

Kumar, G., Kalra, V. K. et Brodie, A. F. (1979). Asymmetric distribution of phospholipids in membranes from *Mycobacterium phlei*. *Arch Biochem Biophys* **198**, 22-30.

Kundig, W., Kundig, F. D., Anderson, B. et Roseman, S. (1966). Restoration of active transport of glycosides in *Escherichia coli* by a component of a phosphotransferase system. *J Biol Chem* **241**, 3243-6.

Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M. et Kramer, R. (1995). Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4334-4342.

Lamhonwah, A. M., Barankiewicz, T. J., Willard, H. F., Mahuran, D. J., Quan, F. et Gravel, R. A. (1986). Isolation of cDNA clones coding for the alpha and beta chains of human propionyl-CoA carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4864-8.

Lanéelle, M. A. et Asselineau, J. (1977). Glycolipids of *Brevibacterium vitarumen*. *Biochim Biophys Acta* **486**, 205.

Lapujade, P. (2000). Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate : importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate, Thèse INPL de Loraine Nancy.

Lapujade, P., Goergen, J. L. et Engasser, J. M. (1999). Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **1**, 255-61.

Lederer, E., Pudles, J., Barbezat, S. et Trillat, J. J. (1952). Sur la constitution chimique de l'acide corynomycolique de *Bacille diphtérique*. *Bull Soc Chim* **19**, 95.

Lemassu, A. et Daffe, M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **297** 351-7.

Lemassu, A., Ortalo-Magne, A., Bardou, F., Silve, G., Laneelle, M. A. et Daffe, M. (1996). Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology* **142** 1513-20.

Lengeler, J. W. et Jahreis, K. (1996). "Phosphotransferase systems pr PTSs as carbohydrate transport and as signal transduction systems."

Lengeler, J. W., Titgemeyer, F., Vogler, A. P. et Wohrl, B. M. (1990). Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**, 489-504.

Lennarz, W. J. (1966). Lipid metabolism in the bacteria. *Adv Lipid Res* **4**, 175-225.

Leonard, C. J., Aravind, L. et Koonin, E. V. (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res* **8**, 1038-47.

Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Kramer, R. et Benz, R. (1998). Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* **37**, 15024-32.

Lichtinger, T., Heym, B., Maier, E., Eichner, H., Cole, S. T. et Benz, R. (1999). Evidence for a small anion-selective channel in the cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG besides a wide cation-selective pore. *FEBS Lett* **454**, 349-55.

Lichtinger, T., Riess, F. G., Burkovski, A., Engelbrecht, F., Hesse, D., Kratzin, H. D., Kramer, R. et Benz, R. (2001). The low-molecular-mass subunit of the cell wall channel of the Gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. Immunological localization, cloning and sequencing of its gene porA. *Eur J Biochem* **268**, 462-9.

Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. et Schleifer, K. H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 255-60.

Liu, J., Rosenberg, E. Y. et Nikaido, H. (1995). Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11254-8.

Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M. et Smith, I. (2002). Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* **45**, 365-74.

Marienfeld, S., Uhlemann, E. M., Schmid, R., Kramer, R. et Burkovski, A. (1997). Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**, 291-7.

Marquet, M., uribelarrea, J. L., Huchenq, A., Laneelle, G. et Goma, G. (1986). Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl Microbiol Biotechnol* **25**, 220-223.

McNeil, M., Daffe, M. et Brennan, P. J. (1990). Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* **265**, 18200-6.

Melchior, D. L. et Steim, J. M. (1976). Thermotropic transitions in biomembranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* **5**, 205-38.

Meniche, X. (2007). Importance du tréhalose et des acides mycoliques dans l'ultrastructure et la perméabilité de l'enveloppe des *Corynebacterineae*, Thèse Universite Toulouse III-Paul Sabatier Toulouse.

Meniche, X., Labarre, C., de Sousa-d'Auria, C., Huc, E., Laval, F., Tropis, M., Bayan, N., Portevin, D., Guilhot, C., Daffe, M. et Houssin, C. (2009). Identification of a stress-induced factor of *Corynebacterineae* that is involved in the regulation of the outer membrane lipid composition. *J Bacteriol* **191**, 7323-32.

Mermelstein, L. D. et Papoutsakis, E. T. (1993). In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1077-81.

Miescher, G. M. (1975). *U.S. patent 3 929 575*.

Minnikin, D. E., ed. (1982). "lipids : complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles," Vol. 1, pp. 1-95-184. the Biology of the Mycobacteria, London.

Minnikin, D. E. et Goodfellow, M. (1978). "Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa," Academic Press, London.

Möckel, B., Marx, A. et Pfefferle, W. (2002). Novel nucleotide sequences coding for the *glbO* gene *Patent EP 1287143*.

Möker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Krämer, R., Morbach, S. et Bott, M. (2004). Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**, 420-38.

Momose, H. et Takagi, T. (1978). Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum* , a novel fermentation process. *Agric Biol Chem* **42**, 1911-1917.

Moon, M., kim, H., Oh, T., Shin, C., Lee, J., Kim, S. et Lee, J. (2005). Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters* **244**, 259-266.

Moon, M. W., Park, S. Y., Choi, S. K. et Lee, J. K. (2007). The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 43-50.

Mori, M. et Shiio, I. (1983). Glutamate transport and production in *Brevibacterium flavum*. *Agric Biol Chem* **47**, 983-990.

Mykytczuk, N. C., Trevors, J. T., Leduc, L. G. et Ferroni, G. D. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* **95**, 60-82.

Nakae, T. (1976). Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 877-84.

Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. et Wachi, M. (2007). Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4491-8.

Nakamura, J., Izui, H. et Nakamatsu, T. (2001). Bacterium producing L-glutamic acid and method for producing L-glutamic acid. *European Patent Application 1 174 508*.

Nakanishi, T., Nakajima, J. et kanda, K. (1975). Amino Acid and Nucleic Acid. **33**, 56-63.

Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M. et Doi, M. (1970). Microbial production of L-glutamic acid from n-paraffin by glycerol auxotrophs. *Agric Biol Chem* **34**, 1875-1876.

Nampoothiri, K. M., Hoischen, C., Bathe, B., Mockel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H. et Eggeling, L. (2002). Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 89-96.

Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B. et Bott, M. (2006). Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J Biol Chem* **281**, 12300-7.

Niederweis, M., Ehrt, S., Heinz, C., Klocker, U., Karosi, S., Swiderek, K. M., Riley, L. W. et Benz, R. (1999). Cloning of the mspA gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**, 933-45.

Niederweis, M., Maier, E., Lichtinger, T., Benz, R. et Kramer, R. (1995). Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**, 5716-8.

Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* **269**, 3905-8.

Nikaido, H., Kim, S. H. et Rosenberg, E. Y. (1993). Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol* **8**, 1025-30.

Nottebrock, D., Meyer, U., Kramer, R. et Morbach, S. (2003). Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 305-9.

Nunheimer, T. D., Birnbaum, J., Ihnen, E. D. et Demain, A. L. (1970). Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl Microbiol* **20**, 215-7.

O'Hare, H. M., Duran, R., Cervenansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A. M., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K. et Alzari, P. M. (2008). Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* **70**, 1408-23.

Okazaki, H., Kanzaki, T., Doi, M., Sumino, Y. et Fukuda, H. (1967). L-Glutamic acid fermentation. II. The production of L-glutamic acid by an oleic-acid requiring mutant. *Agric Biol Chem* **31**, 1314-1317.

Ortalo-Magne, A., Dupont, M. A., Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P. et Daffe, M. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141 (Pt 7)**, 1609-20.

Otsuka, S. I. et Shiio, I. (1968). Fatty acid composition of cell wall cell membrane fraction from *Brevibacterium flavum*. *J Appl Bacteriol* **14**, 135-146.

Ozaki, H. et Shiio, I. (1983). Production of lysine by pyruvate kinase mutants of *Brevibacterium flavum Agric Biol Chem* **47**, 1569-1576.

Palmieri, L., Berns, D., Kramer, R. et Eikmanns, B. J. (1996). Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch microbiol* **165**, 48-54.

Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G. A., Weil, B., Kramer, R. et Titgemeyer, F. (2001). *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 423-8.

Park, S. Y., Kim, H. K., Yoo, S. K., Oh, T. K. et Lee, J. K. (2000). Characterization of glk, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 209-15.

Paul, T. R. et Beveridge, T. J. (1992). Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J Bacteriol* **174**, 6508-17.

Paulsen, I. T., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. et Saier, M. H., Jr. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* **301**, 75-100.

Peyret, J. L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Schechter, E. et Leblon, G. (1993). Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **9**, 97-109.

Pfefferle, W., Marx, A. et Möckel, B. (2001). Polynucleotide sequences from *Corynebacterium glutamicum* coding for succinate dehydrogenase (*sdhA*,*sdhB*,*sdhC*). *Patent EP 1106684*.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. et Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-94.

Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G. et Daffe, M. (2000). Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol* **35**, 1026-41.

Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R. et Daffe, M. (2001). Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**, 1365-82.

Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L. Y., Gicquel, B. et Daffe, M. (2002). Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **44**, 1109-22.

Radmacher, E., Alderwick, L. J., Besra, G. S., Brown, A. K., Gibson, K. J., Sahm, H. et Eggeling, L. (2005a). Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **151**, 2421-7.

Radmacher, E., Stansen, K. C., Besra, G. S., Alderwick, L. J., Maughan, W. N., Hollweg, G., Sahm, H., Wendisch, V. F. et Eggeling, L. (2005b). Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **151**, 1359-68.

Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov , S., Jacobs, W. R. J. et Husson, R. N. (2001). The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **183**, 6119-25.

Rastogi, N. (1991). Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res Microbiol* **142**, 464-76.

Raymond, J. B., Mahapatra, S., Crick, D. C. et Pavelka, M. S., Jr. (2005). Identification of the namH gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *J Biol Chem* **280**, 326-33.

Raynaud, C., Papavinasasundaram, K. G., Speight, R. A., Springer, B., Sander, P., Bottger, E. C., Colston, M. J. et Draper, P. (2002). The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**, 191-201.

Reinscheid, D. J., Schnicke, S., Rittmann, D., Zahnow, U., Sahm, H. et Eikmanns, B. J. (1999). Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase. *Microbiology* **145 (Pt 2)**, 503-13.

Reizer, J., Peterkofsky, A. et Romano, A. H. (1988). Evidence for the presence of heat-stable protein (HPr) and ATP-dependent HPr kinase in heterofermentative *lactobacilli* lacking phosphoenolpyruvate : glycose phosphotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2041-2045.

Richter, W., Hanel, F. et Hilliger, M. (1985). Freeze-fracture observations of *Corynebacterium glutamicum*: the occurrence of an outer membrane-like structure and the influence of temperature on the cytoplasmic membrane. *J Basic Microbiol* **25**, 527-36.

Riess, F. G., Lichtinger, T., Cseh, R., Yassin, A. F., Schaal, K. P. et Benz, R. (1998). The cell wall porin of *Nocardia farcinica*: biochemical identification of the channel-forming protein and biophysical characterization of the channel properties. *Mol Microbiol* **29**, 139-50.

Russell, N. J. (1984). Mechanisms of thermal adaption in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem Sci* **9**, 108-12.

Saier, M. H., Jr. et Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**, 755-764.

Saier, M. H. J., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J. et Ye, J. J. (1996). Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **142** 217-30.

Saier, M. H. J., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K. et Lee, C. A. (1988). Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *FASEB J.* **2**, 199-208.

Salton, M. R. (1963). The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. *J Gen Microbiol* **30**, 223-35.

Sano, C. (2009). History of glutamate production *American Journal of Clinical Nutrition* **90**, 7285-7325.

Schiffler, B., Barth, E., Daffe, M. et Benz, R. (2007). *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall. *J Bacteriol* **189**, 7709-19.

Schleifer, K. H. et Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol.Rev.* **36**, 407.

Schultz, C., Niebisch, A., Gebel, L. et Bott, M. (2007). Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 691-700.

Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M. et Bott, M. (2009). Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-

essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol Microbiol* **74**, 724-41.

Schwinde, J. W., Hertz, P. F., Sahm, H., Eikmanns, B. J. et Guyonvarch, A. (2001). Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the lpd gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* **147**, 2223-31.

Seep-Feldhaus, A. H., Kalinowski, J. et Puhler, A. (1991). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* lysl gene involved in lysine uptake. *Mol Microbiol* **5**, 2995-3005.

Senaratne, R. H., Mobasheri, H., Papavinasasundaram, K. G., Jenner, P., Lea, E. J. et Draper, P. (1998). Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **180**, 3541-7.

Senn, M., Ioneda, T., Pudles, J. et Lederer, E. (1967). Mass spectometry of glycolipids. I. Structure of the "cord factor" of *Corynebacterium diphtheriae*. *Eur J Biochem* **1**, 353-6.

Servant, P., Grandvalet, C. et Mazodier, P. (2000). The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3538-43.

Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L. et Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**, 486-96.

Shibukawa, M., Kurima, M., okabe, S. et Ohsawa, T. (1968). L-glutamic acid fermentation with molasses. Part X. On the diffenrence in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate between fatty acid derivative and penicillin. *Agric Biol Chem* **32**, 641-645.

Shibukawa, M., Kurima, M. et Oruchi, S. (1970). L-Glutamic acid fermentation with molasses. XII. Relationship between the kind of phospholipids and their fatty acid composition in the mechanism of extracellular accumulation of L-glutamate. *Agric Biol Chem* **34**, 1136.

Shiio, I., Momose, H. et Oyama, A. (1969). Genetic and biochemical studies on bacterial formation of L-glutamate I. Relationship between isocitrate lyase, acetate kinase and phosphate acetyltransferase levels and glutamate production in *Brevibacterium flavum*. *J Gen Appl Microbiol* **15**, 27-40.

Shiio, I., Ohtska, S. et Takahashi, M. (1961). Significance of α-ketoglutarate dehydrogenase on the glutamic acid formation in *Brevibacterium flavum J Biochem* **50**, 164-165.

Shiio, I., Okazaki, H. et Mori, M. (1982). Glutamate metabolism in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum Agric Biol Chem* **46**, 493-500.

Shiio, I. et Ozaki, H. (1970). Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J Biochem* **68**, 633-47.

Shiio, I., Toride, Y. et Sugimoto, S. (1984). Production of lysine by pyruvate dehydrogenase mutants of *Brevibacterium flavum Agric.Biol.Chem* **48**, 3091-3098.

Shiio, I. et Ujigawa-Takeda, K. (1980). Presence and regulation of a-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium favum*. *Agric Biol Chem* **44**, 1897-1904.

Shimakata, T. et Minatogawa, Y. (2000). Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Arch Biochem Biophys* **380**, 331-8.

Shimizu, H. (2002). Metabolic engineering--integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J Biosci Bioeng* **94**, 563-73.

Shingu, H. et Terui, G. (1971). Studies on the process of glutamic acid fermentation at the enzyme level: I. On the changes of α-ketoglutaric acid dehydrogenase in the course of culture. *J Ferment Technol* **49**, 400-405.

Shiratsuchi, M., Kunonuma, H., Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Miwa, H. et Nakamori, S. (1995). Simultaneous and high fermentative production of L-lysine and L-glutalic acid using a strain of *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 83-86.

Simic, P., Sahm, H. et Eggeling, L. (2001). L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **183**, 5317-24.

Simic, P., Willuhn, J., Sahm, H. et Eggeling, L. (2002). Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3321-7.

Song, T., Dove, S. L., Lee, K. H. et Husson, R. N. (2003). RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol Microbiol* **50**, 949–959.

Soual-Hoebeke, E., de Sousa-D'Auria, C., Chami, M., Baucher, M. F., Guyonvarch, A., Bayan, N., Salim, K. et Leblon, G. (1999). S-layer protein production by *Corynebacterium* strains is dependent on the carbon source. *Microbiology* **145 (Pt 12)**, 3399-408.

Stansen, C., Uy, D., Delaunay, S., Eggeling, L., Goergen, J. L. et Wendisch, V. F. (2005). Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5920-8.

Stephan, J., Bender, J., Wolschendorf, F., Hoffmann, C., Roth, E., Mailander, C., Engelhardt, H. et Niederweis, M. (2005). The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. *Mol Microbiol* **58**, 714-30.

Stewart, G. R., Wernisch, L., Stabler, R., Mangan, J. A., Hinds, J., Laing, K. G., Young, D. B. et Butcher, P. D. (2002). Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**, 3129-3138.

Stock, J. B., Ninfa, A. J. et Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 450-90.

Stuible, H. P., Wagner, C., Andreou, I., Huter, G., Haselmann, J. et Schweizer, E. (1996). Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in Brevibacterium ammoniagenes. *J Bacteriol* **178**, 4787-93.

Sun, Z., Yu, Z., Yang, Y., Jin, H. et Yan, H. (1989). Fermentation production of L-glutamic acid from rice hydrolisate temperature-sensitive mutant *Corynebacterium crenatum N 1*. *Gongye Weishengwy* **19**, 9-14.

Suutari, M. et Laakso, S. (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol* **20**, 285-328.

Takinami, K., Yamada, Y. et Okada, H. (1966). Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Part III. Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* **30**, 674-682.

Takinami, K., Yoshii, H., Tsuri, H. et odaka, H. (1965). Biochemical effect of fatty and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. III. Biotin-tween 60 relationship in the

accumulation of L-glutamic acid and growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* **29**, 351-359.

Tauch, A., Kaiser, O., Hain, T., Goesmann, A., Weisshaar, B., Albersmeier, A., Bekel, T., Bischoff, N., Brune, I., Chakraborty, T., Kalinowski, J., Meyer, F., Rupp, O., Schneiker, S., Viehoever, P. et Puhler, A. (2005). Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J Bacteriol* **187**, 4671-82.

Teshiba, S. e. F., A (1989). "Production of nucleotides by fermentation."

Toriyama, S., Yano, I., Masui, M., Kusunose, E., Kusunose, M. et Akimori, N. (1980). Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria. I. Temperature-induced changes in mycolic acid molecular species and related compounds in *Mycobacterium phlei*. *J Biochem* **88**, 211-21.

Trevors, J. T. (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods* **57**, 87-103.

Trias, J. et Benz, R. (1993). Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. Demonstration of voltage gating and of negative point charges at the channel mouth. *J Biol Chem* **268**, 6234-40.

Trias, J. et Benz, R. (1994). Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **14**, 283-90.

Trias, J., Jarlier, V. et Benz, R. (1992). Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**, 1479-81.

Tsumita, T. (1956). Studies on the lipid of BCG. I. Glyceryl mono-mycolate in wax C fraction of the lipid of BCG. *Jpn J Med Sci Biol* **9**, 205-16.

Tzvetkov, M., Klopprogge, C., Zelder, O. et Liebl, W. (2003). Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. *Microbiology* **149**, 1659-73.

Udaka, S. (1960). Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J Bacteriol* **79**, 754-5.

Uy, D. (2003). Etude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique: instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit, Thèse INPL Nancy.

Uy, D., Delaunay, S., Germain, P., Engasser, J. M. et Goergen, J. L. (2003). Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol* **104**, 173-84.

Vallino, J. J. et Stephanopoulos, G. (1994). Carbon flux distribution at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnol. Prog.* **10**, 320-326.

Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F. et van Sinderen, D. (2006). How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 734–759.

Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S. T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Cervenansky, C. et Alzari, P. M. (2005). Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* **350**, 953-63.

Von der Osten, C. H., Gioannetti, C. et Sinskey, A. J. (1989). Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol Lett* **11**, 11-16.

Vrljic, M., Kronemeyer, W., Sahm, H. et Eggeling, L. (1995). Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J Bacteriol* **177**, 4021-7.

Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G. et Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**, 1800-4.

Walker, T. E., Han, C. H., Kollman, V. H., London, R. E. et Matwiyoff, N. A. (1982). 13C nuclear magnetic resonance studies of the biosynthesis by *Microbacterium ammoniaphilum* of L-glutamate selectively enriched with carbon-13. *J Biol Chem* **257**, 1189-95.

Wehrmann, A., Morakkabati, S., Kramer, R., Sahm, H. et Eggeling, L. (1995). Functional analysis of sequences adjacent to dapE of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of aroP, which encodes the aromatic amino acid transporter. *J Bacteriol* **177**, 5991-3.

Wehrmann, A., Phillipp, B., Sahm, H. et Eggeling, L. (1998). Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **180**, 3159-65.

Wickner, S. et Maurizi, M. R. (1999). Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8318-20.

Wietzerbin, J., Das, B. C., Petit, J. F., Lederer, E., Leyh-Bouille, M. et Ghuysen, J. M. (1974). Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of Mycobacteria. *Biochemistry* **13**, 3471-6.

Winter, J. et Jakob, U. (2004). Beyond transcription--new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 297-317.

Wolf, A. (2002). Trehalosesynthese in *Corynebacterium glutamicum*. *Dissertation University of Cologne*.

Wolf, A., Kramer, R. et Morbach, S. (2003). Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **49**, 1119-34.

Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 230-62.

Yague, G., Segovia, M. et Valero-Guillen, P. L. (2000). Detection of mycoloylglycerol by thin-layer chromatography as a tool for the rapid inclusion of corynebacteria of clinical origin in the genus *Corynebacterium*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **738**, 181-5.

Yang, X., Kang, C. M., Brody, M. S. et Price, C. W. (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* **10**, 2265-75.

Yao, W., Deng, X., Liu, M., Zheng, P., Sun, Z. et Zhang, Y. (2009). Expression and localization of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 protein encoding an L-glutamic acid exporter. *Microbiol Res* **164**, 680-7.

Yeats, C., Finn, R. D. et Bateman, A. (2002). The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**, 438.

Young, D. B. et Garbe, T. R. (1991). Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **59**, 3086-93.

Yura, T., Kanemori, M. et Morita, M. T. (2000). "The heat shock response : regulation and function " /Ed., In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.

Yura, T., Nagai, H. et Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **47**, 321-50.

Yura, T. et Nakahigashi, K. (1999). Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**, 153-8.

Zittrich, S. et Kramer, R. (1994). Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **176**, 6892-9.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G. et Daffe, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**, 5672-80.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Patrick GERVAIS, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
Monsieur Armel GUYONVACH, Professeur, Université Paris-Sud 11, Orsay

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BOULAHYA Kenza épouse BRIHMOUCHE

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Importance de l'enveloppe cellulaire dans la régulation de la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours d'un procédé thermo-induit"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »**

Fait à Vandoeuvre, le 22 octobre 2010
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE - NANCY -

Titre en Français : Importance de l'enveloppe cellulaire dans la régulation de la production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours d'un procédé thermo-induit

Résumé: Lors de ce travail, une étude comparative entre trois souches de *C. glutamicum* a été réalisée. Celles-ci sont *C. glutamicum* 2262, une souche surproductrice de glutamate suite à l'élévation de température du milieu de culture de 33 à 39°C, *C. glutamicum* 2262 NP un variant incapable d'excréter du glutamate dans ces mêmes conditions et *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* un mutant dépourvu de bicouche mycolique externe. Un modèle métabolique original reprenant les différentes modifications physiologiques aboutissant à l'excrétion du glutamate au cours du procédé thermo-induit a été établi. La bicouche mycolique joue un rôle primordial puisque son absence affecte sévèrement la production du glutamate. Dans un premier temps, l'élévation de température serait ressentie au niveau de cette bicouche. Ce ressenti, visualisé par l'accumulation de protéines caractéristiques d'un stress thermique, est nécessaire pour que la bactérie soit en capacité de surproduire le glutamate. Par la suite, la production de glutamate est régulée au niveau de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODH) grâce à la phosphoprotéine OdhI. Suite au changement de température, celle-ci est déphosphorylée ce qui lui permet d'interagir avec ODH et de provoquer l'inhibition de cette dernière. Ceci se traduit par la redirection sur flux carboné vers la synthèse du glutamate. Aucun de ces évènements n'est observé chez *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*. Par ailleurs, l'élévation de température induit une modification de la composition de l'enveloppe cellulaire qui semble intervenir dans le processus physiologique aboutissant à l'excrétion du glutamate puisque très peu de changements sont observés chez *C. glutamicum* 2262 NP.

MOTS CLES:

C. glutamicum, acides corynomycoliques, α-cétoglutarate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, protéines de stress, OdhI.

Title: Importance of *Corynebacterium glutamicum* 2262 cell envelop in the regulation of glutamate production during a temperature triggered producing process

Abstract: During this work, a comparative study between three strains of *Corynebacterium glutamicum* was carried out. These strains were *C. glutamicum* 2262 which overproduces glutamate after an increase in the culture temperature from 33 to 39°C, *C. glutamicum* 2262 NP which is unable to produce glutamate in the same culture conditions and *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13* devoid of outer corynomycolic acid bilayer. An original metabolic model describing the successive physiological modifications responsible for the glutamate excretion during the temperature-triggered process was established. The presence of the corynomycolic acid bilayer appeared to be necessary since its lack affected dramatically the glutamate production. The temperature increase would be first sensed at the level of the external corynomycolic acid layer. This sensing was visualised through the accumulation of thermal stress proteins. In *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, the synthesis of these proteins was not induced. The glutamate production is regulated at the oxoglutarate dehydrogenase (ODH) level by the phosphoprotein OdhI. A consequence of the temperature increase was the dephosphorylation of this regulatory protein and its interaction with ODH, provoking its inhibition. The carbon flux was then reoriented toward the glutamate synthesis. In *C. glutamicum* 2262 Δ*pks13*, no dephosphorylation of OdhI and no change in the ODH activity were not determined. The thermal stress also induced a change in the composition of the corynomycolic acid layer which was correlated with the ability of *C. glutamicum* 2262 to overproduce glutamate. In *C. glutamicum* 2262 NP, the composition of the corynomycolic acid layer remained unchanged.

KEY WORDS: *Corynebacterium glutamicum*, cotynomycolic acids, oxoglutarate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, stress proteins, OdhI