HAL
open science

Étude physiologique de streptomyces pristinaespiralis producteur de pristinamycines : activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du Ph intracellulaire

Philippe Corvini

To cite this version:

Philippe Corvini. Étude physiologique de streptomyces pristinaespiralis producteur de pristinamycines : activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du Ph intracellulaire. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2000. Français. NNT : 2000INPL111N . tel-01750398

HAL Id: tel-01750398

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750398v1

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

00INPL 119 N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Bioprocédés Agro-Alimentaires (LABIAL)

THESE

Présentée à l'INPL par **Philippe François-Xavier CORVINI**
en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Discipline : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire.

Directeur de thèse : Pr P. Germain.
Codirecteur : CR CNRS JL Goergen

Soutenue publiquement le : 31 octobre 2000 devant la commission d'examen.

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Membres du jury :

Président : J.M. Engasser, Professeur, ENSAIA (Vandoeuvre)

Rapporteurs : J. Dusart, Professeur, l'Université libre de Liège (Belgique)
A. Lebrihi, Professeur, ENSAT (Toulouse)

Examinateurs : P. Germain, Professeur, ENSAIA (Vandoeuvre)
[illegible] argé de Recherches CNRS, ENSAIA (Vandoeuvre)
[illegible] nsable procédés Biochimiques Aventis (Vitry sur Seine)
[illegible] de Conférences, ENSIC (Nancy)

D 136 025515 8

J36025 5158

00INPL MN

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

[T] 2000 CORVINI, Ph.

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Bioprocédés Agro-Alimentaires (LABIAL)

THESE

Présentée à l'INPL par **Philippe François-Xavier CORVINI**
en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Discipline : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines :
Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire.

Directeur de thèse : Pr P. Germain.
Codirecteur : CR CNRS JL Goergen

Soutenue publiquement le : 31 octobre 2000 devant la commission d'examen.

Membres du jury :

Président : J.M. Engasser, Professeur, ENSAIA (Vandoeuvre)

Rapporteurs : J. Dusart, Professeur, l'Université libre de Liège (Belgique)
A. Lebrihi, Professeur, ENSAT (Toulouse)

Examinateurs : P. Germain, Professeur, ENSAIA (Vandoeuvre)
J.L. Goergen, Chargé de Recherches CNRS, ENSAIA (Vandoeuvre)
S. Altaba, Responsable procédés Biochimiques Aventis (Vitry sur Seine)
H. Vivier, Maître de Conférences, ENSIC (Nancy)

Avant propos :

(A Malvine et Pierre)

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire des bioprocédés agro-alimentaires (LABIAL) ex laboratoire des fermentations et bioconversions industrielles (LFBI) sous la direction du Professeur Pierre Germain.

Puissent ces quelques lignes suffire à lui témoigner toute ma reconnaissance pour les précieux conseils qu'il a su me prodiguer et pour les excellentes conditions de travail qu'il s'est efforcé de me fournir trois ans durant.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude à Jean-Louis Goergen pour avoir codirigé cette thèse avec dynamisme, enthousiasme et sympathie.

Que soit vivement remercié M le Professeur Jean Dusart pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'adresse tous mes remerciements au Pr Ahmed Lebrihi qui m'a initié à la recherche sur *Streptomyces* et qui, quelques années après accepte d'en être Rapporteur.

Je souhaite aussi adresser ma reconnaissance au Pr Engasser pour m'avoir initialement accueilli à l'ENSAIA et avoir accepté de faire partie du jury.

Un grand merci à Hervé Vivier, pilier de l'analyse d'image, pour sa collaboration fructueuse et agréable.

Merci à la société Aventis et plus particulièrement à Stéphane Altaba pour m'avoir permis de réaliser ces travaux sur la souche pr11.

Enfin il me tenait à coeur de remercier les gens du laboratoire présents et de passage qui m'ont accompagné, supporté et soutenu pendant ces trois années : Atimad, Caroline, Fred, Hervé, Manu, Mouna, Nora et Stéphane, sans oublier les amis pour m'avoir entouré en toutes circonstances, entre autres : Bertrand, Frank, Gilles, Nancy, Sylvie et Valérie.
Et puis j'adresse une pensée plus particulière pour mes proches : Benoît, Manu, Claude, Maman et ma joie de vivre...

Liste des Abréviations :

α-CG (CG) : α-céto-glutarate

α-CGDH : α-céto-glutarate déshydrogénase

ADB : 1,4-diacétoxy-2,3-dicyanobenzène

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

AMP_c : adénosine monophosphate cyclique

APAD : 3-acétyl-pyridine-adénine dinucléotide oxydé

ARN_r : acide ribonucléique ribosomique

Arg : arginine

AS : activité spécifique

ATP : adénosine triphosphate

BCECF : 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(et 6)-carboxyfluorescéine

BCECF-AM : 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(et 6)-carboxyfluorescéine, acétoxyméthylester

C : cytosine

C. glutamicum : *Corynebacterium glutamicum*

C_f: concentration finale

CLHP : chromatographie liquide haute performance

CMF : cytométrie en flux

CoA : coenzyme A

ΔpH : gradient de pH

D : taux de dilution

Da : dalton

DMPAPA : 4-diméthyl-*para*-amino-phénylalanine

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia Coli*

E.C. : classification des enzymes

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas

F-1,6-bisphosphate : fructise-1,6-bisphosphate

G : guanine

G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

Glc : glucose

Glu : glutamate

IDH : isocitrate déshydrogénase

IL : isocitrate lyase

INT : indole-nitro-tétrazolium

kb : kilo bases

K_m : constante de Michaelis

LDH : lactate déshydrogénase

μ : taux de croissance

μ_{max} : taux de croissance maximal

MDH : malate déshydrogénase

MLS : macrolides, lincosamines et synergistines

MMPAPA : 4-mono-méthyl-*para*-amino-phénylalanine

NAD^+ : nicotine adénine dinucléotide oxydé

NADH : nicotine adénine dinucléotide réduit

$NADP^+$: nicotine adénine dinucléotide phosphate oxydé

NADPH : nicotine adénine dinucléotide phosphate réduit

OA : oxalo-acétate

6PGDH : 6-phospho-gluconate déshydrogénase

PA : patricine

PBS : tampon de sels de phosphate

PDH : pyruvate déshydrogénase

PEP : phospho-énol-pyruvate

PEPc : phospho-énol-pyruvate carboxylase

PFK : phospho-fructo-kinase

pH_i : pH intracellulaire

P_I : pristinamycine I

P_{II} : pristinamycine II

PM : poids moléculaire

PPP (PP) : voie des pentoses phosphate

Pro : proline

PTS : phosphotransferase system

q : quotient métabolique

RMN : résonance magnétique nucléaire

S : substrat

S. : *Streptomyces*

Sacch. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SDH : succinate déshydrogénase

Spp : espèce

TCA : cycle des acides tricarboxyliques

tr/min : tour par minute

u : unité

ue : unité enzymatique

UFC : unité formant colonie

VVM : volume à volume par minute

Sommaire général :

Introduction générale et objectifs.	1
Chapitre I : Revue bibliographique.	5
Chapitre II : Matériels et méthodes.	51
Chapitre III : Résultats du dosage d'enzymes du métabolisme central en cultures discontinues.	75
Chapitre IV : Résultats. Mise au point de la méthode de mesure du pH intracellulairepar microscopie à épifluorescence et analyse d'image.	93
Chapitre V : Résultats du suivi de pH_i en fermenteurs discontinus et acides organiques excrétés.	121
Chapitre VI : Résultats des cultures en bioréacteurs continus.	137
Conclusions et perspectives	159
Références bibliographiques	164
Annexes	

Introduction générale

et

Objectifs du travail

Introduction générale et objectifs du travail :

L'émergence de maladies nosocomiales est un problème d'actualité qui suscite certaines craintes des médecins qui désormais n'hésitent plus à employer le terme d'infections à *Staphylococcus aureus* ou *Enterococcus faecium* intraitables (Leclercq, 1998). Ces problèmes sont essentiellement liés à la sélection de souches pathogènes qui ont développé ou acquis selon un mode transversal (plasmidique) des résistances aux agents utilisés pour les procédures d'aseptisation et les antibiothérapies prescrites.

La compréhension des mécanismes de résistances des micro-organismes infectieux a fait évoluer le développement de nouveaux agents antibiotiques obtenus par hémisynthèse. Seulement, les réactions chimiques posent des problèmes de chiralités et sont parfois impossibles car nécessitant un trop grand nombre d'étapes de transformation. De plus, les rendements des réactions chimiques sont faibles donc coûteux. La production de nouveaux antibiotiques par les *Streptomyces* (principal producteur) (Demain, 1999) est encore d'actualité et d'avenir tant au niveau productivité et coûts de production qu'au niveau efficacité d'action.

La production des pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis* en fermenteur discontinu a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1961 par la société Rhône-Poulenc. Peu de données cependant ont été publiées sur ce micro-organisme hormis des travaux effectués sur l'identification de gènes responsables de la biosynthèse des pristinamycines (Bamas-Jacques *et al.*, 1999, Blanc *et al.*, 1997) et l'amplification de certains de ces gènes (Sezonov *et al.*, 1997). Or les titres de production de l'antibiotique sont fonction de l'expression de ces gènes mais ils dépendent aussi de la quantité de biomasse apte à le synthétiser.

Parallèlement à la mutagénèse aléatoire et au criblage de nouvelle souches hyperproductrices d'antibiotiques, largement usitées jusqu'à présent, s'est développée une nouvelle stratégie, le **Génie Métabolique**. Il consiste en un regroupement de différentes disciplines interdépendantes que sont le génie fermentaire, la physiologie des micro-organismes et les transformations génétiques. La démarche générale idéale consiste en l'acquisition de connaissances sur la physiologie du micro-organisme producteur pour cibler les gènes à modifier, et éventuellement, développer des procédés de production tenant compte des modifications apportées par génie génétique, intégrant les données physiologiques. Le développement des connaissances physiologiques est donc une composante clé du génie

métabolique à considérer en vue d'une amélioration de la production et de l'établissement de modèles structurés basés sur des données expérimentales.

L'approche physiologique comprend l'étude des transformations par les cellules des éléments nutritifs qui seront assimilés et retrouvés sous forme de catabolites dans un environnement donné. Parmi les éléments nutritifs apportés à *Streptomyces pristinaespiralis* figure le glucose. Il intervient dans le métabolisme primaire comme source de carbone cellulaire et d'énergie. Sous l'influence de paramètres environnementaux, des changements métaboliques se produisent (Fig. 1). Lors du métabolisme secondaire, le glucose est utilisé pour former les précurseurs de l'antibiotique et fournir la source énergétique indispensable à leur condensation.

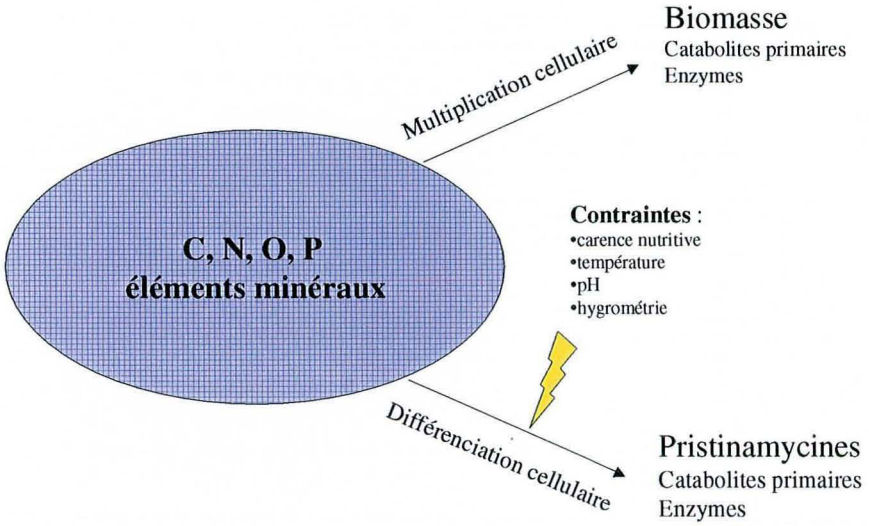


Figure 1 : Schéma général de la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis*

Les chaînes de réactions métaboliques sont catalysées par des enzymes dont l'action est souvent coordonnée. Bien que certains modèles de flux moléculaires, tel celui établi pour *Streptomyces lividans* (Daae et Ison, 1999), présentent des réactions indépendantes, la réalité est probablement différente puisque le produit d'une enzyme devient le substrat de l'enzyme suivante. De l'efficacité de ces enzymes ou non, pourra découler la formation de sous-produits tels que des acides organiques qui constituent une perte pour la formation de biomasse et la production d'antibiotiques (Dekleva et Strohl, 1987) ou une réorientation des flux vers la synthèses d'autres métabolites. Leur activité dépend de beaucoup de facteurs, tels que les quantités d'enzymes synthétisées, les concentrations en substrats et produits des réactions, les concentrations en effecteurs (activateur, inhibiteur), le pH et la température. Outre son action sur les activités enzymatiques *in vivo* le pH intracellulaire est un facteur déterminant pour les cinétiques des flux moléculaires entre la cellule et son environnement et

l'énergétique cellulaire. Il s'agit d'un paramètre physico-chimique crucial qui rend compte de l'état physiologique des cellules.

Cette étude sera focalisée sur une partie du métabolisme de *Streptomyces pristinaespiralis*, à savoir l'assimilation du glucose par des cellules en phase de croissance et par des cellules différenciées productrices de pristinamycines. Ce type d'investigation amène à se poser certaines questions sur les moyens d'assimilation de ce glucide mis en œuvre (Fig. 2) :

- Quelles sont les voies cataboliques impliquées ?
- La dégradation du glucose est-elle potentiellement limitée par certaines enzymes synthétisées en quantité insuffisante (notion d'étapes limitantes) ?
- A quels niveaux du métabolisme carboné se produisent des fuites de carbone (si engorgement du flux il y a) ?
- L'existence de fuites se traduit-elle par une accumulation préalable de ces composés et quelles peuvent être les répercussions engendrées sur le pH intracellulaire ?
- Existe-t-il durant le glissement de métabolisme une réorganisation des flux cataboliques du carbone à l'intérieur des cellules par des changements d'activité des biocatalyseurs ?

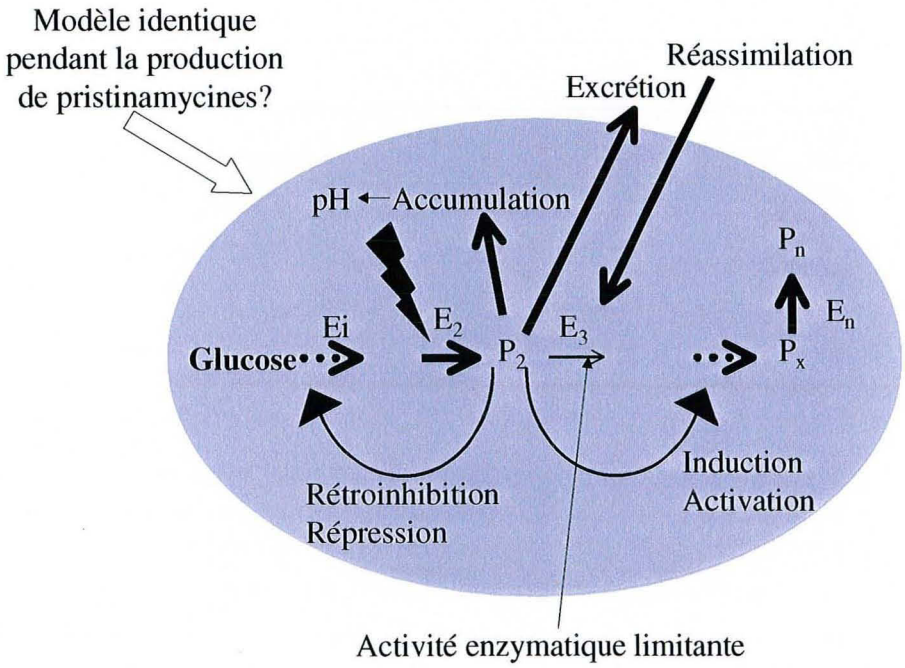


Figure 2 : Récapitulatif de la problématique où E_x représentent les enzymes et P_x les produits des réactions

Pour parvenir à répondre à ces questions, sera effectué dans un premier temps le dosage de certaines des enzymes impliquées dans le catabolisme du glucose en relation avec la croissance de *S. pristinaespiralis* et avec la production de pristinamycines au cours de cultures discontinues. Dans un second temps sera développée une méthode permettant la mesure du pH intracellulaire par microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'images. Cette méthode sera appliquée en cultures discontinues parallèlement à des dosages d'acides organiques excrétés dont certains sont des métabolites impliqués dans les réactions enzymatiques étudiées au cours de la première partie. Enfin l'ensemble des paramètres précédemment cités sera mesuré durant des cultures continues afin de pouvoir travailler sur des cellules qui sont dans le même état physiologique, et ce, pour différents taux de dilutions.

Chapitre 1

Revue Bibliographique

Revue bibliographique :

I.1- Le genre *Streptomyces* : 8

I.1.1- Classification et caractéristiques générales : 8

I.1.2- Morphologie du genre *Streptomyces* : 8

I.1.2.1- Cycle de croissance sur milieu solide : 8

I.1.2.2- Morphologie en milieu liquide : 9

I.1.3- Production de métabolites secondaires : 10

I.1.4- *Streptomyces pristinaespiralis* : 12

I.2- Les pristinamycines : 13

I.2.1- Classification : 13

I.2.2- Les synergistines : 13

I.2.3- Les différentes pristinamycines : 15

I.2.3.1- Les pristinamycines I : 15

I.2.3.2- Les pristinamycines II : 16

I.2.4- Propriétés physico-chimiques des pristinamycines : 16

I.2.5- Micro-organismes cibles et mécanismes d'action : 17

I.2.5.1- Spectre d'action et usages thérapeutiques : 17

I.2.5.2- Mécanismes d'action des pristinamycines : 18

I.2.5.2.a- Entrée des pristinamycines dans le micro-organisme cible : 18

I.2.5.2.b- Mécanisme d'action des pristinamycines : 19

I.2.6- Résistances aux pristinamycines et mécanismes : 20

I.2.6.1- Résistances aux pristinamycines : 20

I.2.6.2- Principaux mécanismes des résistances : 21

I.2.7- Synthèse de nouvelles pristinamycines : 21

I.2.8- Voies de biosynthèse des pristinamycines : 23

I.2.8.1- Biosynthèse des P_{II} : 23

I.2.8.2- Biosynthèse des P_I : 23

I.2.9- Bilans sur les voies de biosynthèse des pristinamycines : 25

I.3- Les enzymes du catabolisme du glucose : 28

I.3.1- Introduction : 28

I.3.2- Le carrefour glycolyse-voie des pentoses phosphates : 30

I.3.3- Orientation de l'acétate vers le cycle de Krebs ou vers la biosynthèse de métabolites secondaires? 31

I.3.4. Equipements enzymatiques des *Streptomyces* : 31

I.3.4.1- Voie des pentoses phosphate : 31

I.3.4.2- Cycle de Krebs et voies anaplérotiques liées : 32

I.3.6- Modulation des activités enzymatiques : 32

I.3.6.1- Oxygénation : 32

I.3.6.2- Passage ("Switch") du métabolisme primaire au métabolisme secondaire : 33

I.3.7- Conclusions : 34

I.4- Le pH intracellulaire : 35

I.4.1- Introduction : 35

I.4.2- Rôles du pH intracellulaire (Fig. I.7) : 36

I.4.2.1- Croissance : 36

I.4.2.2- Réactions physico-chimiques : 36

I.4.2.3- Force protomotrice : 36

I.4.2.4- Activités enzymatiques : 37

I.4.2.5-Autres composantes du métabolisme : 38

I.4.2.6- Différenciation cellulaire : 38

I.4.3- Effecteurs des variations du pH intracellulaire : 39

I.4.4- Systèmes de régulation du pH intracellulaire : 40

I.4.4.1- Pouvoir tampon du cytoplasme : 40

I.4.4.2- Enzymes : 40

I.4.4.3- Imperméabilité membranaire : 41

I.4.4.4- Pompe primaire à protons : 41

I.4.4.5- Antiport Na^+/H^+ : 42

I.4.4.6- Antiport K^+/H^+ : 42

I.4.4.7- Conclusions : 42

I.4.5- Les différentes méthodes de mesure du pHi : 43

I.4.5.1- La micro-électrode à pH : 43

I.4.5.2- Les sondes : 44

I.4.5.2.a- Remarques générales sur l'utilisation des sondes : 44

I.4.5.2.b- Acides et bases faibles froids ou marqués : 44

I.4.5.2.c- Spectroscopie au ^{31}P : 45

I.4.5.2.d- Sondes fluorescentes : 45

I.4.5.2.e- Les différents fluorochromes : 47

I.4.5.2.f- Techniques ratiométriques : 48

I.4.5.2.g- Appareillage de mesures de fluorescence : 49

I.4.6- L'analyse d'images chez les *Streptomyces* : 50

I.1- Le genre Streptomyces :

I.1.1- Classification et caractéristiques générales :

Le genre *Streptomyces* appartient au groupe des Actinomycètes et il est représenté par un grand nombre d'espèces (plus de 500 répertoriées en 1986 dans le BERGEY'S MANUAL)

Auparavant classées parmi les champignons (comme l'indique l'étymologie) sur la base de la morphologie de ses colonies, il s'agit de bactéries filamenteuses encore répertoriées comme eubactéries mycéliennes.

Les *Streptomyces* donnent lieu à une coloration GRAM$^+$ et sont des bactéries immobiles, aérobies strictes, chimio-hétérotrophes qui ont la particularité d'être sporulantes (Mayfield et *al.*, 1972; Brock et Madigan, 1979).

D'un point de vue génétique, les *Streptomyces* se caractérisent par un chromosome linéaire sur lequel les gènes sont sujet à une grande instabilité où de nombreuses régions d'amplification et de délétion ont été découvertes (Aigle *et al.*, 1996, Dary *et al.*, 1992) et possèdent un fort taux en acides nucléiques guanine et cytosine (GC % 63-78).

Leur niche écologique naturelle est principalement tellurique, cependant quelques espèces ont été observées en milieu aquatique. De part leurs hyphes ramifiés et un équipement enzymatique hydrolytique extracellulaire important (cellulases, amylases, protéases et lipases) ils sont relativement bien adaptés à l'utilisation des débris organiques et à la structure interstitielle du sol. Dans certaines régions des colonies, des excrétions massives de ces enzymes ont pu être mises en évidence. Le transport des nutriments en résultant a lieu dans certains cas de l'extrémité des hyphes vers le cœur de la colonie (Chater et Hopwood, 1989).

I.1.2- Morphologie du genre Streptomyces :

I.1.2.1- Cycle de croissance sur milieu solide :

Lors de cultures sur milieu solide, les *Streptomyces* sont dotés d'un cycle biologique (Fig. I.1) comparable à celui des champignons, à la différence essentielle qu'il s'agit d'un

cycle uniquement haplobiontique.

La germination d'une spore à partir de laquelle croît un tube germinatif constitue le point de départ de ce cycle. Depuis ce dernier se développe un réseau constitué d'hyphes qui se ramifient, le résultat étant la formation d'un mycélium primaire (basal) qui s'étend en direction radiale sur le milieu substrat et en profondeur de ce dernier. A partir de ce mycélium s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien dont les extrémités s'enroulent pour former des spirales. Il s'ensuit un cloisonnement des hyphes aériens et un épaississement des cloisons pour délimiter finalement des spores haploïdes. Ces formes cellulaires contribuent à la propagation de l'espèce et permettent la survie dans des conditions défavorables à la croissance végétative (Chater et Merrick, 1979).

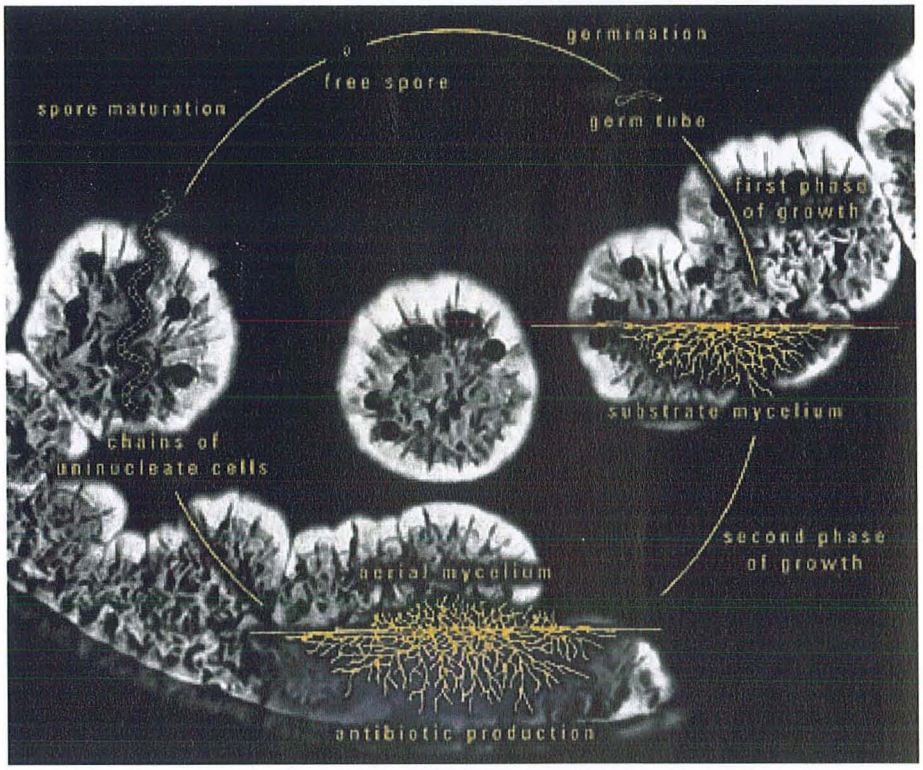


Figure I.1 : Cycle de *Streptomyces* sur milieu solide.

I.1.2.2- Morphologie en milieu liquide :

En conditions de culture immergée, le genre *Streptomyces* se présente sous diverses morphologies : filaments mycéliens libres et plus ou moins ramifiés, enchevêtrements de filaments et pelotes de mycélium d'aspects divers (Whitaker, 1992).

Le type de morphologie est fonction de nombre de paramètres tels que le titre de

l'*inoculum*, l'oxygénation du milieu, les contraintes de cisaillement, le milieu de culture, le type de récipient de culture, *etc.*.

La sporulation est un phénomène plus rarement observé en milieu liquide, mais on note cependant des cas d'induction de sporulation chez *Streptomyces griseus* dans des conditions nutritionnelles carencées en phosphore ou en azote (Kendrick et Ensign, 1983).

I.1.3- Production de métabolites secondaires :

Le genre *Streptomyces* possède une physiologie particulière où se succèdent deux types de métabolisme dénommés primaire et secondaire dont les principales différences entre les produits résultants sont répertoriées dans le tableau I.1.

Métabolite primaire	Métabolite secondaire
Synthétisé pendant la trophophase (phase de croissance cellulaire) et présence tout au long du cycle cellulaire.	Synthétisé lors de l'idiophase (phase de ralentissement et stationnaire), apparition à un moment du cycle.
Nécessaire à la croissance	Inutile pour la croissance
Rôle physiologique connu	Rôle physiologique mal connu
« Turn-over » élevé	« Turn-over » pratiquement nul
Produit dans des conditions de culture diverses	Produit dans des conditions de culture bien définies
Ubiquitaire	Spécifique
Enzyme à spécificité étroite	Enzymes à spécificité large
Voies de synthèse simples et courtes	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit parfaitement défini	Synthèse d'un mélange de produits
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

Tableau I.1: Différences principales entre les métabolites primaires et secondaires (d'après Martin et Demain, 1980; Campbell, 1984; Hutter, 1986; Okanishi et Hotta, 1980; Malik, 1982).

Parmi les métabolites secondaires figurent des molécules de structures très variées (Tab. I.1) regroupées sous le terme d'antibiotiques. D'un point de vue étymologique le mot antibiotique désigne le concept antagoniste à la symbiose. Actuellement la définition antibiotique désigne toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective envers le micro-organisme cible et faible vis-à-vis du patient.

Concernant la production d'antibiotiques, le genre *Streptomyces* est le micro-organisme de choix, parce que responsable de la biosynthèse de plus de 2/3 des antibiotiques produits à l'échelle industrielle (Demain, 1999). Plus de 500 composés à action antibiotique ont été répertoriés à son actif jusqu'à présent et environ 10 % de ces molécules sont largement utilisées en thérapeutique humaine et vétérinaire, en agriculture et en industrie agro-alimentaire.

Le type de composé synthétisé est propre à chaque espèce productrice, certaines souches pouvant produire des composés de diverses classes chimiques et certains antibiotiques pouvant être synthétisés par différentes souches (Tab. I.2).

Classe Chimique	Antibiotique	Producteur	Cible
Aminoglycosides	Streptomycine	*S. griseus*	la plupart des GRAM-
	Spectomycine	*S. spp*	*M. tuberculosis*
	Néomycine	*S. fradiae*	*large spectre*
Tétracyclines	Tétracycline	*S. aureofaciens*	large spectre GRAM + et -
	Chlortétracycline	*S. aureofaciens*	*idem*
Macrolides	Spiramycine	*S. ambofaciens*	*Streptococcus, Neisseria* et *Mycoplasma*
	Erythromycine	*S. erythreus*	la plupart des GRAM+
	Clindamycine	*S. lincolnensis*	anaérobies strictes
Polyènes	Nystatine	*S. noursei*	champignons: *Candida*
	Amphocétine B	*S. nodosus*	champignons
Sans Classe	Chloramphénicol	*S. venezuelae*	large spectre et typhoïde

Tableau I.2 : Antibiotiques courants synthétisés par les *Streptomyces* (Brock et Madigan, 1979).

Au niveau chromosomique, les gènes de biosynthèse des antibiotiques sont généralement organisés en clusters (regroupement de gènes). A ces derniers sont souvent associés les gènes de résistance à l'antibiotique produit, ce qui permet une traduction simultanée assurant une protection efficace du micro-organisme producteur (Lee *et al.*, 1999).

Outre les antibiotiques, d'autres métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* révèlent des propriétés intéressantes. On note en particulier des composés à activité anti-tumorale, anti-inflammatoire, hypoglycémiante, herbicide et insecticide (Deshpande *et al.*, 1988).

I.1.4- Streptomyces pristinaespiralis :

A l'origine l'espèce a été isolée d'un échantillon de terre prélevé à San Carlos (Cordoba) en Argentine et elle a pour principale caractéristique de synthétiser les pristinamycines, composés à activité anti-bactérienne (Jolles *et al.*, 1965).

En raison de l'utilisation de cette espèce à l'échelle industrielle, la littérature fait état de peu de données sur la physiologie de cette dernière. La grande majorité des travaux sur ce micro-organisme traitent essentiellement de biologie moléculaire. Dans ce domaine, les recherches sont plus particulièrement ciblées au niveau des gènes spécifiques du métabolisme secondaire.

En plus de la caractérisation du chromosome de *S. pristinaespiralis* qui est linéaire comme chez les autres espèces de *Streptomyces* et qui se compose d'environ 7580 kb (Bamas-Jacques *et al.*, 1999), divers gènes responsables de la biosynthèse des pristinamycines et de ses précurseurs ont été identifiés. Il a pu être mis en évidence par électrophorèse en champ pulsé la présence au sein d'un même cluster des gènes de biosynthèse des différentes pristinamycines et aussi celle des gènes de résistance spécifique à l'antibiotique produit. Ce cluster couvre un peu moins de 200 kb soit 6% du génome et il s'agit d'un des plus grands découvert jusqu'à présent parmi les différentes espèces de *Streptomyces* (Bamas-Jacques *et al.*, 1999).

La sélection de mutants hyperproducteurs a permis la production en réacteur

le numéro 1-301-857. La production a lieu en milieu complexe composé de farine de soja, de glucose et de sels minéraux, à 27°C, sous aération et agitation contrôlées et sans régulation de pH. Les pristinamycines sont depuis lors commercialisées par les laboratoires SPECIA (anciennement Rhône-Poulenc-Rorer) et qui sont actuellement produites par le groupe Aventis sous le nom de PYOSTACINE® (Fig. I.2) (Paquet, 1990).

Figure I.2 : Emballage de Pyostacine®

I.2- Les pristinamycines :

I.2.1- Classification :

Les pristinamycines sont répertoriées dans le groupe des synergistines autrement nommées streptogramines ou encore peptolides. Le groupe des synergistines appartient à la famille des macrolides et apparentés qui comprend des antibiotiques à structure et composition chimique très différente. Autrement appelée famille des MLS, elle regroupe 3 composantes distinctes (Larpent et Sanglier, 1989) :

- Les Macrolides vrais, ex : spiramycine.
- Les Lincosamines, ex : lincomycine.
- Les Synergistines, ex : virginiamycine et pristinamycine.

I.2.2- Les synergistines :

Au même titre que d'autres antibiotiques, tels que les β-lactames qui sont produits par différents actinomycètes et champignons, la production de synergistines a été décrite chez divers genres bactériens bien que les *Streptomyces* en soient les principaux producteurs. Ainsi

divers genres bactériens bien que les *Streptomyces* en soient les principaux producteurs. Ainsi l'actinomycine est produite par : *Streptomyces, Actinoplanes* et *Micromonospora* et la vernamycine est synthétisée par : *Streptomyces, Actinoplanes, Actinomadura* et *Micromonospora* (Liu *et al.*, 1981).

Pristinamycine	*Autres synergistines*
P_IA	Streptogramine B Mikamycine IA PA114B1 Vernamycine Bα Ostréogrycine B
P_IB	Vernamycine Bβ Ostréogrycine B2
P_IC	Vernamycine Bγ Ostréogrycine B1
$P_{II}A$	Virginiamycine M1 Ostréogrycine A Streptogramine A PA114A1 Vernamycine A Mikamycine A
$P_{II}B$	Virginiamycine M2 Ostréogrycine G

Tableau I.3 : Synergistines partageant la même formule chimique que les pristinamycines (Cocito, 1979).

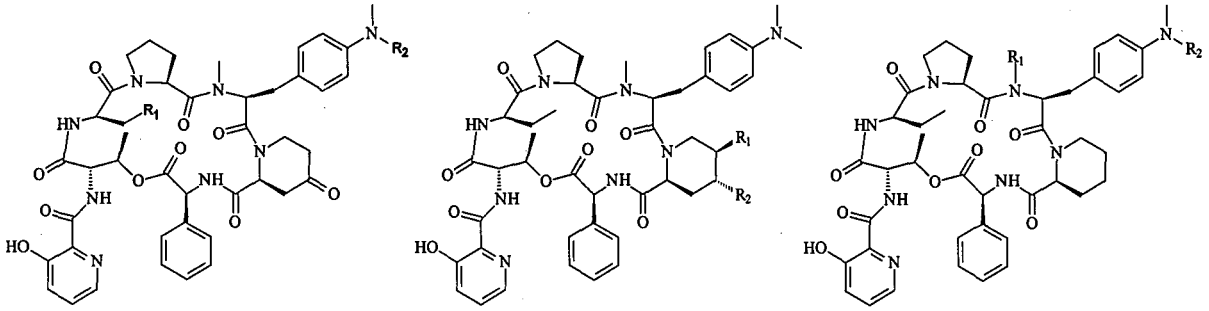
Les synergistines se caractérisent par la présence de deux types de molécules de structure et nature chimiques différentes. Le groupe A se compose de lactones macrocycliques de nature neutre. Le groupe B est constitué de molécules cycliques de nature depsipeptidique à caractère amphotère.

De la présence simultanée des deux composantes A et B il résulte une action bactéricide synergique à l'origine de la dénomination de ce groupe.

Parmi les nombreux représentants des antibiotiques du groupe des synergistines sont répertoriées les vernamycines, ostréogrycines, virginiamycines, patricines, doricines, grividomycines, étamycines. Selon l'espèce productrice, elles portent des noms différents bien que faisant référence à des molécules identiques (Tab. I.3).

I.2.3- Les différentes pristinamycines :

I.2.3.1- Les pristinamycines I :



P_IA : R_1= CH_3, R_2= CH3

P_IB : R_1= CH_3, R_2= H

P_IC : R_1= H, R_2= H

P_ID : R_1= OH, R_2= =O

P_IE : R_1= H, R_2= H

P_IF : R_1= H, R_2= OH

P_IG : R_1= H, R_2= OH

P_IH: R_1= H, R_2= CH_3

P_II: R_1= H, R_2= H

Figure I.3 : Structures des différentes P_I.

Le groupe I fait partie du groupe B des streptogramines et il est composé de molécules de type hexadepsipeptide cyclique à caractère amphotère de PM moyen de 850 Da qui résulte de la condensation de 6 résidus analogues d'acides aminés. Les formes P_I représentent 20 à 30 % des pristinamycines excrétées en cours de culture. La P_IA (Fig. I.3) est la composante majoritaire puisqu'elle représente environ 94 % des P_I. Les autres pristinamycines du groupe I sont au nombre de 8 et sont annotées de B à I et sont très minoritaires (Brevet WO 96/01901).

Il est à noter que les concentrations respectives obtenues peuvent être variables mais restent toutefois de l'ordre de celles permettant les meilleures conditions synergiques en conditions *in vitro* et *in vivo* (Preud'Homme *et al.* 1965).

I.2.3.2- Les pristinamycines II :

Les composants du groupe II appartiennent au groupe A des streptogramines. Ce sont des lactones macrocycliques polyinsaturées neutres de PM moyen de 525 Da résultant de la condensation d'analogues d'acides aminés et d'unités acétate. On distingue les deux formes suivantes (Fig. I.4) :

$P_{II}A$ 45-60 % (des pristinamycines totales)
$P_{II}B$ 5-10 %.

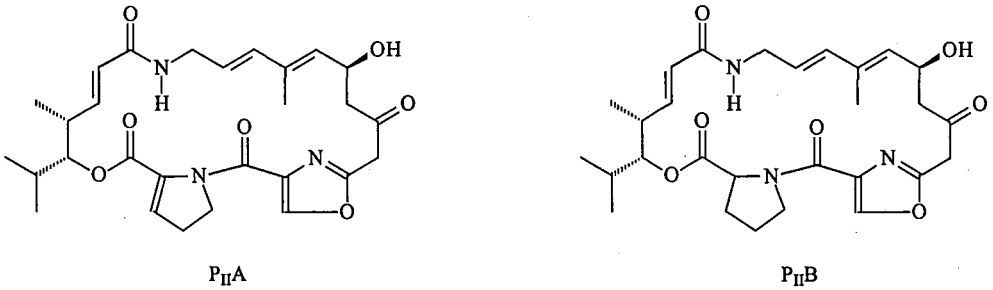


Figure I.4 : Structure des P_{II}

I.2.4- Propriétés physico-chimiques des pristinamycines :

Les pristinamycines se présentent à l'état brut sous forme de poudre de couleur blanchâtre microcristalline (Preud'Homme *et al.*, 1968), inodore, à l'amertume prononcée. Elles ne dérogent pas à la caractéristique commune des synergistines par leur faible hydrosolubilité qui est de l'ordre de 0,1 g/L dans l'eau pour les P_I et les P_{II}. Il est toutefois possible d'accroître leur solubilité dans l'eau en abaissant le pH de la solution à 3 ce qui permet d'obtenir une concentration saturante de 1 g/L (donnée Rhône-Poulenc). D'autre part leur dissolution est beaucoup plus aisée dans des solvants organiques comme l'acétate d'éthyle (250 g/L) et l'acétone (170 g/L) pour les P_I, et dans le diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde (100 g/L) pour les P_{II}.

La stabilité des pristinamycines en milieu aqueux est fortement dépendante du pH. En effet, en milieu alcalin, se posent des problèmes d'inactivation par hydrolyse du cycle lactonique des virginiamycines S (analogues des P_I) catalysée par les ions hydroxydes et sous influence de la nature des ions présents dans le milieu (Rollmann et Rondelet, 1975, Maung , 1987). A pH 3, le facteur M des virginiamycines, qui correspond aux P_{II}, subit lui aussi des transformations (Rollmann et Rondelet, 1973).

Une propriété intéressante pour l'étude des interactions des pristinamycines avec la cible est la fluorescence des P_I sous une excitation de 342 nm avec un maximum d'émission à 406 nm. Les P_{II} ne possèdent pas cette propriété (Cocito, 1979). Enfin une autre particularité des streptogramines du groupe B est qu'elles se comportent comme des transporteurs de protons très efficaces. Cette spécificité est liée à la présence du résidu 3-hydroxypicolinoyle qui possède deux fonctions acides. La forme responsable impliquée serait la forme zwitterionique où l'amine tertiaire est protonée tandis que la fonction alcool est ionisée (Largeron et Fleury, 1992).

I.2.5- Micro-organismes cibles et mécanismes d'action :

I.2.5.1- Spectre d'action et usages thérapeutiques :

Il s'agit d'un des peptolides les plus prescrits en antibiothérapie humaine (Larpent et Sanglier, 1989). Les principaux atouts de la Pyostacine sont une faible toxicité lors de traitements prolongés, son hypoallergénicité et un faible développement de résistances des micro-organismes cibles vis-à-vis de cette dernière. Ces avantages se sont traduits, outre les bénéfices financiers pour la société Rhône-Poulenc-Rorer par une longue présence sur le marché (plus de 20 ans).

D'un point de vue général, le spectre d'action des pristinamycines est restreint aux coques $GRAM^+$ et $GRAM^-$ ainsi qu'aux bacilles $GRAM^+$ et aux anaérobies strictes. Elles sont tout particulièrement caractérisées par un effet bactéricide intense sur les staphylocoques (Larpent et Sanglier, 1989). Elles sont, pour cette raison, une bonne solution pour le

traitement de souches multi-résistantes de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* (Leclercq, 1999) décrites antérieurement comme intraitables. Les bactéries GRAM$^-$ sont plus souvent résistantes eu égard à leur membrane externe qui limite l'entrée de molécules hydrophobes de grande taille (Pechère, 1996).

En thérapie humaine, les pristinamycines sont souvent prescrites dans le cas de pneumopathies et sinusites dues aux germes intracellulaires tels que les mycoplasmes, *Chlamydia* spp et *Legionella* spp ainsi que contre certains bacilles GRAM$^-$ tels que *Haemophilus influenzae* et *Bordetella pertussis* (Leclercq, 1999). Elles sont bien adaptées au traitement de septicémies à l'exception des formes méningées ; car ne diffusant pas à travers la barrière méningée et les posologies d'usage pour l'adulte sont de l'ordre de 2 à 4 g/jour (Lissac et Avril, 1977). Enfin elles peuvent être employées en stomatologie et dermatologie.

Il existe par ailleurs d'autres applications aux synergistines tels que l'antibiothérapie vétérinaire et l'utilisation en tant qu'additif alimentaire en élevages permettant d'accroître les rendements d'assimilation des aliments par les porcs et les poulets (Cocito, 1979). L'utilisation des virginiamycines est désormais interdite en nutrition animale en Europe.

I.2.5.2- Mécanismes d'action des pristinamycines :

I.2.5.2.a- Entrée des pristinamycines dans le micro-organisme cible :

Il a été démontré chez *Staphylococcus aureus* que les pristinamycines entrent par une voie de diffusion passive. En présence de glucose ou de composés inhibiteurs du transport actif, il ne se produit ni augmentation ni diminution des quantités accumulées dans les cellules de *S. aureus*. Il n'y aurait par ailleurs pas d'intervention de protéines dans ce phénomène d'entrée des synergistines.

Il n'existe pas d'influence mutuelle des 2 groupes sur leur niveau d'accumulation intracellulaire. Les vitesses d'accumulation rapides (2 min pour les P_{II} et 5 min pour les P_I) sont uniquement fonction de leur concentration dans le milieu extracellulaire, pour une température donnée (optimum 37 °C). Les vitesses d'entrée augmentent jusqu'à des concentrations externes de 2 µM. Il résulte de l'entrée des pristinamycines des concentrations

intracellulaires de 50 X et 30 X supérieures aux concentrations extracellulaires pour les P_I et les P_{II} respectivement. Ce décalage d'équilibre des concentrations s'expliquerait par la forte liaison des pristinamycines avec les ribosomes des cellules cibles (Lacroix *et al.*, 1984).

I.2.5.2.b- Mécanisme d'action des pristinamycines :

L'organelle affecté par la présence des synergistines est le ribosome du micro-organisme cible mais le mode d'action des deux groupes de streptogramines diffère quelque peu (Vasquez, 1966). Tout comme les macrolides de petite taille tels que l'erythromycine, elles empêchent l'étape d'élongation de la synthèse peptidique.

Les deux composantes possèdent, lorsqu'une seule forme est présente, des activités bactériostatiques, tandis que, lors de leur présence simultanée, l'action est bactéricide. Il a pu être déterminé que le meilleur effet bactériostatique *in vitro* est obtenu pour un mélange composé de 40 % de P_I et 60 % de P_{II}, alors que l'activité bactéricide semble indépendante de la composition relative des deux constituants, à condition qu'ils soient présents en concentration supérieure à la concentration minimale inhibitrice (Videau, 1982).

La $P_{II}A$ se lierait de façon stœchiométrique à la sous-unité 50 S du ribosome d'*Escherichia coli* en conditions *in vitro* et *in vivo*. Après fixation de la $P_{II}A$, l'affinité de la P_IA pour le ribosome se trouve accrue d'un facteur 3 à 6 (Aumercier *et al.*, 1986). Ce changement d'affinité serait la conséquence d'un changement conformationnel irréversible de la sous unité 50 S autrement dénommé "lasting damage" décrit par Parfait et Cocito en 1980.

Il a pu être démontré sur le ribosome de *Staphylococcus aureus* l'existence d'un site de liaison à haute affinité et de plusieurs sites de fixation aspécifique pour les P_{II}. La combinaison de la P_{II} avec le ribosome augmente de 5 fois l'affinité de la P_IA pour le ribosome. Par ailleurs, des souches résistantes à l'action bactériostatique de la P_I, qui n'accumulaient pas de P_I au niveau intracellulaire, se sont révélées sensibles à l'action de la P_I, et la concentrent en présence de P_{II} (Lacroix *et al.*, 1986).

A l'échelle du ribosome il a été démontré que des mutations de ribonucléotides situés sur la boucle peptidyl transférase de l'ARN_r 23 S augmentaient le taux de résistance des

souches cibles aux P_{II}. Comme il a pu être démontré par expérience de "foot printing", les pristinamycines interagissent non seulement au niveau des protéines L 16, 18 et 22, mais aussi sur l'ARN_r sur une séquence composée de 6 à 8 nucléotides.

Au niveau du complexe de la biosynthèse protéique, les streptogramines du groupe A ne contreviennent pas à la formation du complexe d'initiation mais au niveau de l'étape d'élongation de la chaîne peptidique. Elles interviennent en empêchant l'accessibilité des sites A et P des ribosomes (70 S) non engagés dans la biosynthèse protéique, et des sous unités 50 S.

Les streptogramines de type B peuvent agir sur des ribosomes impliqués dans la biosynthèse protéique. Elles interviennent lors des 2 premières étapes d'élongation c'est à dire lors de la fixation de l'ARN_t-AA sur le site A, et sur le transfert du résidu peptidyle du site P, mais n'influent pas sur la dernière étape, la translocation. En conditions *in vitro* il peut être observé une inhibition de l'activité des agents responsables de la formation de la liaison peptidique empêchant l'élongation et provoquant la libération prématurée du peptide (Cocito *et al.*, 1997). Un des résidus responsable et indispensable à la fixation des P_I est le 3-hydroxypicolinate (Paris *et al.*, 1985) ; l' interaction avec le ribosome serait stabilisée par un pont salin Mg^{2+} (Di Giambattista *et al.*, 1991).

I.2.6- Résistances aux pristinamycines et mécanismes :

I.2.6.1- Résistances aux pristinamycines :

En dépit de la présence de deux types de composés différents qui est sensée diminuer voire parer aux problèmes de résistance à l'agent antibiotique des micro-organismes cibles, un certain nombre de souches résistantes ont été répertoriées.

Ainsi des phénomènes de résistance acquise ont été décrits chez des souches de : *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus*, *Lactobacillus* spp, *Campylobacter* spp, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae* et quelques *Enterobacteriaceae* (Barrière *et al.*, 1998).

I.2.6.2- Principaux mécanismes des résistances :

Il apparaît que la résistance au mélange synergistique est toujours associée à la résistance vis à vis des composés du groupe A et plus rarement à celle du groupe B. Les principaux mécanismes mis en jeu lors de la résistance acquise sont la modification de la cible, l'inactivation de l'antibiotique, et l'excrétion de l'agent antibiotique hors de la cellule cible au moyen de transporteurs actifs.

En ce qui concerne la modification de la cible ribosomique, il a pu être mis en évidence le phénotype MLS_B de résistance croisée aux composés de la famille MLS ; pour les synergistines, la résistance concerne les composés du groupe B. Au niveau moléculaire ce phénotype se caractérise par une mono ou diméthylation sur l'ARN ribosomique qui a pour conséquence une diminution de l'affinité des synergistines pour le ribosome.

La modification des synergistines est différente selon le groupe. Ainsi, les synergistines du groupe A sont acétylées par voie enzymatique au niveau de groupements hydroxyles. Les composés du groupe B sont quant à eux, inactivés par l'action d'hydrolases qui provoquent l'ouverture du cycle hexadepsipeptidique.

Un autre mécanisme de résistance rencontré assez fréquemment chez *Staphylococcus epidermis* est lié à la présence d'une protéine qui présente de fortes homologies de séquence avec la séquence primaire de pompe à ATP et qui serait impliquée dans l'excrétion active des pristinamycines.

Avec la découverte de nouvelles souches résistantes et l'identification des gènes impliqués, d'autres mécanismes d'action sont susceptibles d'être mis à jour (Barrière *et al.*, 1998).

I.2.7- Synthèse de nouvelles pristinamycines :

Nombre de recherches sont consacrées à l'élaboration de nouvelles formes de pristinamycines pour contrevenir aux phénomènes de résistances acquises et aux difficultés d'administration du produit final liée à sa forte insolubilité.

Les premières recherches ont été effectuées sur les sites des différentes

pristinamycines potentiellement réactifs d'un point de vue chimique. Ainsi divers essais de modification ont été réalisés pour les P_IA au niveau des résidus DMPAPA, 4-oxo-pipécolate, 3-hydroxypicolinate (Fig. I.3) et pour les $P_{II}A$ (Fig. I.4) sur la fonction cétonique en position 16, le radical hydroxyle en position 14, le carbone 17 et la déhydroproline en position 26 (Barrière *et al.*, 1998).

Des résultats intéressants permettant d'accroître la solubilité des P_IA, voire d'améliorer l'activité bactéricide *in vivo* et *in vitro* en association avec la $P_{II}A$, ont été obtenus par Paris *et al.* (1985). Ils ont modifié par voie chimique la P_IA (hémisynthèse) au niveau du 4-oxo-pipécolate en position δ en ajoutant des alcoylthiométhyles.

Ainsi a été mise au point la forme d'administration orale RPR 106972 qui consiste en un mélange cocristallin ayant une solubilité accrue, d'une molécule P_IB avec 2 molécules de $P_{II}B$. Son développement a été rendu possible suite à l'optimisation de procédés de transformation de P_IA en P_IB (à l'origine forme minoritaire) par oxydation chimique ou par mutasynthèse. La mutasynthèse implique l'interruption de gènes de biosynthèse d'un des précurseurs et l'apport de ce précurseur modifié dans le milieu de fermentation. Cependant, ce projet a été stoppé en 1997-1998.

La difficulté d'administration par voie intraveineuse des pristinamycines liée à leur faible hydrosolubilité a été contournée par la mise au point de la combinaison RP 59500 encore dénommée Synercid® (Pechère, 1996). Les plus impressionnants effets bactéricides de ce mélange ont été obtenus sur des pneumocoques dès 10 min (Leclercq et Courvalin, 1998). Le Synercid® se compose de quinupristine (RP 57669) et de dalfopristine (RP54476) obtenues chimiquement à partir des formes naturelles de pristinamycines. La quinupristine est un dérivé de P_I modifié au niveau du 4-oxo-pipécolate tandis que la dalfopristine est dérivée de la P_{II} qui est modifiée au niveau de la proline (Barrière *et al.*, 1998). Les rendements de synthèse de la Dalfopristine peuvent être accrus par la conversion totale de la $P_{II}B$ en $P_{II}A$. Ceci a pu être effectué par Sezonov et ses collaborateurs (1997) en réalisant un clonage multi-copies des gènes responsables de cette bioconversion.

I.2.8- Voies de biosynthèse des pristinamycines :

I.2.8.1- Biosynthèse des P_{II} :

Les P_{II} résultent de la condensation de sept molécules d'acétate combinées à quatre acides aminés que sont la valine, la glycine, la sérine et la proline, a quoi s'ajoute la présence d'un radical méthyle provenant de la méthionine (Fig. I.4) La détermination d'une telle composition a été effectuée par des expériences utilisant des isotopes radioactifs stables (Kingston, 1980; Lefèvre *et al.*, 1983).

Par expériences de marquage il a été prouvé que la $P_{II}B$ est le précurseur de la $P_{II}A$ (Purvis *et al.* , 1989). Cette transformation fait intervenir un système multi-enzymatique nommé $P_{II}A$ synthétase, composé de 2 sous-unités codées par les gènes *sna* A et B. A ce système vient s'adjoindre une activité NADH-riboflavine-5'-phosphate réductase (FMN réductase) codée par le gène *sna* C. La riboflavine réduite formée par l'activité FMN réductase permet, en présence d'O_2 et des produits des gènes *sna* A et B, l'oxydation du résidu D-Pro (forme incorporée dans la $P_{II}B$) en déhydroproline (forme présente dans la $P_{II}A$) (Thibaut *et al.*, 1995, Blanc *et al.*, 1995). De récents travaux effectués par Sezonov *et al.* (1997) ont consisté en la surexpression de ces gènes afin d'obtenir plus de $P_{II}A$, ce qui autorise la fabrication de dérivés d'hémisynthèse plus solubles.

I.2.8.2- Biosynthèse des P_I :

Des acides aminés issus du métabolisme primaire sont essentiellement à l'origine des différents précurseurs (Fig. I.5).

L'identification de l'origine des différents précurseurs a été guidée par des hypothèses basées sur la similarité avec d'autres précurseurs d'antibiotiques semblables. Ceci est le cas pour la phénylglycine, l'acide 3-hydroxypicolinique, l'acide 4-oxo-pipécolique, l'acide α-aminobutyrique.

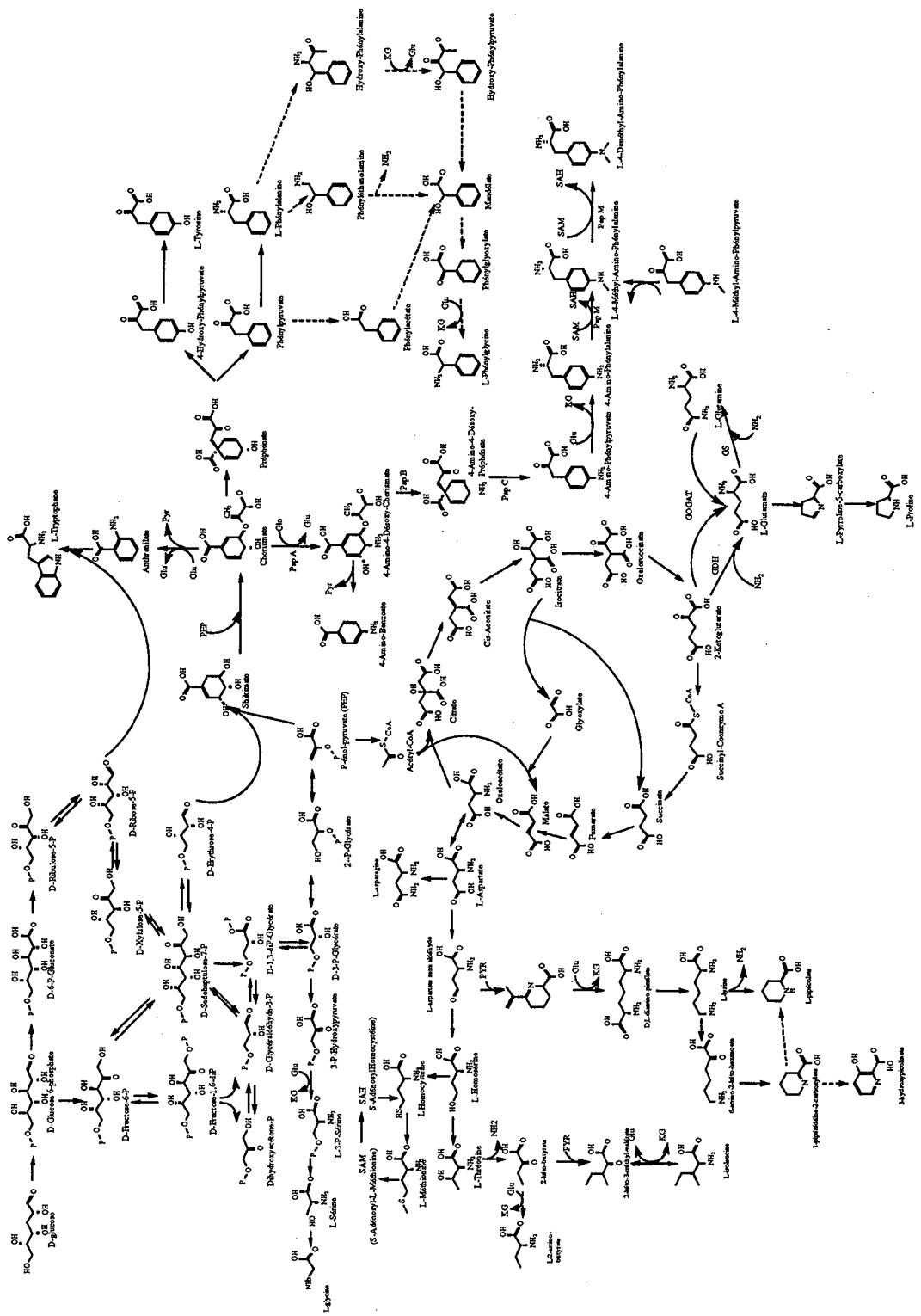


Figure I.5 : Voies de biosynthèse des précurseurs des pristinamycines.

Dans le cas de la 4-monométhyl-*para*-amino phénylalanine (MMPAPA) et de sa forme diméthylée, l'établissement de la voie de biosynthèse s'est inspirée de travaux sur la synthèse de chloramphénicol à partir de l'intermédiaire chorismate. A partir de ce composé, Blanc *et al.* (1997) sont parvenus à l'identification de 4 gènes de biosynthèses (*pap* A, B, C et M) de ces 2 précurseurs. Le gène *pap* A serait responsable de la formation de 4-amino-4-désoxy-chorismate à partir de chorismate et de glutamine.

Le produit de *pap* B serait une mutase dont l'action aboutirait à la production de 4-amino 4-désoxy-préphénate. Ce substrat serait pris en charge par une déshydrogénase résultant de la transcription du gène *pap* C pour conduire à la formation de 4-amino-phénylpyruvate. Une amination du 4-amino-phénylpyruvate en 4-amino-phénylalanine constituerait l'étape suivante. Cependant, le gène impliqué reste non identifié. Les différentes N-méthylations résulteraient quant à elles de l'action de la protéine codée par le gène *pap* M.

Le macrocycle des P_I n'est pas d'origine ribosomique mais est issu de la condensation de 6 résidus d'acides aminés, catalysée par des peptides synthétases multifonctionnelles (Blanc *et al.*, 1994). Ces complexes peptides synthétases se composent de plusieurs modules et chaque module est responsable de l'intégration d'un acide aminé.

Le point de départ de la condensation se fait *via* la formation de l'unité starter : 3-hydroxypicolinate liée au 1er acide aminé du cycle (l'acide D-α-aminobutyrique). Une enzyme impliquée dans cette réaction serait le produit du gène *snb*A qui possède une activité 3-hydroxypicolinate-AMP ligase. *Snb* C serait responsable de l'incorporation de la thréonine et de l'acide α-amino-butyrique. Les produits des gènes *snb* D et E sont, quant à eux, impliqués dans la condensation de la proline, du pipécolate, de la phénylglycine et de la MMPAPA pour la P_IB, ou de la 4-diméthyl-*para*-amino phénylalanine (DMPAPA) pour la P_IA (Thibaut *et al.*, 1997).

II.3.9- Bilans sur les voies de biosynthèse des pristinamycines :

A partir des réactions supposées ou établies décrites Figure I.5, ont été réalisés des bilans sur les différentes voies impliquées dans la biosynthèse des précurseurs des

pristinamycines.

Remarques :

- pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des cofacteurs non connus, le transfert de deux H^+ et de deux électrons est signalé sous la forme 2H
- pour les cofacteurs réduits la convention d'écriture adoptée est $NAD(P)H_2$ au lieu de NAD(P)H, H^+
- dans ces bilans ne figurent pas les molécules d'eau

Bilan pour la biosynthèse de la sérine :

$$\frac{1}{2} glu\cos e + NADPH_2 + NH_3 \rightarrow sérine + 4H$$

Bilan pour la biosynthèse de la glycine :

$$\frac{1}{2} glu\cos e + NADPH_2 + NH_3 \rightarrow glycine + CO_2 + 8H + ATP$$

Bilan pour la biosynthèse de la valine :

$$1 glu\cos e + 2NADPH_2 + NH_3 \rightarrow valine + CO_2 + 4H + 2ATP$$

Bilan pour la biosynthèse de la proline :

$$1 glu\cos e + NADPH_2 + NH_3 \rightarrow proline + CO_2 + 2H$$

Bilan pour la biosynthèse de la thréonine :

$$\frac{1}{2} glu\cos e + CO_2 + NADPH_2 + NH_3 + 2ATP + 2H \rightarrow thréonine$$

Bilan pour la biosynthèse de l'α-amino-butyrate:

$$\frac{1}{2} glu\cos e + CO_2 + 2NADPH_2 + NH_3 + 2ATP + 2H \rightarrow \alpha - a\min obutyrate$$

Bilan pour la biosynthèse du 4-oxopipécolate :

$$1glu\cos e + 3NADPH_2 + NH_3 + ATP \rightarrow 4 - oxopipécolate + 6H$$

Bilan pour biosynthèse du 3-hydroxypicolinate :

$$1glu\cos e + NADPH_2 + NH_3 + ATP \rightarrow 3\text{-hydroxy-picolinate} + 8H$$

Bilan pour la biosynthèse de la phénylglycine:

$$2glu\cos e + NH_3 + 2ATP \rightarrow phény\lg lycine + 2NADPH + 10H + 4CO_2$$

Bilan pour la biosynthèse de MMPAPA:

$$2glu\cos e + 2NH_3 + 7ATP \rightarrow MMPAPA + 2NADPH_2 + 2CO_2$$

Bilan pour la biosynthèse de DMPAPA:

$$2glu\cos e + 2NH_3 + 11ATP + 6H \rightarrow DMPAPA + 2NADPH_2 + CO_2$$

Bilan pour la biosynthèse de CH_3 *via* la méthionine:

$$2CO_2 + 3NADH_2 + 4ATP \rightarrow CH_3^-$$

Bilan pour la biosynthèse d'acétate:

$$\frac{1}{2} glu\cos e \rightarrow ATP + 2NADH_2 + CO_2 + acétate$$

En tenant compte de la stœchiométrie des différents précurseurs, les bilans hors réactions de condensation des précurseurs pour les différentes pristinamycines sont les suivants :

P_IB :

$$8glu\cos e + 8NH3 + 4NADPH_2 + 11ATP \rightarrow P_IB + 3NADH_2 + 5CO_2 + 8H$$

P_IA :

$$8glu\cos e + 8NH3 + 4NADPH_2 + 15ATP \rightarrow P_IA + 4CO_2 + 8H$$

$P_{II}B$:

$$6{,}5glu\cos e + 4NH_3 + 5NADPH_2 \rightarrow P_{II}B + 21NADH_2 + 9CO_2 + 6ATP$$

$P_{II}A$:

$$6{,}5glu\cos e + 4NH_3 + 5NADPH_2 \rightarrow P_{II}A + NADH_2 + 9CO_2 + 6ATP$$

En tenant compte des proportions massiques des différentes pristinamycines habituellement excrétées à savoir $P_{II}A$ (60%), $P_{II}B$ (10%) (PM moyen 525), P_IA (22%) et P_IB (8%) (PM moyen 850), et en négligeant les formes minoritaires des P_I, le bilan suivant est obtenu pour 1 moles de pristinamycines totales :

$$\boxed{\begin{array}{l} 6{,}95glu\cos e + 5{,}2NH_3 + 4{,}7NADPH_2 \Rightarrow \\ 1pristinamycine + 14{,}34NADH_2 + 7{,}58CO_2 + 0{,}02ATP + 16{,}5H \end{array}}$$

De ce bilan, il apparaît que le glucose est le composé précurseur majoritaire des pristinamycines tant d'un point de vue molaire que massique. En conséquence, il résulte de cet état de fait toute l'importance de l'assimilation et du métabolisme de la source carbonée.

I.3- Les enzymes du catabolisme du glucose :

I.3.1- Introduction :

De précédentes études ont démontré que le catabolisme du glucose chez les *Streptomyces* faisait intervenir les voies classiques de dégradation (Fig. I.6) que sont la voie

acides tricarboxyliques (TCA) (Cochrane et Peck, 1953 ; Hockenhull *et al.*, 1954 ; Salas *et al.*, 1984).

Pour ce qui concerne les enzymes de la voie d'Entner-Doudoroff, elles n'ont pu être détectées chez *S. C5*, *lividans* et *aureofaciens* et seraient probablement absentes chez le genre *Streptomyces* (Dekleva et Strohl, 1988 a).

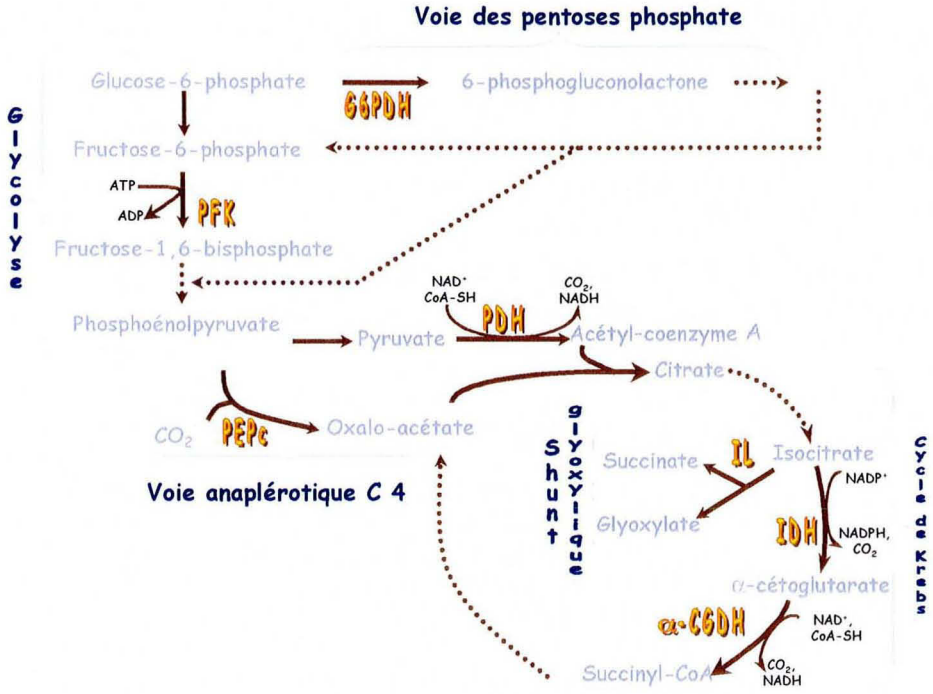


Figure I.6 : Schéma récapitulatif des voies d'assimilation du glucose.

Consécutivement au fonctionnement de ces différentes voies, sont produits des composés intermédiaires qui sont des substrats pour la biosynthèse de métabolites primaires nécessaires à l'élaboration de biomasse.

Avec ces derniers coexistent chez les *Streptomyces,* les antibiotiques regroupés sous le terme de métabolites secondaires. De nombreuses études réalisées essentiellement au moyen de marquages radioactifs ont confirmé l'intégration de produits de dégradation du glucose ou de toute autre source de carbone par le biais ou non des métabolites primaires au sein de ces antibiotiques, et ce, quelle que soit la classe de ces derniers (Mayer et Thiericke, 1993; Thiericke et Zeeck, 1988; Inbar et Lapidot, 1991; Vining *et al.*, 1988).

I.3.2- Le carrefour glycolyse-voie des pentoses phosphates :

I.3.2- Le carrefour glycolyse-voie des pentoses phosphates :

A l'intérieur de la cellule, le glucose-1-phosphate subit une isomérisation en glucose-6-phosphate. Dès lors se présentent à lui deux orientations possibles pour son assimilation postérieure; en l'occurrence la glycolyse ou la voie des pentoses phosphate (PPP).

Ainsi, dans le cas de la synthèse de méthylénomycine (noyau cyclopentanone) par *S. coelicolor* A3(2), il a pu être établi une orientation préférentielle vers la glycolyse pendant la phase de croissance, cette dernière étant jusqu'à cinq fois plus sollicitée que la PPP. Puis, précédemment à l'excrétion de méthylénomycine, un pic d'activité de la PPP a été détecté révélant de ce fait un rééquilibrage du flux entre ces deux voies métaboliques. Bien que s'agissant d'un rapport de radioactivité et bien que les dosages enzymatiques n'aient pas été effectués, il s'agirait vraisemblablement d'une suractivation de la voie des pentoses phosphate plutôt que d'une diminution du flux vers la glycolyse. Une hypothèse permettant d'expliquer cet afflux serait la production de NADPH permettant la condensation du noyau cyclopentanone (Obanye *et al.*, 1996).

Chez *Streptomyces* C5 la synthèse de ε-rhodomycinone (polycétide) fait intervenir le catabolisme du glucose principalement *via* la voie EMP qui fonctionnerait trois fois plus que la PPP (Dekleva et Strohl 1988 a). Cependant ces résultats ne peuvent être comparés avec ceux de Obanye et ses collaborateurs car ils ne discutent pas des contributions relatives des différentes voies lors de la croissance.

Quant à Cochrane et Peck (1953), ils ont établi chez *S. reticuli* et *coelicolor* que la voie des pentoses phosphate était la voie majoritaire du catabolisme général du glucose. Ce résultat intègre la phase de croissance et de production. Salas *et al.* (1984) ont pu montrer une augmentation de la participation de la PPP par rapport à la glycolyse lors de la germination de spores de *S. antibioticus* jusqu'à devenir le chemin principal de dégradation du glucose pendant la phase exponentielle de croissance.

De ces résultats, il ressort que selon l'espèce de *Streptomyces,* la nature de l'antibiotique et le moment de prélèvement des cellules, les flux carbonés relatifs engagés entre la voie des pentoses phosphate et la voie glycolytique varient.

I.3.3- Orientation de l'acétate vers le cycle de Krebs ou vers la biosynthèse de métabolites secondaires?

Un peu plus en aval de ces voies se pose le problème de savoir si l'acétyl-CoA sera engagé ou non dans le cycle de Krebs (TCA). Dans le cas de *S. coelicolor* A3(2) il a été démontré que le *ratio* des flux EMP/TCA diminuait pendant la trophophase jusqu'à un minimum atteint lorsque le rapport PP/EMP est maximal, puis que ce rapport remontait à mesure que la méthylénomycine était synthétisée (Obanye *et al.*, 1996). Ceci semble témoigner d'une réorientation des molécules d'acétate vers la biosynthèse de l'antibiotique plutôt que vers une production énergétique dédiée à l'anabolisme (production de biomasse).

I.3.4. Equipements enzymatiques des Streptomyces :

I.3.4.1- Voie des pentoses phosphate :

Chez *S. C5, lividans* et *aureofaciens*, la PFK et la F-1,6-bisphosphate aldolase sont présentes. Concernant le fonctionnement de la voie des pentoses phosphate, une faible spécificité vis à vis du cofacteur (NAD^+ ou $NADP^+$) de la G6PDH a été rapportée chez *S. aureofaciens* (Neuzil *et al.*, 1986) ainsi que chez *S. lincolnensis*, *rimosus* et *lividans* (Purwantini *et al.*, 1997).

Toutefois, dans le cas de *S. aureofaciens* en présence de NAD^+, l'enzyme G6PDH possède une plus forte sensibilité à l'inhibition provoquée par le phosphate inorganique et notamment par les adénylates qui sont incapables d'inhiber l'activité en présence du cofacteur phosphorylé.

Par ailleurs, il a été démontré que des ajouts de glucose au cours de fermentation de *S. avermitilis* en début de phase de croissance ne provoquaient aucune suppression de cette activité tandis que celle de la 6-phospho-gluconate déshydrogénase (6PGDH) et la production d'avermectine étaient affectées. Par contre ces mêmes ajouts en fin de croissance ont suscité une hausse de l'activité 6PGDH et une augmentation de la quantité d'antibiotique synthétisé (Ikeda *et al.*, 1988).

I.3.4.2- Cycle de Krebs et voies anaplérotiques liées :

Un facteur important influant sur le niveau d'activité des enzymes du cycle de Krebs est la composition du milieu et plus particulièrement en source carbonée (Takebe *et al.*, 1991).

Chez *Streptomyces C5* le cycle de Krebs est complet et fonctionnel (Dekleva, 1987). Quant aux enzymes du shunt glyoxylique elles n'ont pu être détectées chez ce même micro-organisme alors qu'elles sont présentes chez *S. hygroscopicus* (Takebe *et al.*, 1993) et *S. aureofaciens* (Hostalek *et al.*, 1969).

L'étude des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques est indissociable de celles du shunt glyoxylique, de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (fuites vers la synthèse de glutamate) et surtout de celles des voies de carboxylation des C3. Nombre de ces enzymes sont communes au cycles de Krebs et au voies d'assimilation et de synthèse de métabolites intermédiaires (acétyl-CoA, PEP, pyruvate, glutamate, *etc.*).

Les réactions anaplérotiques fournissent l'oxaloacétate et couplées à celle amenant le second substrat (acétyl-CoA), elles alimentent le flux de citrate qui est engagé selon les circonstances vers le cycle du glyoxylate ou de celui de la dégradation intégrale de l'acétate.

I.3.6- Modulation des activités enzymatiques :

I.3.6.1- Oxygénation :

Le fonctionnement du cycle TCA est fortement dépendant de la disponibilité en oxygène dissous présent dans le milieu. Ainsi il a été démontré pour une souche de *S. hygroscopicus* hyperproductrice de bialaphos que les activités aconitate hydratase, isocitrate déshydrogénase et malate déshydrogénase augmentent avec la pression partielle en oxygène. Toutefois chez la souche sous-productrice, ces activités sont insensibles aux variations de PO_2, tandis que pour les deux souches l'activité citrate synthase ne varie pas, et ce, quelles que soient les conditions d'aération (Takebe *et al.*, 1993).

Il a été suggéré un rôle de l'activité respiratoire sur le déclenchement de la synthèse de

granaticine (polycétide) par *S. thermoviolaceus*, corrélé à une consommation moindre en oxygène (James et Edwards, 1991). De même, la production de pristinamycine par *S. pristinaespiralis* évolue parallèlement à une remontée de la teneur en oxygène dans le milieu (Paquet, 1990).

Un autre facteur important influant sur le niveau des enzymes du cycle de Krebs est la composition du milieu, plus particulièrement en source carbonée (Takebe *et al.,* 1991).

I.3.6.2- Passage ("Switch") du métabolisme primaire au métabolisme secondaire :

Parmi les références citées ci-avant une baisse d'activité globale du TCA est corrélée à l'idiophase, particulièrement lorsque des antibiotiques de nature polycétonique sont synthétisés. En ce sens il a été observé une diminution des activités du cycle de Krebs concomitante à la production de polycétides chez un *Penicillium* (Bu'lock *et al.*, 1965).

Dans le cas de *S. hygroscopicus* des différences notables ont été trouvées entre la souche hyperproductrice et sous-productrice de bialaphos au niveau des activités du TCA pendant toute la durée de la fermentation, le cycle fonctionnant beaucoup moins chez la souche hyperproductrice. De plus, il a été décrit une chute des activités aconitate hydratase, citrate synthase et isocitrate déshydrogénase pendant la phase de production du métabolite secondaire (Takebe *et al.*, 1991).

De même, des travaux précédents chez *S. aureofaciens* ont révélé une diminution des activités aconitate hydratase et isocitrate déshydrogénase au moment de la synthèse de chlortétracycline. La citrate synthase semble être chez ce micro-organisme une des étapes limitantes, tout au moins pendant la phase de croissance et lors du début de la phase de production, puis son activité augmente en fin d'idiophase. Ce phénomène étant couplé à une diminution de l'activité de l'aconitate hydratase, ceci concourt à un accroissement du pool de citrate (Hostalek *et al.*, 1969).

Ceci corrobore les observations effectuées chez *S. C5* où il y a excrétion de pyruvate, d'α-cétoglutarate et surtout de citrate lors du déclenchement de la synthèse d'anthracyclines.

Toutefois chez cette bactérie, aucun changement entre la trophophase et l'idiophase concernant l'enzyme malique, la pyruvate carboxylase, la pyruvate déshydrogénase, la pyruvate kinase, la citrate synthase et l'α-céto-glutarate déshydrogénase n'a été observé (Dekleva et Strohl, 1988 b).

Une autre enzyme ayant un comportement singulier est la malate déshydrogénase car elle possède une activité sans commune mesure avec les autres enzymes, qui ne cesse de croître au cours de la fermentation (Hostalek *et al.*, 1969 ; Takebe *et al.*, 1991). De plus, il existerait une corégulation de son activité avec celle de la citrate synthase selon Hostalek (1969). L'oxalo-acétate accumulé consécutivement à ceci serait éliminé par la malate déshydrogénase décarboxylante (E.C. 1.1.1.40) pour former du pyruvate.

Les enzymes du shunt glyoxylique dont l'activité est moindre voient leur contribution augmenter légèrement lors de la phase de production d'idiolites, ceci essentiellement dans le cas de la malate synthase (Takebe *et al.*, 1991 ; Hostalek *et al.*, 1969). La tendance est inverse au profil d'évolution globale du TCA.

L'étude des voies de formation et d'utilisation de l'oxaloacétate chez *S. aureofaciens* a révélé l'absence de PEP carboxykinase et pyruvate carboxylase. L'activité détectée est celle de la PEP carboxylase qui serait corégulée avec la citrate synthase de façon négative par l'ATP (Hostalek *et al.*, 1969). Cette PEP carboxylase a été caractérisée et son fonctionnement est Mn^{2+} dépendant ; la présence d'acétate active sa biosynthèse et fait diminuer le K_m pour le PEP (Vorisek *et al.*, 1968). Chez *S.* C5 son activité s'accroît durant la période d'accumulation d'anthracycline (Dekleva et Strohl, 1988 b ; Behal *et al.*, 1970).

I.3.7- Conclusions :

A l'évidence, le manque d'information sur les autres enzymes du catabolisme de la source de carbone rend difficile la compréhension de toutes ces observations.

De plus, les dosages d'activités enzymatiques *in vitro* ne sont que le reflet de phénomènes de régulation de biosynthèse des enzymes mais ils ne peuvent rendre compte de l'action des différents effecteurs *in vivo*. Ce type d'étude devrait faire appel à des dosages de

métabolites *in vivo*.

Enfin la plupart des antibiotiques produits parmi les références citées sont des polycétides à l'exception du bialaphos. Or dans le cas de l'étude des flux carbonés chez *S. pristinaespiralis*, il est possible de présumer que les enzymes communes au TCA et au cycle du glyoxylate ne seront peut être pas autant inactivées que dans les cas cités précédemment. Ceci est dû au fait que la synthèse des précurseurs fait aussi appel à des intermédiaires du cycle de Krebs et notamment pour toutes les réactions de transamination au moyen de glutamate.

I.4 -Le pH intracellulaire :

I.4.1- Introduction :

Le pH de l'environnement des micro-organismes, paramètre physico-chimique déterminant pour le développement et la prolifération cellulaire, a fait l'objet de nombreuses études. Suivant le domaine de valeurs de pH favorable à la croissance des micro-organismes, ces derniers ont été classés comme : acidophiles (pH= 6,5-7), neutrophiles (pH 7,5-8) et alcalophiles (pH 8,4–9).

Bien que différents micro-organismes ont été découverts dans des milieux aux pH extrêmes allant de 1 à 11, la plupart se développent dans des milieux de pH avoisinant la neutralité et sont relativement intolérants à de grandes variations de pH qui sont susceptibles d'affecter la concentration cytoplasmique en protons. Il existe cependant quelques exemples remarquables de champignons qui peuvent croître sur des milieux de pH allant de 2 à 10.

Afin de tenter de pallier les fluctuations du pH, les cellules ont développé des systèmes de régulation du pH intracellulaire (qui sera abrégé en pH_i), il est généralement admis que pour la majorité des micro-organismes le pH_i varie de 0,1 unité pour 1 unité de variation au niveau extracellulaire (Padan *et al.*, 1981; Booth, 1985).

I.4.2- Rôles du pH intracellulaire (Fig. I.7) :

I.4.2.1- Croissance :

Une des conséquences visibles des fluctuations du pH est la variation de la vitesse spécifique de croissance. Ainsi il a été montré chez *Streptococcus faecalis* une croissance rapide dépendante d'une alcalinité du milieu environnant. Cependant, cette espèce est tolérante à des variations de plus d'une unité de part et d'autre du pH optimum de croissance. Chez *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium thermoaceticum* et *Streptococcus cremoris*, le pH_i, initialement alcalin diminue de 0,8-1 unité parallèlement à l'accumulation intracellulaire d'acides organiques et ces organismes restent même viables à des valeurs inférieures à 6,0. Dans le cas d'*Escherichia coli*, il a pu être établi une forte sensibilité aux variations de pH_i impliquant l'existence de mécanismes de régulations tendant à respecter l'homéostasie du pH_i. A un pH_i de 7,2, la croissance est inhibée à 50 %, tandis que l'inhibition de la croissance est totale entre 6,6 et 6,8.

Généralement l'influence du pH_i sur la vitesse de croissance est spécifique (Booth, 1985) et dans le cas du genre *Streptomyces* il n'existe actuellement aucune donnée sur les valeurs de pH_i. Cet aspect macroscopique de l'influence du pH_i est la conséquence de toute une série de modifications et modulations à l'échelle moléculaire.

I.4.2.2- Réactions physico-chimiques :

L'affectation de la croissance par la concentration en ions H^+ est en fait la conséquence de l'influence que ces protons peuvent exercer au sein de la cellule. Le pH joue un rôle fondamental lors de réactions physico-chimiques telles que la solvolyse, l'ionisation de composés et les oxydo-réductions.

I.4.2.3- Force protomotrice :

Le pH_i intervient au niveau de la force protomotrice qui est définie par la formule

suivante :

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} / F = \Delta\psi - z\Delta pH \quad (z = 2{,}3RT / F)$$

où $\Delta\psi$ représente le potentiel membranaire et Δ représente les différences entre l'intérieur et l'extérieur des cellules.

En conséquence à l'établissement de cette force protomotrice, sont régis les flux des nutriments tels que le maltose et les acides aminés dans le cas de la levure (Imai et Ohno, 1995) et ceux des composés de dégradation à travers les membranes vers l'intérieur et l'extérieur des cellules.

I.4.2.4- Activités enzymatiques :

L'activité des enzymes particulièrement, est souvent limitée à des domaines de pH restreints. Leur stabilité est aussi fortement assujettie aux valeurs du pH environnant, même pour des molécules intracellulaires caractéristiques de micro-organismes isolés dans des milieux aux pH extrêmes.

Au niveau de la glycolyse, la phospho-fructo-kinase est une enzyme particulièrement sensible aux variations de pH. Lors d'un changement de 0,1 unité *in vitro*, l'activité diminue de 10 à 20 fois. Par ailleurs son pH optimum est fonction de la concentration en fructose-6-phosphate. Il a même été suggéré que ces variations d'activité dépendantes du pH seraient le mécanisme principal de régulation de la voie glycolytique pour des cellules musculaires (Padan *et al.*, 1981). Pour ce qui concerne *Saccharomyces cerevisiae*, le contrôle de l'activité d'enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogénèse est exercé par le pH_i et par une série de réactions impliquant des protéines kinases dépendantes de l'AMP_c. La biosynthèse de ce nucléotide cyclique est elle même sous influence du pH_i (Imai et Ohno, 1995). Il a aussi été démontré chez la levure en présence d'agents dépolarisants, une acidification du pH_i entraînant une augmentation du niveau intracellulaire d'AMP_c (Thevelein *et al.*, 1987).

Des différences d'activités d'enzymes appartenant à diverses voies métaboliques, il peut résulter des réorientations sur la biosynthèse de certains produits. Chez *E. Coli* à pH 6,2 il y a production de H_2 et de CO_2 à partir de glucose ; au delà de pH 7,8 l'activité formiate

lyase est inhibée et se produit une accumulation de formiate.

Une autre catégorie d'enzymes susceptible d'être fortement affectée par les fluctuations de pH est celle des cytochromes oxydases. Ces catalyseurs de la réductions des accepteurs finaux d'électrons ont une activité dépendante du potentiel d'oxydo-réduction qui est pour sa part corrélé au pH.

I.4.2.5-Autres composantes du métabolisme :

Dans le cas de la levure, une diminution du pH de 2 unités entraîne une diminution des rendements de biosynthèse d'ATP par molécule de glucose consommée. Au cours de travaux visant à prédire les capacités de fermentabilité des moûts par *Sacch. cerevisiae* en mesurant le pH_i, il a pu être établi une corrélation entre le pH_i et la viabilité, la prolifération et le contenu en ATP. Il apparaît au terme de cette étude que le pH_i soit impliqué dans la mort cellulaire car parallèlement à une diminution de l'activité ATPase consécutive à une baisse de l'ATP intracellulaire, la vitesse d'extrusion des protons est affectée (Imai et Ohno, 1995).

Enfin, ont été rapportés quelques cas où le contenu intracellulaire en Ca^{2+} serait lié à des changements de pH_i et réciproquement, mais les mécanismes impliqués restent inconnus (Padan *et al.*, 1981). En relation avec le contenu intracellulaire en Ca^{2+}, le pH_i serait impliqué dans des phénomènes de mobilité des cellules et de contractions musculaires (Heiple et Taylor, 1980).

I.4.2.6- Différenciation cellulaire :

Fait remarquable, un rôle de signal au niveau de la différenciation cellulaire a été assigné au pH_i pour différents organismes. Dans les cas de *Pichia pastoris* et de deux espèces de *Bacillus*, un phénomène d'élévation du pH_i de plus d'une unité au cours de la germination des spores a été rapporté. A un degré moindre la fertilisation d'œuf d'oursin provoque une alcalinisation de la cellule en moins de quatre minutes (Padan *et al.*, 1981).

Chez les champignons et plus particulièrement *Penicillium chrysogenum*, la

I.4.3- Effecteurs des variations du pH intracellulaire :

Le pH_i est dépendant de la composition du milieu extracellulaire de par l'existence de flux de composés vers le milieu intracellulaire *via* des systèmes de transports spécifiques ou non, passifs ou actifs en terme d'énergétique cellulaire. Le facteur principal est le passage de protons à travers la membrane cytoplasmique (Padan *et al.*, 1981).

Toutefois, les perturbations engendrées au niveau intracellulaire sont également corrélées au métabolisme qui entraîne la production et la consommation de protons. Parmi les molécules potentiellement responsables de telles fluctuations, sont répertoriés les acides organiques et les bases, tels certains acides aminés.

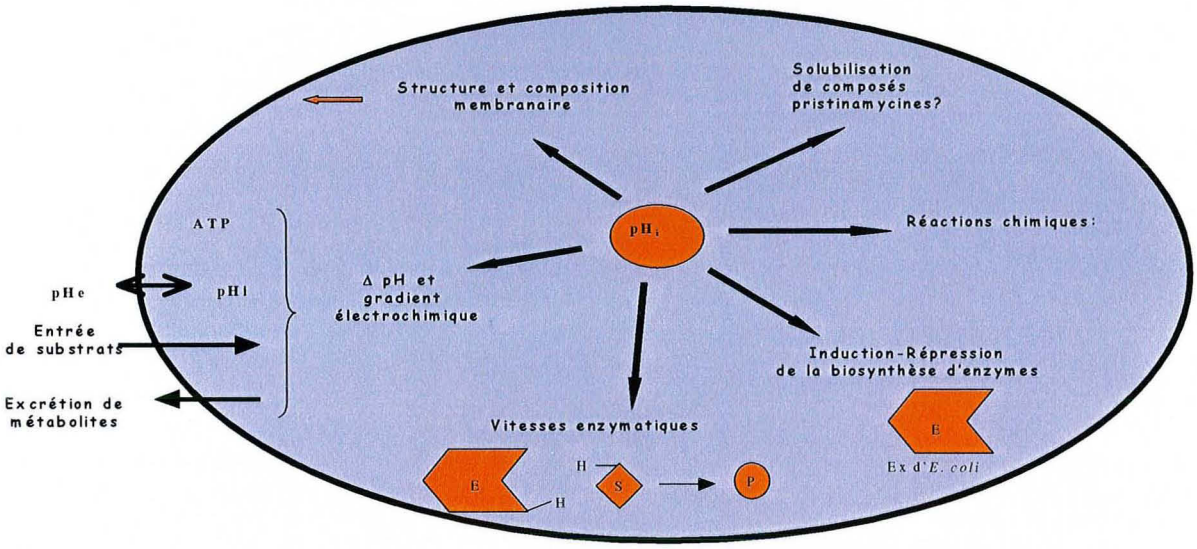


Figure I.7 : Récapitulatif des différentes relations entre le pH_i et le métabolisme.

Les produits du métabolisme intracellulaire sont quant à eux fonction de la composition du milieu extracellulaire. Dans le cas de bactéries anaérobies sur milieu sans nitrite, l'assimilation de l'ammonium et la production intracellulaire d'acides organiques conduisent à une acidification du pH du cytoplasme. Chez *Neurospora crassa* la cause principale de l'acidification du milieu intracellulaire serait la production d'acides organiques.

Pour ce qui concerne les micro-organismes fermentaires, il semble qu'ils soient sujets à de plus fortes variations de pH_i que ceux possédant uniquement un métabolisme respiratoire ; une explication plausible serait une plus forte production d'acides organiques

nitrite, l'assimilation de l'ammonium et la production intracellulaire d'acides organiques conduisent à une acidification du pH du cytoplasme. Chez *Neurospora crassa* la cause principale de l'acidification du milieu intracellulaire serait la production d'acides organiques.

Pour ce qui concerne les micro-organismes fermentaires, il semble qu'ils soient sujets à de plus fortes variations de pH_i que ceux possédant uniquement un métabolisme respiratoire ; une explication plausible serait une plus forte production d'acides organiques (Booth, 1985).

I.4.4- Systèmes de régulation du pH intracellulaire :

I.4.4.1- Pouvoir tampon du cytoplasme :

Certains composés intracellulaire ont des capacités tampon importantes. Ceci est notamment le cas de certains acides aminés qui possèdent des chaînes latérales particulières. Ce pouvoir tampon est d'autant plus fort que le pH_i s'écarte du pH_i habituel et que le pH_e est faible. Suivant les espèces, cette capacité est chiffrée entre 50 et 100 nmoles d'H^+/u pH/mg de protéine.

Toutefois cette propriété est insuffisante à elle seule pour réguler le pH_i (Booth, 1985 ; Guldfeldt et Arneborg, 1998).

I.4.4.2- Enzymes :

Il a été décrit chez *E. coli* une induction de la biosynthèse de certaines enzymes en réponse à des fluctuations de pH. Lorsque le pH du milieu devient alcalin, la biosynthèse d'amino-acides désaminases est accrue ; à pH acide seule la synthèse de décarboxylases augmente. Il en résulte la formation des acides et amines correspondants qui pourraient contribuer à contrebalancer les variations de pH. Toutefois, il n'a pas été mis en évidence de rôle direct de cette induction dans l'homéostasie du pH et les mécanismes de l'induction ne sont pas élucidés (Padan *et al.*, 1981; Booth, 1985).

Un autre exemple de réponse à des variations de pH est la réorientation des voies

métaboliques. Ainsi *Clostridium acetobutylicum* convertit le butyrate en un composé moins acide tel que le butanol, alors que *Klebsiella aerogenes* dévie son métabolisme vers la biosynthèse de butanediol à partir d'acétate.

Chez les végétaux, la biosynthèse de PEP carboxylase serait induite à pH alcalin afin de diriger les flux vers la biosynthèse de malate qui est considéré comme acide fort. Dans le cas de pH_i faible, l'enzyme malique est induite et le pyruvate résultant possède un pK_a plus grand que le malate (Booth, 1985).

I.4.4.3- Imperméabilité membranaire :

En réponse au stress occasionné par des variations de pH, les micro-organismes ont développé divers mécanismes de régulation du pH cytoplasmique. Un des moyens les plus élémentaires pour éviter des fluctuations de pH occasionnées au niveau extracellulaire est la grande imperméabilité de la membrane cytoplasmique vis à vis des H^+ et des OH^-.

Chez certains acidophiles comme *Thermoplasma* et *Sulfoglobus* qui ne possèdent pas de paroi cellulaire, les membranes contiennent presque exclusivement des lipides complexes dérivés de C40 alkylglycéroldiéthers. La longue chaîne hydrocarbonée contribuerait à une fluidité membranaire appropriée tandis que la liaison avec l'autre groupement permettrait de résister à des réactions d'hydrolyse acide. Une autre propriété remarquable des acidophiles est la présence d'acide gras cycliques au niveau membranaire (tel le cyclopropane chez certains thiobacilles) permettant une augmentation de la rigidité des structures (Padan *et al.*, 1981).

I.4.4.4- Pompe primaire à protons :

Comme les pompes primaires à protons sont en contact avec les milieux extracellulaire et intracellulaire, il leur a rapidement été attribué un rôle potentiel dans la régulation du pH_i. Leur nécessité a pu être démontrée chez *E. coli* où des variations de pH_e imposées, soit en présence d'agents découplants, soit en les inactivant directement, ont conduit à un équilibre des pH alors qu'habituellement le pH_i reste fixé à 7,6. Il apparaîtrait toutefois qu'au cours des

changements de pH provoqués, le flux de protons excrétés reste constant. Chez les acidophiles, ce mécanisme serait l'agent principal de régulation du pH_i (Padan *et al.*, 1981).

I.4.4.5- Antiport Na^+/H^+ :

Le fonctionnement de ces transporteurs chez *E. coli* contribue à créer un gradient de protons inverse à celui engendré par l'action des pompes primaires à H^+, dans la mesure où des ions Na^+ sont excrétés simultanément à un flux entrant d'H^+. La spécificité de ce système est relativement forte vis à vis des ions sodium mais il peut aussi prendre en charge les Li^+. Le fonctionnement de ce système dans des conditions de pH acide respecte le principe d'électroneutralité, tandis que lors d'alcalinisation du milieu extracellulaire il est électrogénique. Cette constatation implique un changement de la stœchiométrie des ions pris en charge suivant les conditions de pH. Dans le cas particulier des alcalophiles qui a été peu étudié, l'entrée d'H^+ pour maintenir le cytosol acide se ferait *via* un système à antiport Na^+/H^+ (Padan *et al.*, 1981).

I.4.4.6- Antiport K^+/H^+ :

De tels transporteurs ont été mis en évidence chez *E. coli* et ces molécules présentent une activité optimale à pH 8. Leur action respecte le principe d'électroneutralité entre pH 7 et 9. Elle est beaucoup moins spécifique que les antiports à sodium car ces transporteurs sont capables de prendre en charge beaucoup d'autres cations tels que : Na^+, Li^+, Rb^+ et Ti^+. L'action de pompes primaires à K^+ permet de faire rentrer à nouveau ces ions à l'intérieur des cellules parallèlement à l'hydrolyse d'ATP. Ce type de pompe primaire n'existe pas pour les Na^+ et le maintien de la quantité de Na^+ intracellulaire ferait intervenir un système de transporteur antiport Na^+/K^+ directement lié au gradient de protons.

I.4.4.7- Conclusions :

Le principal des recherches sur les mécanismes de contrôle du pH_i a été focalisé sur

les cations, mais il n'est pas exclu que certains transporteurs antiport OH^-/anions soient impliqués. Les mécanismes et sites d'induction des activités des transporteurs restent également encore obscurs (Booth, 1985).

Le maintien du pH_i dans un certain domaine est indispensable et fait intervenir de nombreux mécanismes de façon à maintenir des ΔpH positifs chez la plupart des micro-organismes à l'exception des alcalophiles. Il peut cependant se produire des inversions du ΔpH lors de fortes variation du pH_e. Il semble que beaucoup de bactéries neutrophiles régulent leur pH interne de façon similaire à *E. coli* (Padan *et al.*, 1981 ; Booth, 1985).

Chez les bactéries lactiques le pH_i n'est pas régulé aussi finement que dans le cas d'*E. coli*, et généralement, les lactocoques, les lactobacilles, les bactéries fermentaires et les clostridies possèdent un pH_i qui diminue parallèlement au pH extracellulaire. Toutefois certaines espèces telles que *Lactococcus lactis* ont développé des systèmes inductibles de tolérance aux pH acides. Des incubations préalables de ces bactéries dans des milieux de pH légèrement supérieur aux valeurs entraînant le décès cellulaire permettant ensuite de les faire résister et croître dans des conditions de pH acides. Un autre fait remarquable est que cette acido tolérance est induite parallèlement à d'autres résistances, vis à vis de la chaleur, de l'H_2O_2, de l'éthanol et du NaCl. Les molécules responsables de ces résistances croisées induites seraient de nature protéique et leur synthèse dépend d'une capacité des cellules à maintenir un pH_i légèrement supérieur à celui de bactéries non préalablement stressées (O'Sullivan et Condon, 1997).

I.4.5- Les différentes méthodes de mesure du pHi :

I.4.5.1- La micro-électrode à pH :

Actuellement il existe de nombreuses méthodes pour la détermination du pH intracellulaire. Une des plus simples est la micro-électrode en verre à pH fonctionnant suivant le même principe que les électrodes à pH classiques. Son utilisation est restreinte aux cellules de taille conséquente telles que certaines cellules eucaryotes (Slavik, 1983 ; Franck *et al.*, 1996). Un autre inconvénient lié aux contraintes expérimentales est que l'utilisation de micro-

électrode est impossible sur des cellules mobiles telles que les amibes (Heiple et Taylor, 1980).

I.4.5.2- Les sondes :

I.4.5.2.a- Remarques générales sur l'utilisation des sondes :

L'utilisation de sonde peut s'avérer délicate et exige quelques prérequis. La forme neutre doit pouvoir franchir la barrière membranaire tandis que l'espèce moléculaire ionisée ne doit pas ressortir de la cellule. L'entrée des sondes ne doit pas faire intervenir à quelque niveau que ce soit un mécanisme de transport actif, l'énergie consommée pouvant perturber les quantités de protons pris en charge au niveau d'ATPase. Les sondes ne doivent ni interférer avec le métabolisme intracellulaire ni être métabolisées. Les sondes ne doivent pas interagir avec le système de dosage comme cela peut-être observé avec des fluorochromes et ne pas donner lieu à la création de liaisons non spécifiques avec des composants cellulaires (Booth, 1985).

I.4.5.2.b- Acides et bases faibles froids ou marqués :

Des acides faibles peuvent être employés lorsque le pH_i à étudier est supérieur au pH_e dans le cas inverse des bases faibles peuvent être utilisées. Le principe de cette méthode repose sur l'égalité de la répartition en acide de part et d'autre de la membrane. De cet équilibre il résulte l'équation suivante :

$$K_a = \frac{[H^+]_i * [A^-]_i}{[AH]_i} = \frac{[H^+]_e * [A^-]_e}{[AH]_e}$$

Cette égalité implique que cette constante de dissociation soit identique dans les milieux extracellulaire et intracellulaire. A cette condition et pour un $pH_e > pK_a + 1$, la différence de pH de part et d'autre de la membrane peut être déterminée d'après la relation suivante :

$$pH_i - pH_e = Log\frac{[A^-]_i}{[A^-]_e}$$

Le pH extracellulaire pouvant être aisément mesuré, le calcul du pH_i devient alors réalisable. Les quantités d'acide ionisé sont dosées par titrimétrie, ou par radiométrie dans le cas de sondes marquées telles que l'acétate et la méthylamine (Padan *et al.*, 1981).

L'inconvénient majeur de cette méthode se situe au niveau du temps requis pour la diffusion de la sonde à l'intérieur des cellules et aussi de la quantité accumulée. Par ailleurs la présence de molécules acides ou basiques peut perturber l'établissement du gradient électrochimique (Molenaar *et al.*, 1991).

I.4.5.2.c- Spectroscopie au ^{31}P :

Les cellules sont incubées en présence de sondes telles que du phosphate ou du méthylphosphonate comportant du ^{31}P qui pénètrent dans les cellules. D'après le déplacement chimique mesuré par résonance magnétique nucléaire, il est ensuite possible de remonter au pH_i. Cette méthode permet d'effectuer des mesures de pH_i pouvant aller jusque 7,8 pour le phosphate et jusque 9 dans le cas du méthylphosphonate.

Cette méthode reste toutefois peu usitée de part les coûts d'équipement assez élevés (Booth, 1985) et elle nécessite de travailler avec des suspensions de fortes concentrations cellulaires (Imai et Ohno, 1995). Tout comme la méthode de distribution des acides et des bases faibles, elle présente l'inconvénient de donner des temps d'analyse relativement longs (acquisition du spectre) qui ne permettent pas d'entrevoir des variations rapides du pH_i (Leyval *et al.*, 1997 ; Imai et Ohno, 1995, Molenaar *et al.*, 1991).

I.4.5.2.d- Sondes fluorescentes :

Il existe deux types de sondes fluorescentes : celles dont l'entrée à l'intérieur des cellules est fonction du pH et les molécules à fluorescence dépendante du pH. Seul le deuxième type de fluorochrome sera développé car majoritairement utilisé (Métézeau *et al.*, 1994 b). Les fluorochromes sont propices à des études de variations rapides du pH et

présentent l'avantage d'une faible toxicité vis à vis des cellules et ne sont pas métabolisés (Molenaar *et al.*, 1991). Un autre avantage est la spécificité de localisation de certaines sondes qui peut permettre l'étude exclusive de certains compartiments cellulaires tels les lysosomes de macrophages (Ohkuma et Poole, 1978).

La fluorescence repose sur les propriétés de molécules qui possèdent certains électrons pouvant subir des transitions entre un état fondamental et un état singulet excité très court de l'ordre de 10^{-7}-10^{-9} seconde sous l'incidence d'une onde lumineuse. Puis lors du retour des électrons à l'état fondamental, l'énergie absorbée est restituée sous forme de lumière de longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente (écart de Stokes). Pour permettre une récupération du signal avec une bonne résolution, la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission doivent être séparées d'au moins 20 nm (Métézeau *et al.*,1994 a).

De l'état de protonation du fluorochrome, autrement dit du pH, dépend la disponibilité de ces électrons qui pourront subir ou non des transitions sous excitation lumineuse. Cependant de multiples autres facteurs interviennent sur l'intensité de fluorescence, parmi lesquels : l'environnement ionique du fluorochrome, sa concentration, la présence de molécules dont le spectre d'excitation est chevauchant avec celui d'émission du fluorochrome (quenchers). Ce phénomène d'atténuation de la fluorescence est souvent rencontré avec les dérivés de carboxyfluorescéine. La nature chimique de ces « quenchers » de fluorescence est souvent protéique ou peut être le fluorochrome lui même (self quenching). Cependant, la dernière possibilité reste sujet à controverse (Molenaar *et al.*, 1991).

Actuellement ces sondes se présentent souvent sous la forme estérifiée du colorant. La présence de ces groupements esters facilitent la diffusion des fluorophores à travers la membrane cytoplasmique. A l'intérieur des cellules et sous l'action des estérases intracellulaires, les groupements esters sont clivés et les sondes chargées plus ou moins négativement sont retenues au niveau intracellulaire et sont alors potentiellement fluorescentes.

Dans la majorité des cas l'entrée des fluorochromes ne pose pas de problèmes particuliers pour les cellules eucaryotes. La situation est légèrement différente chez les bactéries où la diffusion de ce type de sonde n'est pas toujours aisée et particulièrement au

travers des parois, ce qui limite le nombre d'applications bactériennes. Un exemple flagrant est le cas d'*Halobacterium halobium* où une incubation de 4 jours des cellules avec le BCECF est requise (Tsujimoto *et al.*, 1988). Dans le cas de *Lactococcus lactis*, la présence d'HCl à 50-100 mM est indispensable à l'entrée du BCECF qui est dans ces conditions totalement protoné au niveau des groupes carboxyles. La condition *sine qua non* à l'application de telles procédures est une résistance du micro-organisme à un choc acide, fait peu courant (Molenaar *et al.*, 1991). Un autre problème est qu'il se produit vraisemblablement une perturbation du pH_i qui doit être intégrée aux résultats mesurés.

Une limite à l'utilisation des sondes fluorescentes est l'efflux important qui entache les mesures (bruit de fond important) et qui peut nécessiter des corrections. Ce relarguage est caractéristique de la nature du colorant et dépendant de l'espèce étudiée. Il est d'autant plus important que la température expérimentale est élevée et il peut être fonction du pH extérieur. Il a été démontré chez *Lactococcus lactis* que l'apport de lactose contribuait à l'accroître. Il apparaît dans ce cas que le phénomène suit une loi cinétique de premier ordre et que le système de transport est de nature actif et peu spécifique du colorant (Molenaar *et al.*, 1991)

I.4.5.2.e- Les différents fluorochromes :

Fluorochrome	λ_{ex1} max (nm)	λ_{ex2} max (nm)	λ_{em1} max (nm)	λ_{em2} max (nm)	pK_a	Remarques
ADB	360		430	460	8,0	Efflux
BCECF-AM	440	505	530	620	6,98	Stable
4-MU	350		450	560	7,8	Efflux
CarboxySNAFL2	490/514	530	620		7,0	
CarboxySNARF1	480/514/534		570	643	7,5	Bonne résolution
9-amino-acridine	399		430			

Tableau I.4 : Caractéristiques spectrales des fluorochromes les plus répandus. Longueurs d'ondes d'excitations et d'émission maximales.

Les fluorophores utilisés sont dérivés d'un petit nombre de molécules que sont : l'acridine, le phénantrène et la fluorescéine. Ils doivent regrouper les qualités physico-chimiques suivantes : coefficient d'extinction molaire élevé pour éviter de travailler à trop grande concentration, rendement quantique (nombre de photons émis/nombre de molécules excitées) élevé, bonne photostabilité. Ils doivent aussi posséder un pK_a centré sur le domaine de variation du pH_i de l'organisme concerné (Métézeau *et al.*,1994 a) (Tab. I.4).

Les sondes les plus couramment utilisées sont l'ADB (1,4-diacétoxy-2,3-dicyanobenzène) et le BCECF car leur variations de fluorescence sont généralement adaptées aux variations physiologiques du pH et leurs caractéristiques spectrales compatibles avec les sources lumineuses habituelles (Métézeau *et al.*,1994 a)

I.4.5.2.f- Techniques ratiométriques :

Dans le cadre d'étude du pH_i, les techniques ratiométriques sont fréquemment utilisées car elles procurent l'avantage de simplifier la calibration et améliorent la précision des mesures. Elles permettent d'occulter des artéfacts liés à : des différences de colorations des cellules, l'hétérogénéité de taille des cellules et la photolyse de la sonde.

On distingue deux modes de technique ratiométrique. La première dénommée technique ratiométrique à double excitation consiste en deux excitations successives à deux longueurs d'onde différentes et en la récupération des fluorescences émises consécutivement pour chaque excitation à une même longueur d'onde. La première longueur d'onde choisie de la lumière excitatrice est généralement telle que l'excitation de la sonde est identique, quel que soit le pH (point isosbestique) et la seconde telle que l'excitation soit fonction du pH du milieu (Métézeau *et al.*, 1994 b).

L'autre possibilité est la technique ratiométrique à double émission. Dans ce cas, l'excitation à une même longueur d'onde est réalisée à deux reprises. Les signaux de fluorescence sont enregistrés à deux longueurs d'ondes. A l'une des deux, la fluorescence émise est proportionnelle au pH environnant et à l'autre non. A l'origine, cette technique a été développée pour des applications en microscopie confocale car ce type d'appareillage possède

comme source excitatrice un laser à l'argon qui restreint les possibilités de longueurs d'ondes d'excitation (Slavik, 1997).

Habituellement la technique ratiométrique à double excitation est d'usage, cependant, depuis une dizaine d'années, l'autre solution est aussi employée. Dans le cas de cellules bovines, Morris (1990) a utilisé lors de doubles marquages (BCECF et autres fluorochromes) une technique ratiométrique à double émission pour étudier les changements des concentrations en calcium intracellulaire. Depuis, Slavik (1997) à confirmé cette possibilité en effectuant des mesures ratiométriques de fluorescence du BCECF dilué dans des tampons de différents pH au spectrofluorimètre.

I.4.5.2.g- Appareillage de mesures de fluorescence :

L'utilisation de fluorochromes combinée à des mesures spectrofluorimétriques pour étudier le pH_i chez les eucaryotes a été largement décrite (Sontag, 1977 ; Okhuma et Poole, 1978 ; Visser *et al.*, 1979 ; Thomas *et al.*, 1979).

Plus récemment, l'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) s'est avérée efficace pour réaliser des mesures de pH_i par fluorescence. Ainsi les pH_i de cellules d'hybridomes murins et de *Corynebacterium glutamicum* ont été étudiés par CMF par marquages respectifs au BCECF-AM et au c-SNARF-1 (Franck *et al.*, 1996 ; Leyval *et al.*, 1997).

Avec l'avènement de caméras performantes et de logiciel de traitements d'images, une quantification de signaux au niveaux des images est appelée à se développer (Knight, 1989). Dans ce sens, les signaux de fluorescence en rapport avec les valeurs de pH_i ont été quantifiés par analyse d'image et microscopie pour des cellules individualisées (Heiple et Taylor, 1980 ; Siegumfeldt *et al.*, 1999) et surtout chez les eucaryotes (Slavik, 1983 ; Paradiso *et al.*, 1987 ; Guldfeldt et Arneborg, 1998).

La finesse de résolution apportée par cette méthode est telle que dans certains cas comme chez *Endomyces magnusii* une topographie du pH intracellulaire a pu être réalisée (Slavik, 1983). L'utilisation de sondes fluorescentes est un outil de choix pour les investigations du pH_i car elle autorise dans certains cas une résolution à 0,01 unité pH avec

une définition spatiale de 200 nm en microscopie confocale et des temps de définition de l'ordre de la milliseconde (Slavik, 1997).

I.4.6- L'analyse d'images chez les Streptomyces :

Basée sur la supposition d'un lien étroit entre la morphologie de *Streptomyces* et la production de métabolites secondaires, une grande majorité des travaux réalisés par analyse d'images chez cette bactérie traite de sa morphologie (Paul et Thomas, 1998 ; Cox *et al.*, 1998). L'étude de chaque morphologie (filaments, enchevêtrements et pelotes) a été effectuée indépendamment.

Sur les filaments mycéliens ont été menées diverses investigations telles que : la quantification des septations le long de ces filaments, la quantification et localisation des zones pleines et vides des filaments (Drouin *et al.*, 1997).

Concernant les morphologies plus complexes, différentes études portent sur la classification des formes de croissance en enchevêtrements et en pelotes. Ceci a notamment été réalisé par Yang et ses collaborateurs (1996) chez *Streptomyces virginiae* (fortement apparenté à *S. pristinaespiralis*). Ces classifications sont fondées sur le calcul de paramètres tels que la circularité, l'aire projetée et le périmètre de la forme (Durant *et al.*, 1994 a et b ; Cox et Thomas, 1992).

En revanche, très peu de publications relatent des mesures de paramètres physiologiques par analyse d'images et microscopie. Parmi les différents rapports existants, il faut noter la localisation de l'activité respiratoire au sein de filaments de *S. ambofaciens* après coloration des filaments à l'INT (Mauss *et al.*, 1997). Plus récemment, Pons *et al.* (1998) ont travaillé sur la quantification de fuites en certains composés cellulaires à travers la membrane de *S. ambofaciens* en utilisant du violet de gentiane.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes :

II.1- Liste du matériel : 53

II.2- Composition et préparation des milieux de culture : 53

II.2.1- Milieu de sporulation et de dénombrement des spores de *Streptomyces pristinaespiralis* (Paquet, 1990) : 53

II.2.2- Milieu de culture des spores de *S. pristinaespiralis* : milieu complexe insoluble ICS : 53

II.2.3- Milieu de culture de *S. pristinaespiralis* (milieu synthétique MPS 2) : 54

II.3- Conditions de culture : 55

II.3.1-Préparation du stock de spores de *Streptomyces pristinaespiralis* pr 11 : 55

II.3.2- Préculture de *S. pristinaespiralis* sur milieu complexe : 55

II.3.3- Culture de *S. pristinaespiralis* en fiole d'Erlenmeyer : 56

II.3.4- Culture de *S. pristinaespiralis* en fermenteur discontinu : 56

II.3.5- Culture de *S. pristinaespiralis* en fermenteur continu : 57

II.4- Estimation de la biomasse : 58

II.4.1- Méthode spectrophotométrique (d'après Lubbe *et al.*, 1985) : 58

II.4.2- Méthode gravimétrique : 58

II.5-Mesure du pH intracellulaire : 58

II.5.1- Préparation des solutions : 58

II.5.1.1- Préparation du tampon de dilution et coloration des cellules : 58

II.5.1.2- Préparation de la solution de coloration : 59

II.5.1.3- Préparation des tampons phosphate à haute concentration en potassium pour le calibrage « *in vivo* » du pHi : 59

II.5.1.4- Préparation des ionophores pour le calibrage *in vivo* : 60

II.5.2- Le dispositif expérimental : 60

II.5.2.1- le microscope : 60

II.5.2.2- Système d'acquisition d'images : 61

II.5.2.2.a- La caméra : 61

II.5.2.2.b- Cartes d'acquisition des images : 61

II.5.3- Observations microscopiques et prises d'images : 62

II.5.4- Transfert des images. 62

II.5.5- Traitement d'images : 63

II.6- Déterminations des activités enzymatiques spécifiques : 64

II.6.1- Préparation de l'extrait brut pour les dosages enzymatiques: 64

II.6.2- Essais enzymatiques: 64

II.6.2.1- Dosage de l'α-cétoglutarate déshydrogénase et de la pyruvate déshydrogénase (Visser *et al.*, 1982) : 65
II.6.2.2- Dosage de l'isocitrate lyase (Dixon et Kornberg, 1959) : 66
II.6.2.3- Dosage de la PEP carboxylase : 66
II.6.2.4- Dosage de la PFK (Ling K.H. *et al.*, 1966) : 67
II.6.2.5- Dosage de l'isocitrate déshydrogénase (Hostalek *et al.*, 1969) : 68
II.6.2.6- Dosage de la G6PDH (Neuzil *et al.*, 1986) : 68
II.6.3- Dosage des protéines (Lowry *et al.*, 1951) : 69
II.6.3.1- Préparation des Solutions stocks: 69
II.6.3.2- Préparation extemporanée de la solution Cuivre-Soude (solution E): 69
II.6.3.3- Préparation du réactif colorant (solution F): 69
II.6.3.4- Réaction: 69

II.7- Autres techniques analytiques : 70
II.7.1- Extraction et dosage des pristinamycines (Thibaut *et al.*, 1995) : 70
II.7.1.1- Extraction : 70
II.7.1.2- Dosage par HPLC des pristinamycines : 70
II.7.2- Dosage du glucose et des acides organiques : 70
II.7.2.1- Préparation des échantillons : 70
II.7.2.1- Dosage par HPLC du glucose et des acides organiques (Rondags *et al.*, 1998) : 71
II.7.3- Dosage du pyruvate par méthode enzymatique : 71

II.8- Méthodes de calculs et d'exploitation des résultats : 72
II.8.1- Calcul des activités spécifiques enzymatiques : 72
II.8.2- Méthode de calculs des paramètre cinétiques microbiens : 72
II.8.2.1- En fermenteur discontinu : 72
II.8.2.2- En fermenteur continu : 73

II.1- Liste du matériel :

- Sonicateur : W225 R, Heat systems-Ultrasonics, Inc
- Micro-osmomètre : Roebling
- Table d'agitation orbitale : unimax 2010, Heidolph
- Balance de précision : M-220 D, Denver Instrument
- Balance de pesée : B 610 S, Sartorius
- Spectrophotomètre : DU 7500, Beckman
- Centrifugeuse : Avanti ™ 30, Beckman
- Micro-centrifugeuse : 112, Sigma
- Analyseur de gaz : Binos 100
- Refroidisseur de gaz : Gas cooler JC
- pH-mètre : PHM 210 Meterlab ™, Radiometer Analytical
- Congélateur à -80° C : VX 430, Jouan
- Analyseur de solutions et pH : P407, Consort

II.2- Composition et préparation des milieux de culture :

II.2.1- Milieu de sporulation et de dénombrement des spores de Streptomyces pristinaespiralis (Paquet, 1990) :

- Extrait de levures : 1 g/L
- Extrait de viande : 1 g/L
- Dextrines blanches : 10 g/L
- $CoCl_2.6\ H_2O$: 0,02 g/L
- Agar : 25 g/L
- pH ajusté à 7,2.
- Stérilisation de 20 min à 120 °C à l'autoclave.

II.2.2- Milieu de culture des spores de S. pristinaespiralis : milieu complexe insoluble ICS :

- Saccharose : 15 g/L

- Corn steep atomisé (Roquette) : 5 g/L
- $(NH_4)_2SO_4$: 10 g/L
- KH_2PO_4 : 1 g/L
- NaCl : 3 g/L
- $MgSO_4.7\ H_2O$: 0,2 g/L
- NaOH 30 % (M/V) pour ajuster le pH à 6,8
- $CaCO_3$: 1,25 g/L

Le corn steep est mis en solution dans 400 mL d'eau distillée. Cette solution est stérilisée à 120°C pendant 20 minutes (le corn steep s'est révélé être source de contamination de par la présence de micro-organismes sporulants). La solution est ensuite centrifugée 10 minutes à 10000 g, le surnageant est filtré sur filtres plissés et ajouté au reste des éléments.

Le milieu est divisé en parties aliquotes de 40 mL dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 mL chicanées puis stérilisé 20 minutes à 120 °C à l'autoclave.

II.2.3- Milieu de culture de S. pristinaespiralis (milieu synthétique MPS 2) :

- Glucose : 30 g/L
- Acide malonique : 7,5 g/L
- L-Arginine : 3 g/L
- L-Glutamate : 1,5 g/L
- $MgSO_4.7\ H_2O$: 0,3 g/L
- $FeSO_4.7\ H_2O$: 15 mg/L
- $ZnSO_4.7\ H_2O$: 0,55 g/L
- Acide 3-morpholinopropanesulfonique (MOPS) : 20 g/L
- NaOH 30 % pour ajuster le pH à 6,8
- K_2HPO_4 : 0,75 g/L
- $CaCl_2.2\ H_2O$: 0,4 g/L

Le glucose et l'acide malonique sont d'abord dissous dans l'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,0 avec NaOH 30 %. Le milieu est ensuite préparé sans K_2HPO_4 et $CaCl_2$; le pH est alors ajusté à 6,8.

Le milieu est distribué en parties aliquotes de 30 mL dans des fioles d'Erlenmeyer de

300 mL puis stérilisé 20 minutes à 110°C à l'autoclave.

K_2HPO_4 est préparé en solution concentrée à 375 g/L et $CaCl_2$ à 200 g/L.

Ces solutions sont stérilisées sur filtre Millex® 0,22 µm (Millipore). A chaque fiole d'Erlenmeyer sont ajoutés stérilement 60 µL de chacune d'elles.

II.3- Conditions de culture :

II.3.1-Préparation du stock de spores de Streptomyces pristinaespiralis pr 11 :

Pour des raisons de forte instabilité génétique caractérisant le genre *Streptomyces*, le travail a été effectué avec un même stock de spores qui a été préparé comme suit.

A partir de tubes de spores de *Streptomyces pristinaespiralis* pr 11 fournis par la société Rhône–Poulenc–Rorer, une suspension de spores est réalisée dans de l'eau glycérolée à 20 % (V/V) stérile. Puis 100 µL de cette suspension de spores sont étalés sur des boîtes de Pétri dans lesquelles a été réparti du milieu de sporulation et de dénombrement de spores. Les boîtes sont incubées une quinzaine de jours en chambre thermostatée à 28 °C, jusqu'à l'apparition de spores grisâtres matures.

2 mL d'eau glycérolée stérile sont ajoutés par boîte, les spores et le mycélium sont décrochés à l'aide d'un fil à boucle. La suspension est collectée puis filtrée sur coton cardé afin de ne garder que les spores. La suspension de spores est divisée en partie aliquotes de 0,5 mL dans des microtubes qui sont conservés à -80 °C.

Le dénombrement est effectué par étalement de dilutions successives au $1/10^{ème}$ en cascade de la suspension finale sur le même milieu gélosé. Le titre du stock de spores obtenu est de 3.10^8 UFC/mL.

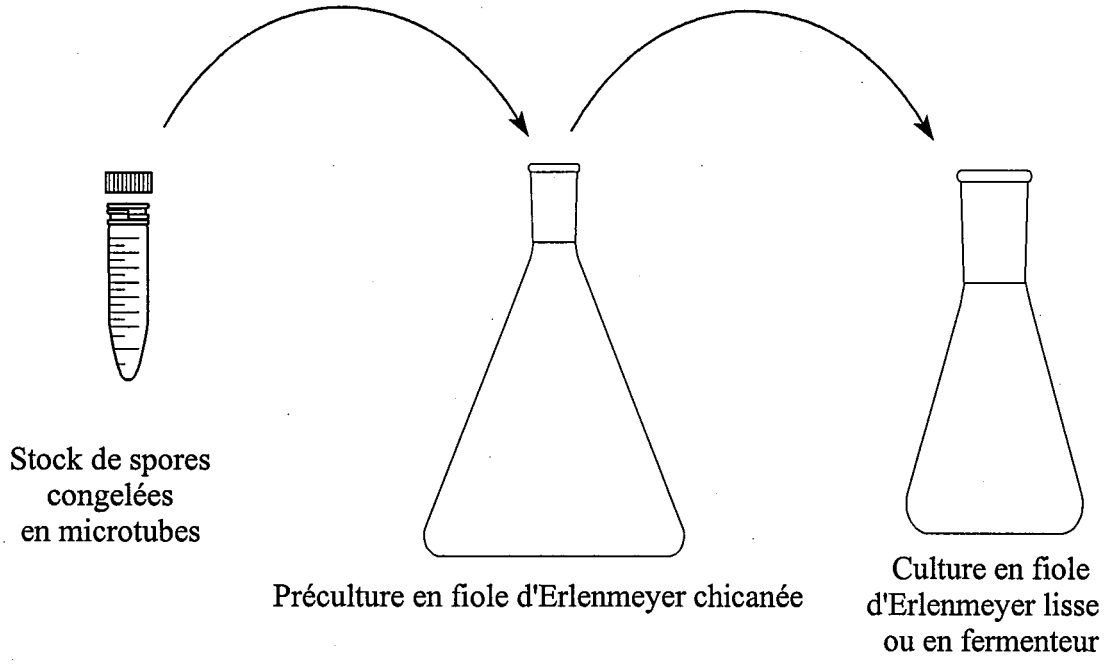
II.3.2- Préculture de S. pristinaespiralis sur milieu complexe :

La préparation des *inocula* est effectuée en fioles d'Erlenmeyer chicanées de 250 mL contenant 40 mL de milieu ICS qui sont ensemencées avec 0,5 mL du stock de spores congelées de *S. pristinaespiralis* pr 11.

La culture est incubée à 28°C sur table d'agitation à 250 tr/min durant 44 h.

II.3.3- Culture de S. pristinaespiralis en fiole d'Erlenmeyer :

La culture de *S. pristinaespiralis* en fioles d'Erlenmeyer est conduite dans des fioles de 300 mL non chicanées, contenant 30 mL de milieu MPS2.
Le milieu est ensemencé avec 2 mL de préculture puis placé sur table d'agitation à 250 tr/min et 28 °C durant le temps de culture désiré.



II.3.4- Culture de S. pristinaespiralis en fermenteur discontinu :

Fermenteur CHEMAP (CMF 100) :

- contrôle numérique CBC 5
- cuve de 2,5 L à double enveloppe
- sonde pH à gel DPAS Mettler Toledo
- sonde à oxygène : Ingold

Paramètres de fermentation :

- température régulée à 28 °C (circulation d'eau chauffée par un bain-marie circulant dans la double enveloppe)
- aération 2 VVM d'air sous une pression de 1 bar.
- consigne de teneur en O_2 dissous : 30 % de la saturation en air
- régulation de la consigne O_2 : vitesse d'agitation de 300 à 1500 tr/min

Le fermenteur contenant 2 L de milieu MPS2 est ensemencé après complémentation minérale (K_2HPO_4 et $CaCl_2$) avec 80 mL de préculture. Le niveau de mousse dans la cuve est régulé manuellement par apport de polypropylène glycol 2000 à 10 %.

II.3.5- Culture de S. pristinaespiralis en fermenteur continu :

Fermenteur Applicon :

- cuve 7 L Applicon
- module de contrôle : Bio controller ADI 1030 Applicon
- agitation : Stirrer controller P310 ADI 1032 Applicon
- chauffage : type enveloppe chauffante
- circuit de refroidissement commandé par électrovanne
- sonde pH à gel DPAS Mettler Toledo
- sonde de mesure du potentiel rédox : Mettler Toledo
- sonde à O_2 Applicon
- logiciel d'exploitation BioXpert
- pompes Masterflex console drive (Cole Parmer)
- débitmètre massique : Bronkhorst Hi-Tech
- PC Pentium II 300 MHz (PC caractère)

Paramètres de fermentation :

- température régulée à 28 °C
- aération 3,3 VVM
- agitation fixée à 1260 tr/min

Le fermenteur contenant 3 L de milieu MPS2 est ensemencé après complémentation minérale avec 100 mL de préculture. La culture discontinue est maintenue pendant 8 h puis la culture continue est démarrée par déclenchement des pompes d'alimentation et de soutirage réglées aux débits souhaités. Dans le cadre de ces cultures, la sonde de mesure du potentiel rédox a été utile pour estimer la période où les différents états pseudo stabilisés des cultures ont été atteints après les 5 temps de passage conventionnels, puisque dans le cas des D de 0,02 et 0,04 h^{-1} la teneur en O_2 ne pouvait être mesurée en fin de fermentation. Les bonbonnes

d'alimentation (Nalgène) contiennent 15 L de milieu MPS2 stérilisé 45 min. à 110 °C et sont complémentées en phosphate et calcium après stérilisation.

Le niveau de mousse dans la cuve est régulé manuellement par apport de polypropylène glycol 2000 à 10 %.

II.4- Estimation de la biomasse :

II.4.1- Méthode spectrophotométrique (d'après Lubbe et al., 1985) :

La concentration cellulaire est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm. Eu égard à la tendance des *Streptomyces* à former des pelotes, il est nécessaire de traiter préalablement les échantillons en vue d'une estimation plus précise et reproductible.

Ainsi, les prélèvements sont dilués de façon à mesurer une DO inférieure à 1. A 1 mL de dilution sont ajoutés 1 mL de HCl 2,5 N et 8 mL d'eau distillée. Les amas de cellules sont ensuite désagrégés par traitement aux ultrasons à une puissance de 60 W pendant 40 s. La mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 660 nm par comparaison avec un blanc contenant 1 mL de milieu, 1 mL d'HCl 2,5 N et 8 mL d'eau.

II.4.2- Méthode gravimétrique :

Pour quantifier la biomasse et établir une relation poids sec–DO $_{660\ nm}$ (*Cf.* annexe 2), la matière sèche est déterminée à partir d'échantillons de culture de volume déterminé. Ces derniers sont filtrés sur membranes de 0,45 µm en acétate de cellulose (Sartorius) préalablement séchées durant une nuit à l'étuve à 100 °C et tarées. Après rinçage des cellules avec une solution de NaCl à 0,85 %, les membranes sont séchées pendant 12 h à 100 °C à l'étuve puis placées dans un dessiccateur avant d'être pesées.

II.5-Mesure du pH intracellulaire :

II.5.1- Préparation des solutions :

II.5.1.1- Préparation du tampon de dilution et coloration des cellules :

Pour les incubations en présence du fluorochrome, les suspensions cellulaires sont

diluées dans le tampon phosphate PBS (phosphate buffer saline) suivant :

- KCl : 0,2 g/L
- KH_2PO_4 : 0,2 g/L
- NaCl : 8 g/L
- $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$: 2,16 g/L
- NaOH 30 % pour ajuster le pH à 7,4
- Xylose pour ajuster l'osmolalité du tampon

L'osmolalité du tampon est mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre (Roebling). La quantité de xylose nécessaire à fixer l'osmolalité à celle régnant dans le milieu à ce stade de développement de la culture est ajoutée (*Cf.* annexe 3).

II.5.1.2- Préparation de la solution de coloration :

Le 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(et 6)-carboxyfluorescéine, acétoxyméthylester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Oregon USA) est conditionné sous forme de poudre. La solution stock à 1 mM est effectuée dans du DMSO puis est divisée en parties aliquotes de 10 µL dans des microtubes (Eppendorf) qui sont stockés à -20 °C.

II.5.1.3- Préparation des tampons phosphate à haute concentration en potassium pour le calibrage « in vivo » du pH_i :

<u>Solution A :</u>

KH_2PO_4 : 18,37 g/L

NaCl : 1,17 g/L

<u>Solution B :</u>

K_2HPO_4 : 19,16 g/L

NaCl : 1,17 g/L

Les tampons de pH désiré sont confectionnés en mélangeant la solution A avec la solution B, en commençant par le tampon de pH le plus élevé, puis en continuant de façon décroissante (de 8,5 vers 6,0). L'osmolalité est alors mesurée pour chaque tampon et elle est ajustée à celle régnant dans le milieu de fermentation au moment du prélèvement en ajoutant du xylose.

II.5.1.4- Préparation des ionophores pour le calibrage in vivo :

La nigéricine (Sigma) est diluée à une concentration de 10 mM dans de l'éthanol absolu puis est répartie dans des microtubes conservés à -20 °C.

La valinomycine (Sigma) est diluée à une concentration de 1 mM dans du DMSO puis est répartie dans des microtubes conservés à -20 °C.

II.5.2- Le dispositif expérimental :

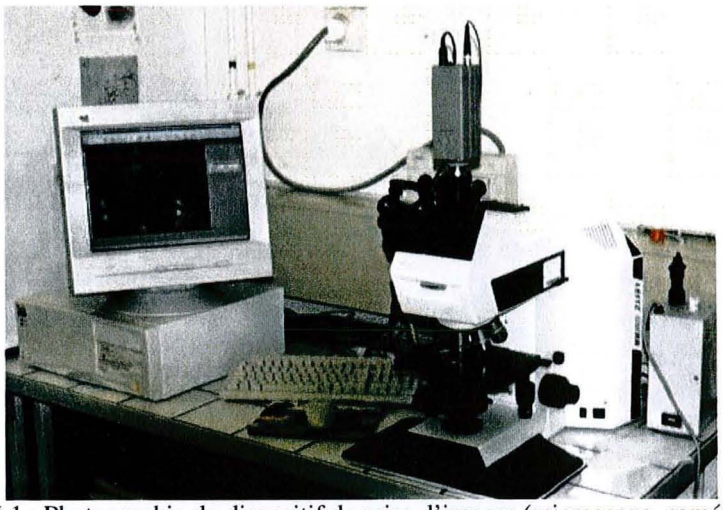


Figure II.1 : Photographie du dispositif de prise d'images (microscope, caméra et PC)

II.5.2.1- le microscope :

Le microscope Leitz DMR B (Wetzlar, Allemagne) est équipé pour observations à fond clair, en contraste de phase et en épifluorescence, comme suit :

- lampe halogène 12 V 100 W pour la microscopie à fond clair.
- brûleur à vapeur de mercure HBO 50 W pour les observations en épifluorescence.
- objectifs pour fond clair et épifluorescence
- objectif PL FLUOTAR X 10 ouverture numérique 0,30
- objectif PL FLUOTAR X 40 ouverture numérique 0,70
- objectif PL FLUOTAR X 100 à immersion ouverture numérique 1,30

Pour les observations en épifluorescence, le microscope est équipé d'un barillet rotatif servant de support pour les blocs de filtres. Le microscope est en outre équipé de deux blocs de filtres utilisés pour l'excitation et l'émission en fluorescence.

II.5.2.2- Système d'acquisition d'images :

II.5.2.2.a- La caméra :

La caméra COHU 4910 (Cohu, San Diego USA) monochrome équipée d'un capteur CCD à 256 niveaux de gris est fixée sur le microscope afin d'effectuer l'acquisition en temps réel des images. La technique d'imagerie appliquée se base sur la valeur des niveaux de gris des pixels (0=noir, 255=blanc) de l'objet (pelotes de mycelium) sur l'image qui sont directement corrélés à l'intensité de fluorescence, et ne nécessite donc pas de caméra couleur. Le temps d'exposition de cette caméra peut être contrôlé par ordinateur et permet le cas échéant de capturer des intensités de fluorescence relativement faibles.

II.5.2.2.b- Cartes d'acquisition des images :

Dans un premier temps, une carte Cyclope 2.1 (Digital Vidéo, Toulouse France) a été utilisée pour la numérisation des images.

- Numérisation en 256 niveaux de gris avec une résolution de 512 X 512 pixels carrés.
- Contrôle du temps d'obturation de la caméra Cohu.
- Installée sur un PC Compaq 386 SX 16 Mhz équipé de 24 MO de mémoire vive. Celui-ci permet le contrôle de la carte *via* un programme développé en langage C. La visualisation des images se fait sur un moniteur spécial (Mitsubishi).

Les images .tiff sont sauvegardées sur disque dur puis transférées vers les stations de calcul *via* une carte réseau Appletalk Phonenet (Faralon).

Un deuxième système d'acquisition a été utilisé suite à une défaillance technique du premier. La nouvelle carte est une Secad Vision IPCI qui numérise les images en 768 X 576 pixels carrés et 235 niveaux de gris et permet également de piloter le temps d'exposition de la caméra Cohu.

Cette carte est installée sur un micro-ordinateur équipé d'un processeur Intel Céléron 366 Mhz, 96 MO de mémoire vive, disque dur de 10,2 GO IBM pour un stockage important d'images.

L'écran de 17 pouces (Viewsonic) permet le contrôle de la machine et la visualisation en temps réel des images. L'acquisition des images se fait par l'intermédiaire du logiciel Perfect Images de Clara Vision fonctionnant sous environnement Windows NT4 Workstation.

L'ordinateur est connecté sur réseau Ethernet qui permet le transfert des images vers les stations de calcul beaucoup plus rapidement que par le réseau Appletalk.

II.5.3- Observations microscopiques et prises d'images :

A partir de cellules traitées au BCECF-AM suivant le protocole de coloration mis au point dans le chapitre IV, il est procédé de la manière suivante :

- Etalement avec délicatesse de 20 µL de préparation au fil à boucle sur lame de verre préalablement dégraissée
- Première mise au point grossière sur les pelotes en champ clair
- Coupure du faisceau
- Basculement du bloc L (émission 527 nm)
- Ouverture du faisceau excitateur
- Focalisation fine et enregistrement de la première image
- Coupure immédiate du faisceau
- Basculement du bloc K (émission 600 nm)
- Ouverture du faisceau excitateur
- Enregistrement de la deuxième image
- Coupure du faisceau
- Déplacement sur la lame
- Deuxième couple d'image
- *Etc.*

II.5.4- Transfert des images.

Les images obtenues par le protocole décrit précédemment doivent être analysées par traitement informatique. Le traitement des images a été effectué au laboratoire LSGC par une équipe localisée à l'ENSIC (INPL). La taille (0,26 puis 0,44 MO) relativement importante des fichiers image et leur nombre rendent impératif le transfert de celles-ci *via* le réseau informatique développé entre les différentes écoles de l'INPL.

L'ancien système fonctionnait sous protocole Appletalk. Les images au format TIFF étaient transférées du PC d'acquisition équipé d'une carte réseau Phonenet (Faralon) sur un

Macintosh du laboratoire LSGC à L'ENSIC. Elles étaient ensuite renvoyées *via* le réseau interne sur l'une des stations de calcul.

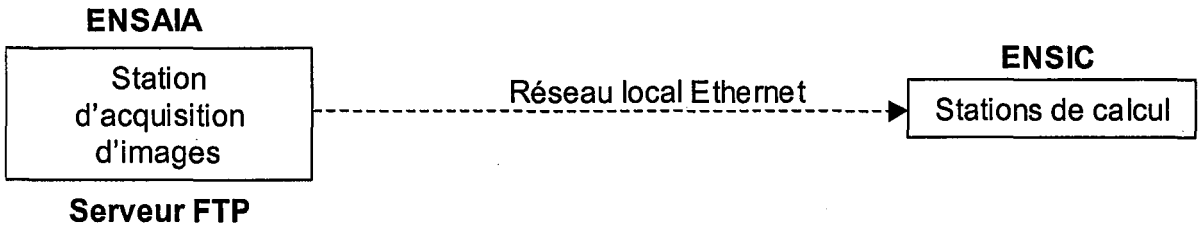


Figure II.3 : Transfert des images (nouvelle procédure).

La nouvelle configuration utilise le réseau local Ethernet (Fig. II.3). Le PC d'acquisition est configuré de manière à être un serveur FTP. Des ordinateurs distants peuvent aller chercher sur son disque dur les fichiers désirés. Les images sont donc téléchargées directement d'une des stations de calcul de l'ENSIC.

II.5.5- Traitement d'images :

Un fois transférées sur la station de calcul, les images sont analysées grâce à un programme dont l'algorithme simplifié est présenté dans le chapitre IV.

La station de calcul des images est un PC équipé d'un processeur Intel Pentium II 400 MHz, d'un disque dur important et d'un graveur de CD (Hewlett Packard) utilisé pour la sauvegarde des fichiers images.

Le programme d'analyse utilise le logiciel Visilog 5.1 (Noesis, Velizy, France). Il regroupe toutes les instructions nécessaires à l'analyse des images. Une suite d'instructions a été programmée en langage C et est interprétée par Visilog (voir Annexe 1).

Le programme génère de nouvelles images au format .IM5 spécifique au logiciel Visilog, appelées « images pH ». Ces images ainsi que celles obtenues lors des expériences sont ensuite archivées sur disque CD-R.

Chaque image IM5 donne une valeur qui est la moyenne du ratio pixel image verte / pixel image rouge correspondant. Ce ratio moyen reflète le pH moyen des objets présents sur l'image.

Ces valeurs sont stockées dans un fichier qui peut ensuite être traité par un tableur (Excel).

II.6- Déterminations des activités enzymatiques spécifiques :

Dans le but de procéder à des dosages différés des fermentations pour les activités enzymatiques, l'évolution de ces dernières a été suivie au cours du temps de stockage. Ceci a été effectué sur des extraits préparés dans du tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,4 glycérolé à 20 % (V/V) et conservés à 4 et -20 °C. Les temps de demi-vie (durée requise pour obtenir une activité résiduelle de 50 %) de l'IL (0,5 jour), de la PFK (1,5 jours) et de la PDH (1,5 jours) ont démontré l'impossibilité d'un tel protocole d'expérimentation.

La mise au point des dosages au niveau des volumes des prises d'essais a été réalisée de telle sorte que les essais se fassent dans des conditions de vitesses enzymatiques initiales.

II.6.1- Préparation de l'extrait brut pour les dosages enzymatiques:

Un volume de cellules en rapport à la quantité de biomasse (75 à 200 mL) est prélevé en temps voulu puis centrifugé à 22500 g pendant 10 min.

Pour l'étape de lavage, le culot bactérien est repris avec une solution de NaCl à 0,85 % à environ 5 % (V/V). Après obtention d'une solution homogène, celle-ci est centrifugée de nouveau à 22500 g pendant 10 min.

Les bactéries sont suspendues dans 12 mL de tampon Tris-HCl 40 mM à pH 7,4, puis brisées aux ultrasons : 100 W et 50 % de pulse à 4 °C. L'opération est effectuée en 4 fois 75 s avec un arrêt de 15 s entre chaque cycle.

Ensuite le lysat est centrifugé à 57000 g pendant 20 min à 4 °C et le surnageant est conservé dans de la glace pour les essais enzymatiques immédiats.

II.6.2- Essais enzymatiques:

Tous les dosages ont été effectués avec un spectrophotomètre UV-Visible Beckman DU 7500 en conditions tempérées à 30 °C, sous agitation, dans des cuvettes en quartz de marque Hellmä de trajet optique 1 cm et de volume 1 mL contenant un petit barreau magnétique.

Excepté le cas de l'isocitrate lyase, le principe de ces dosages repose sur la mesure d'une augmentation ou diminution de l'absorbance à 340 nm caractéristique de la forme réduite des cofacteurs (NADH, NADPH), et à 366 nm pour le dérivé acétylé du NADH.

II.6.2.1- Dosage de l'α-cétoglutarate déshydrogénase et de la pyruvate déshydrogénase (Visser et al., 1982) :

Réactions:

α-cétoglutarate + NAD^+ + coenzyme A => succinyl-coenzyme A + CO_2 + NADH

pyruvate + NAD^+ + coenzyme A => acétyl-coenzyme A + CO_2 + NADH

Solution stock:

- dithiothréitol : 16 mg
- coenzyme A : 4 mg
- 3-acétylpyridine adénine dinucléotide oxydé (APAD) : 20 mg
- thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) : 7,4 mg
- $MgCl_2$ 1M : 80 µl
- tampon phosphate 1 M pH 7,0 : 2,4 mL
- eau distillée : 7,6 mL

La solution, divisée en parties aliquotes de 300 µL, est stockée à - 20 °C pour être utilisée dans les 2 semaines.

Dosage:

- 250 µL de solution stock.
- 250 µL d'α-céto-glutarate de sodium ou de pyruvate de sodium à 20 mM.
- incubation 5 min à 30 °C sous agitation
- 500 µL d'extrait acellulaire et de tampon d'extraction (la réaction est déclenchée par apport de l'extrait acellulaire)
- suivi de la variation de DO à 366 nm à 30 °C

rmq: étant donné une relativement forte activité NADH oxydase l'$APAD^+$ a été préféré au NAD^+ car sa forme réduite n'est pas utilisée comme substrat par les NADH oxydases. ε pour les calculs a été considéré comme identique à celui de NADH (Visser *et al.*, 1982).

II.6.2.2- Dosage de l'isocitrate lyase (Dixon et Kornberg, 1959) :

Réaction:

isocitrate => succinate + glyoxylate

L'augmentation de DO à 324 nm résulte de la formation d'une phénylhydrazone d'acide glyoxylique.

Dosage:

- 100 µL de tampon phosphate 667 mM pH 6,85
- 100 µL de $MgCl_2$ 50 mM
- 100 µL de phénylhydrazine 333 mM
- 100 µL de cystéine 20 mM
- 500 µL d'extrait enzymatique et de tampon d'extraction
- lecture du blanc à 324 nm et déclenchement de la lecture de variation de DO
- 100 µL d'isocitrate 16,7 mM après environ 9 min lorsque la variation de DO est stable

$\varepsilon_{\text{phénylhydrazone d'acide glyoxylique}}$ à 324 nm $=1{,}7.10^{4}$ $L.mol^{-1}$.

II.6.2.3- Dosage de la PEP carboxylase :

Réactions :

PEP + CO_2 => OA

OA + NADH => malate

Dosage :

- 250 µL de tampon Tris-HCl 400mM pH 7,8
- 100 µL de $MnSO_4$ 50 mM
- 100 µL de K_2CO_3 100 mM
- 50 µL de MDH 1U/µl
- 50 µL d'acétyl-coenzyme 2 mM
- 300 µL d'extrait enzymatique et de tampon d'extraction
- lecture du blanc à 340 nm
- 50 µL de NADH 3 mM

- déclenchement de la cinétique
- 50 µL de PEP 20 mM lorsque la pente de variation de DO est stable

II.6.2.4- Dosage de la PFK (Ling K.H. et al., 1966) :

Réactions :

Fructose-6-Phosphate + ATP => Fructose-1,6-diphosphate + ADP

Fructose-1,6-diphosphate => DHAP + GA3P

GA3P => DHAP

2 DHAP+ 2 NADH => 2 acide L-α - glycérophosphorique + 2 NAD^+

Solution enzymatique auxiliaire :

- 10 mg de BSA
- 250 µL d'aldolase à 10 mg/mL
- 250 µL d'α-glycérophosphate déshydrogénase à 2 mg/mL
- 4,5 mL de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0

Dosage :

- 167 µL de tampon Tris-HCl 200 mM pH 8,0
- 100 µL d'ATP 20 mM
- 25 µL de $MgSO_4$ 200 mM
- 250 µL de KCl 200 mM
- 100 µL de DTT 100 mM
- 67 µL de solution enzymatique auxiliaire
- 225 µL d'extrait acellulaire et de tampon d'extraction
- lecture du blanc à 340 nm
- 67 µL de NADH 2,5 mM
- déclenchement de la lecture de variation de DO à 340 nm
- 67 µL de fructose-6-phosphate lorsque la pente de variation de DO est stable.
- V_f=1060 µL

II.6.2.5- Dosage de l'isocitrate déshydrogénase (Hostalek et al., 1969) :

Réaction :

isocitrate + $NADP^+$ => α-céto-glutarate + NADPH + CO_2

Dosage :

- 100 µL de $MgCl_2$ 30 mM
- 700 µL d'extrait enzymatique et de tampon d'extraction
- lecture du blanc à 340 nm
- 100 µL de $NADP^+$ 1.7 mM
- déclenchement de la lecture de variation de DO à 340 nm
- 100 µL d'isocitrate 50 mM lorsque la pente de variation de DO est stable

II.6.2.6- Dosage de la G6PDH (Neuzil et al., 1986) :

Réaction :

glucose-6-phosphate + $NADP^+$ => 6-phosphogluconate + NADPH

Dosage :

- 335 µL de tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,4
- 100 µL de $MgSO_4$ 100 mM
- 365 µL d'extrait enzymatique et de tampon d'extraction
- lecture du blanc à 340 nm
- 100 µL de $NADP^+$ 10 mM
- déclenchement de la lecture de DO à 340 nm
- 100 µL de glucose-6-phosphate 50 mM lorsque la pente de variation de DO est stable

Rmq : tous les produits sont dissous dans le tampon d'extraction.

II.6.3- Dosage des protéines (Lowry et al., 1951) :

II.6.3.1- Préparation des Solutions stocks:

A : $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ à 1 % (M/V)

B : tartrate de sodium potassium à 2 % (M/V)

C : NaOH 0,2 M

D : carbonate de sodium à 4 % (M/V)

Rmq : ces solutions sont stables à température ambiante.

II.6.3.2- Préparation extemporanée de la solution Cuivre-Soude (solution E):

- 49 mL de solution C
- 49 mL de solution D
- 1 mL de solution A
- 1 mL de solution B

II.6.3.3- Préparation du réactif colorant (solution F):

Ajouter 10 mL de réactif de Folin-Ciocalteau à 10 mL d'eau distillée.

II.6.3.4- Réaction:

- ajouter 2,5 mL du réactif E à 0,5 mL d'échantillon à doser contenant jusque 0,5 mg de protéines
- agiter et laisser réagir pendant 10 min
- ajouter 0,25 mL de réactif F
- agiter et laisser réagir pendant 30 min

La mesure de l'absorbance à 750 nm est effectuée contre un blanc contenant 0,5 mL du tampon de dilution de l'échantillon (Tris-HCl) qui sera traité comme ce dernier.

Parallèlement une gamme étalon à partir d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) sera préparée.

II.7- Autres techniques analytiques :

II.7.1- Extraction et dosage des pristinamycines (Thibaut et al., 1995) :

II.7.1.1- Extraction :

- 2 volumes de phase mobile : 34 % (V/V) acétonitrile et 66 % (V/V) tampon phosphate 0,1 M pH 2,9
- 1 volume de moût
- agitation pendant 20 min sur table à 250 tr/min
- centrifugation 10 min dans une microcentrifugeuse
- récupération du surnageant et filtration sur filtre Millex® 0,2 µm pour le dosage par HPLC

II.7.1.2- Dosage par HPLC des pristinamycines :

Chaîne HPLC SPECTRAPHYSICS :

- spectrophotomètre à ampoule de deutérium
- logiciel (PC) d'exploitation (SPECTRAPHYSICS)
- colonne 5C8 Nucléosil 4,6*150 mm (Interchim)

Conditions expérimentales :

- phase mobile utilisée pour l'extraction dégazée à l'hélium
- débit d'élution de 0,8 mL/min
- température ambiante
- injection de 20 µL
- détection à 206 nm

II.7.2- Dosage du glucose et des acides organiques :

II.7.2.1- Préparation des échantillons :

- décongélation des moûts
- centrifugation 10 min à la microcentrifugeuse

- filtration des surnageants avec des filtres Millex® 0,2 µm

II.7.2.1- Dosage par HPLC du glucose et des acides organiques (Rondags et al., 1998) :

Chaîne HPLC Waters :

- colonne polypore H (Brownlee Labs)
- spectrophotomètre UV lambda max 481 LC (Waters)
- réfractomètre différentiel 410 (Waters)

Conditions expérimentales :

- phase mobile : H_2SO_4 0,04 N.
- débit d'élution de 0,9 mL/min.
- température de la colonne 65°C.
- injection de 20 µL.
- détection à 210 nm pour les acides organiques.
- détection au réfractomètre pour le glucose.

Des solutions standard pour les acides organiques et le glucose dosés sont préparées extemporanément.

II.7.3- Dosage du pyruvate par méthode enzymatique :

- 500 µL de Tris 40 mM pH 7,5
- 25 à 300 µL d'échantillon préparé comme au paragraphe II.7.2.1
- H_2O qsp 930 µL
- lecture du blanc à 340 nm.
- 50 µL de NADH 2,5 mM.
- déclenchement de la lecture à 340 nm
- 20 µL de lactate déshydrogénase (Roche) pour obtenir une activité finale de 5 ue
- mesure de la différence d'absorbance à 340nm

Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle avec une solution de pyruvate (Sigma).

II.8- Méthodes de calculs et exploitation des résultats :

II.8.1- Calcul des activités spécifiques enzymatiques :

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques sachant que l'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme catalysant la formation d'une micromole de produit par minute et par mg de protéine pour des conditions de température données.
L'activité spécifique est donnée par la formule suivante :

$$AS = \frac{\left(\frac{\Delta DO}{\varepsilon * l} * Vc * 10^6\right)}{Ve * Cp}$$

où :

- ΔDO est la vitesse d'augmentation ou de diminution de l'absorbance à longueur d'onde déterminée en unité de densité optique par minute.
- l est la longueur du trajet optique (généralement 1 cm).
- ε est le coefficient d'extinction molaire donné en cm^2/mole si l est différent de 1 cm sinon l est inclus dans ε et le tout est exprimé en L/mole.
- Vc est le volume réactionnel dans la cuve
- Ve est le volume de prise d'essai de l'extrait enzymatique
- Cp est la teneur protéique de l'échantillon.
- 10^6 est le facteur de conversion en µmole.

II.8.2- Méthode de calculs des paramètre cinétiques microbiens :

II.8.2.1- En fermenteur discontinu :

Les courbes des résultats expérimentaux sont dans un premier temps lissées au moyen de fonctions d'ajustements du logiciel de graphes Kaleida Graph 3.09 par :

- Lissage
- Interpolation
- Mode polynomial
- Puissance
- Pondération

Une série de temps avec des incréments inférieurs aux intervalles de temps de prélèvements expérimentaux est générée dans un premier temps.

Les données calculées par lissages sont affectées aux temps de la série créée.

Ces données sont dérivées par rapport au temps afin d'obtenir les vitesses volumiques instantanées.

Puis elles sont divisées par la biomasse calculée pour ce même temps.

Ainsi seront calculés μ (taux de croissance), les vitesses de productions et de consommations spécifiques regroupées sous le terme plus général de quotients métaboliques.

II.8.2.2- En fermenteur continu :

<u>En phase de stabilisation :</u>

- Taux de croissance (μ) :

$$\mu = D + \frac{dX}{dt} * \frac{1}{X}$$

Où X est la concentration de biomasse présente dans le réacteur

- Vitesse de production spécifique de métabolites (q_p) :

$$q_p = D\frac{[P]}{X} + \frac{d[P]}{dt} * \frac{1}{X}$$

Où :

D est le taux de dilution en L/h

P est la concentration du métabolite considéré en g ou mg/L

X est la biomasse en g/L

- Vitesse spécifique de consommation de glucose (q_{glc}) :

$$q_p = D\frac{[Glc]_s - [Glc]_0}{X} + \frac{d[Glc]_s}{dt} * \frac{1}{X}$$

Où :

$[Glc]_s$ est la concentration de glucose en g/L dans le fermenteur et en sortie.

$[Glc]_0$ est la concentration de glucose en g/L initiale

X est la biomasse en g/L

A l'état stabilisé :

Pour les calculs de vitesses spécifiques en réacteur continu à l'état stationnaire, le taux de croissance spécifique est considéré comme constant et égal au taux de dilution D d'après le bilan sur la biomasse en mode continu. D est quant à lui égal au débit divisé par le volume utile.

Les concentrations en biomasse, substrat et produits sont considérées comme constantes par définition en continu lorsque l'état stationnaire est atteint, les quotients métaboliques du glucose ($q_{glucose}$) et de production de métabolites (q_p) sont obtenus d'après les relations suivantes :

$$q_{glucose} = \frac{Q(S_a - S)}{V.X}$$

$$q_{produit} = \frac{Q.[P]}{V.X}$$

où :

- Q est le débit en $L.h^{-1}$
- V est le volume utile en L
- S_a est la concentration de glucose en g/L dans le milieu d'alimentation
- S est la concentration en glucose en g/L en sortie et à l'intérieur du fermenteur
- P est la concentration en produit en g/L en sortie et à l'intérieur du fermenteur
- X est représente la biomasse en g/L

Enfin, les rendements de biomasse par rapport au glucose consommé sont obtenus d'après la relation :

$$Y_{X/Glucose} = \frac{\mu}{q_{glucose}}$$

Chapitre 3
Résultats:
Dosages d'enzymes du métabolisme central en cultures discontinues

Dosages d'enzymes du métabolisme central en cultures discontinues :

III.1- Introduction : 76

III.2- Source d'erreurs et variabilité des résultats : 77

III.3- Croissance et production de pristinamycines : 78

III.4- Vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose : 80

III.5- Activités enzymatiques : 82

III.5.1- Ordres de grandeur des différentes activités enzymatiques : 82

III.5.2- Variations des activités enzymatiques : 83

III.5.3-Répartitions des activités enzymatiques : 86

III.5.3.1- Introduction : 86

III.5.3.2- Rapport PFK/G6PDH : 86

III.5.3.3- Rapport PEPc/PDH : 87

III.5.3.4- Rapport PDH/IDH : 88

III.5.3.5- Rapport des activités IDH/α-CGDH : 89

III.6- Conclusions : 89

III.1- Introduction :

Ainsi qu'exposé dans le chapitre "Revue bibliographique" le métabolisme du glucose (ou d'autres sources de carbone) est non seulement important pour la biosynthèse de métabolites primaires mais aussi indispensable à l'élaboration des précurseurs des pristinamycines et à leur condensation.

L'objectif de ce travail consiste en l'étude des variations d'activités spécifiques de certaines enzymes responsables du catabolisme du glucose en relation avec les phases de croissance et de production de pristinamycines au cours de cultures en bioréacteurs discontinus.

Le choix des activités enzymatiques dosées (Fig. III.1) s'est effectué selon des critères de limitation potentielle et de position au niveau des principales voies du métabolisme central.

- Ainsi la phospho-fructo kinase (PFK) a été dosée car déjà décrite, dans certains cas, comme clé pour le catabolisme se déroulant en aval de cette étape (Dekleva et Strohl, 1988 a).
- L'activité glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est intéressante à suivre car cette enzyme est la première de la voie des pentoses phosphate, sachant que cette voie de dégradation du glucose est le principal moyen de synthétiser le NADPH. Ce cofacteur est indispensable à la croissance mais aussi à la biosynthèse des pristinamycines.
- L'activité pyruvate déshydrogénase (PDH) a été étudiée car elle pourrait non seulement expliquer certaines pertes métaboliques lors d'excrétions massives de pyruvate rapportées chez certains *Streptomyces* (Dekleva et Strohl, 1987), et il s'agit également d'une des dernières enzymes des voies qui permettent l'alimentation du TCA. De plus, son niveau d'activité pourra être crucial pour la formation des P_{II}, l'acétate en étant le précurseur majoritaire.
- Parmi les voies anaplérotiques, la phospho-énol-pyruvate carboxylase (PEPc) a été caractérisée comme voie majoritaire chez différents *Streptomyces*, ce qui justifie son suivi.
- L'isocitrate déshydrogénase (IDH), enzyme du TCA, a été étudiée, car elle se situe à un carrefour métabolique avec l'isocitrate lyase (IL) qui est elle spécifique du shunt glyoxylique ; elle est également responsable de l'alimentation en précurseur du glutamate.
- Enfin l'α-CGDH a été dosée car cette enzyme est une des seules enzymes réellement spécifiques du cycle de Krebs avec la succinyl-CoA hydrolase. De plus, il semble que la

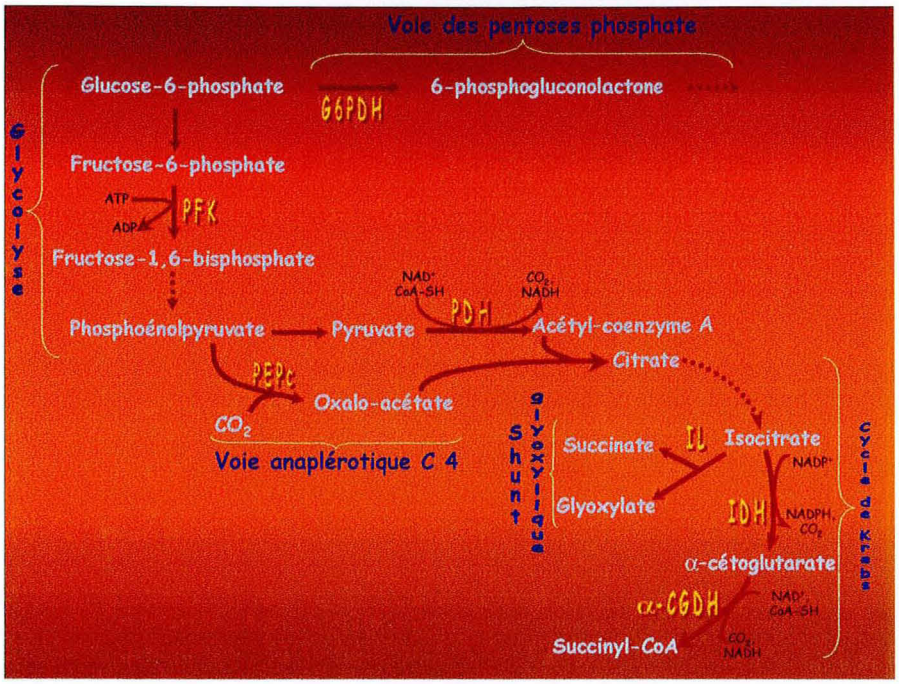


Figure III.1 : Schéma récapitulatif des différentes activités enzymatiques dosées.

Au cours d'études préliminaires les diverses activités enzymatiques se sont révélées présentes sur des extraits acellulaires préparés à partir de moûts âgés de 24 heures.

L'étude des activités enzymatiques a été conduite conjointement aux fermentations (*Cf.* Matériels et méthodes) puisque les activités enzymatiques étudiées étaient plus ou moins stables. Parallèlement à ces dosages enzymatiques, les concentrations de biomasse, glucose, pristinamycines, et oxygène dissous ainsi que le pH extracellulaire ont été mesurés.

III.2- Source d'erreurs et variabilité des résultats :

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus de 3 fermentations différentes (F1, F2 et F3).

Malgré des conditions de préculture standardisées, inoculées à partir d'un même stock calibré de spores, des différences de vitesses de croissance et de biomasse finale ont été constatées, avec une incertitude sur la biomasse que l'on peut estimer au minimum à plus ou moins 0,5 g/L étant donnée l'hétérogénéité des suspensions cellulaires.

Des variations aux niveaux des titres en pristinamycines et des moments d'excrétion de celles-ci ont été observées. L'incertitude sur le dosage des pristinamycines totales est d'environ 10% (écart type à la moyenne calculé pour n=5).

Il en est de même pour les activités enzymatiques d'une fermentation à l'autre. Dans ce cas les sources d'erreurs potentielles sont nombreuses:

Il en est de même pour les activités enzymatiques d'une fermentation à l'autre. Dans ce cas les sources d'erreurs potentielles sont nombreuses:

- variabilité de l'état physiologique de l'*inoculum* liée à la préparation de précultures à partir de spores et à la particularité de différenciation du genre *Streptomyces*.
- croissance évoluant différemment
- efficacité de sonication
- débit d'air fluctuant
- erreur sur le dosage des protéines pour l'expression en activités spécifiques
- appréciation des pentes de variations de DO au spectrophotomètre
- erreur sur les pesées des réactifs notamment pour les cofacteurs utilisés en quantités infimes
- dérive du spectrophotomètre

Les erreurs signifiées sur les graphes pour les différentes activités enzymatiques représentent l'étendue des valeurs mesurées, chaque point étant la moyenne de deux ou trois essais suivant les cas.

III.3- Croissance et production de pristinamycines :

Les concentrations de biomasses maximales obtenues sont de 8,5, 9,7 et 9,8 g/L pour F1, F2 et F3 respectivement. La culture discontinue F3 semble être un peu plus avancée que les deux autres dans la mesure où un début de chute de la biomasse a pu être mesuré. Ceci pourrait tenir au fait que l'état physiologique de la préculture était légèrement différent : les consommations d'O_2 et de glucose plus rapides dès le début de la culture F3 attestent d'un état physiologique différent (Fig. III.2).

Le glucose paraît peu assimilé en début de culture alors que la biomasse augmente, puis sa concentration diminue très rapidement parallèlement à l'excrétion des pristinamycines. Il est retrouvé en concentrations allant de 8 à 10 g/L au niveau des surnageants lorsque les biomasses maximales sont obtenues et n'est donc pas un élément limitant de la croissance.

La faible consommation spécifique de glucose en début de culture soulève la question de l'assimilation du squelette carboné des acides aminés.

Dès les premières heures suivant la mise en culture, la teneur en O_2 dissous baisse rapidement, témoignant d'un métabolisme actif qui s'installe et qui se traduit par l'augmentation de biomasse. A mesure que la production de biomasse se poursuit, le taux d'O_2 est maintenu à 30 % (point de consigne).

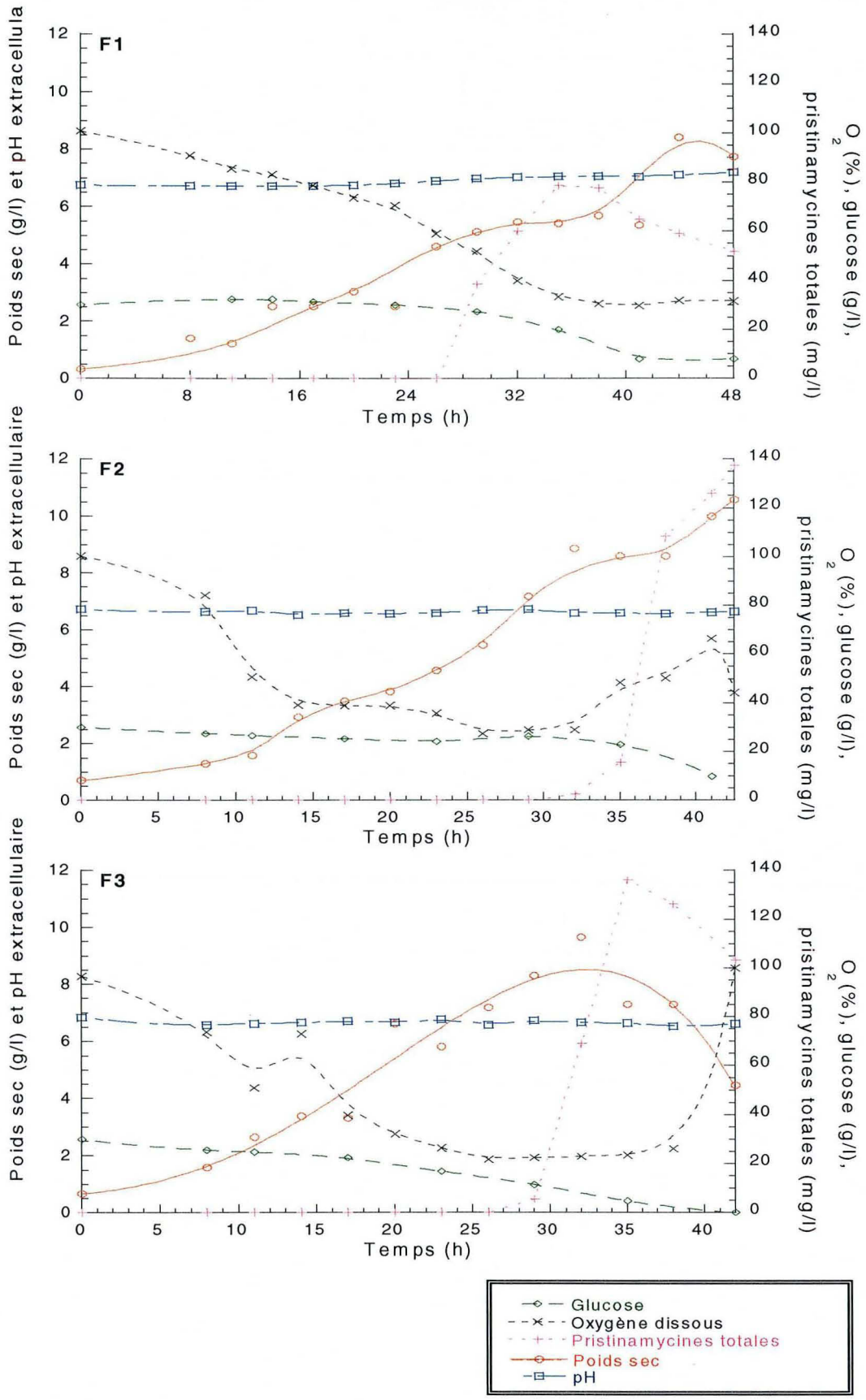


Figure III.2 : Evolutions des concentrations de biomasse, glucose, pristinamycines totales et oxygène dissous au cours du temps pour 3 cultures en fermenteurs discontinus sur milieu MPS2.

Contrairement à ce qui a pu être décrit par Paquet (1990), la remontée de la teneur en O_2 dissous en fin de culture n'est pas toujours associée à la production de pristinamycines.

Le pH du milieu évolue peu (demi unité pH) dans ce milieu fortement tamponné par le MOPS.

Le début d'excrétion des pristinamycines a eu lieu entre la 27 et la 34ème heure et les titres maximaux mesurés sont de 77, 135 et 137 mg/L pour F1, F2 et F3. Les proportions des P_{II}/P_I sont de l'ordre de 70-80 % et de 20-30 % et leur excrétion est simultanée. Il s'agit d'une phase très brève car les durées pour atteindre les maxima de concentration sont de l'ordre de 6 à 8 heures, puis dans les cas de F1 et F3 une diminution de la teneur en pristinamycines est constatée. Ces baisses constatées des titres sont à attribuer à une dégradation des pristinamycines (Cans, 1987).

III.4- Vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose :

La vitesse spécifique de croissance (μ), maximale en début de culture, est de l'ordre de 0,13 h^{-1}. Il ne s'agit en aucun cas de μ_{max} car μ n'a pu être calculé entre 0 et 10 heures en raison d'une erreur expérimentale sur la mesure de biomasse trop importante. Ce paramètre diminue avec l'état d'avancement de la culture et lorsque la synthèse de pristinamycine s'enclenche, il n'est plus que de l'ordre de 0,05-0,04 h^{-1}. Cependant, ont pu être observées certaines fluctuations liées aux erreurs de mesures sur la biomasse mais aussi certainement à des variations physiologiques (Fig. III.3).

Dans le cas de F1 et F2, les reprises de croissance après excrétion sont associées à la présence de glucose en concentrations de l'ordre de la dizaine de grammes par litre. Il semble que pour la culture F3, le glucose soit limitant. Une limitation en carbone ne peut être affirmée car l'apport d'α-CG provenant des acides aminés n'a pas été mesuré.

Dans le cas de F1, il semble que le glucose ne soit pas consommé en début de culture car la vitesse de consommation spécifique du glucose est nulle entre 10 et 12 h, cependant il n'y a pas de données entre 0 et 10 h de culture (Fig. III.3). Cet élément tend à montrer que le glucose n'est pas le seul élément carboné métabolisé en début de culture puisqu'il y a croissance. La vitesse spécifique de consommation du glucose est relativement grande (0,13-0,18 g/g/h) lorsque le taux de croissance est de l'ordre de 0,10 h^{-1} et diminue lorsque la croissance ralentit.

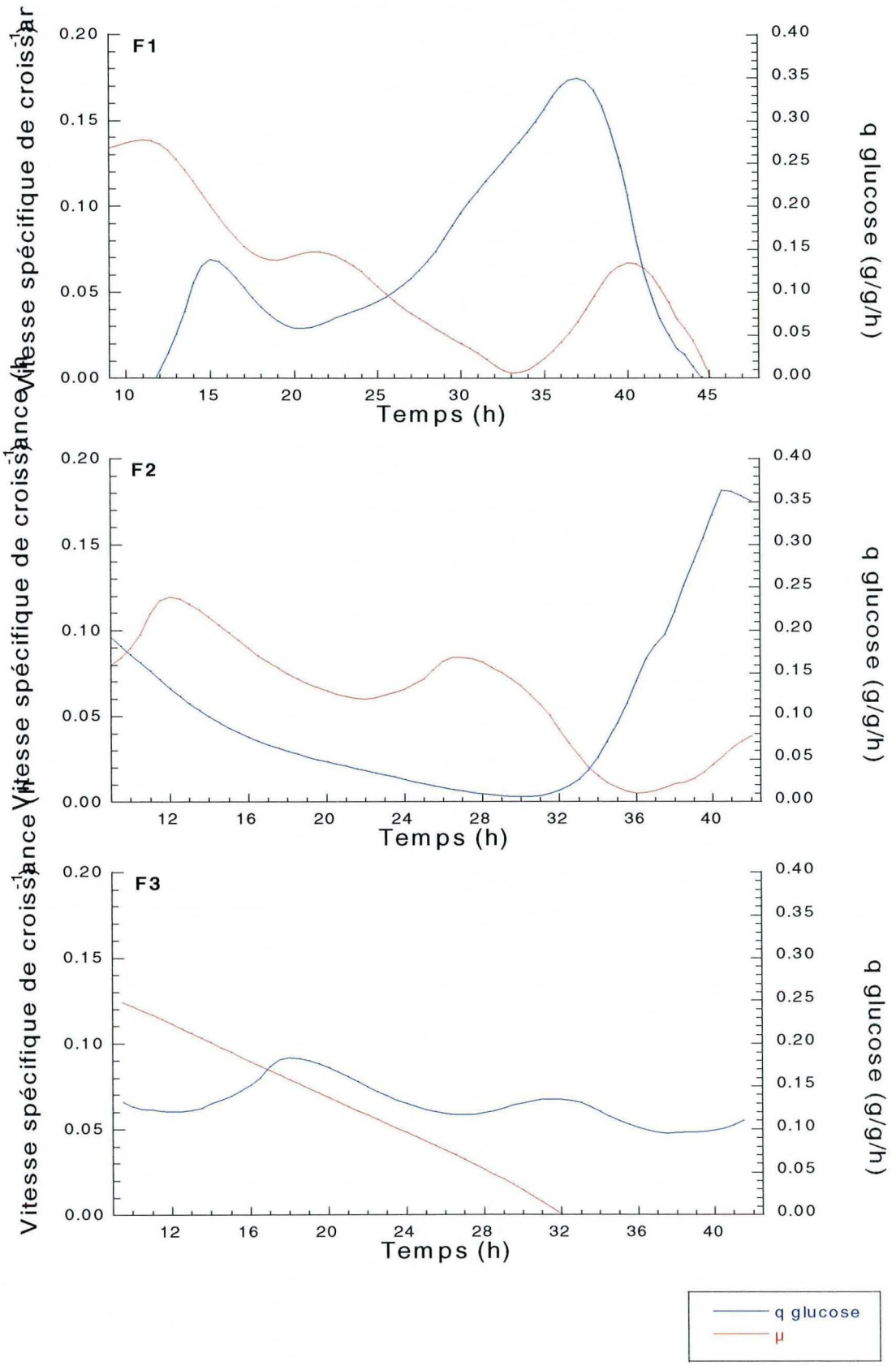


Figure III.3 : Evolutions des vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose au cours du temps pour 3 cultures en fermenteurs discontinus.

La vitesse spécifique de consommation atteint un minimum précédemment à l'excrétion des pristinamycines et croît en même temps qu'il y a production. Les maxima de concentrations de pristinamycines sont corrélés à ceux de la vitesse spécifique de consommation du glucose. Le cas de F3 est légèrement différent car la vitesse reste globalement élevée avec des variations moindres durant toute la fermentation. Ceci signifierait dans ce cas, que le déclenchement n'implique pas obligatoirement un arrêt transitoire du métabolisme du glucose. Il apparaît qu'environ 2/3 du glucose sont consommés lors de la phase de production. Ces résultats confirment l'importance de la consommation de glucose pour la biosynthèse des pristinamycines.

III.5- Activités enzymatiques :

III.5.1- Ordres de grandeur des différentes activités enzymatiques :

Les variations d'activités enzymatiques sont considérées par rapport à des paramètres tels que la croissance, les concentrations de glucose et le type de métabolisme, à savoir s'il y a où non à l'instant considéré, excrétion d'antibiotiques. Une discussion des résultats par rapport à la consommation en oxygène ne sera pas effectuée car beaucoup moins aisée du fait de l'imposition d'un point de consigne sur la valeur minimale et donc d'une régulation variable.

Il a été procédé à une évaluation des ordres de grandeurs des maxima et minima des différentes activités enzymatiques au cours d'une même fermentation et ce pour les différentes cultures (Tab. III.1). En dépit des diverses erreurs, les écarts entre les maxima et les minima sont significatifs quelles que soit les enzymes considérées.

Enzyme	Activité spécifique maximale (mUE)	Activité spécifique minimale (mUE)
IDH	198-405	56-109
PEPc	132-191	17-69
PFK	44-74	4-11
G6PDH	19-25	2-8
PDH	8-20	1-4
α-CGDH	2-9	0-1
IL	0-4	0-1

Tableau III.1 :Valeurs extrêmes des activités enzymatiques observées pour les 3 cultures.

III.5.2- Variations des activités enzymatiques :

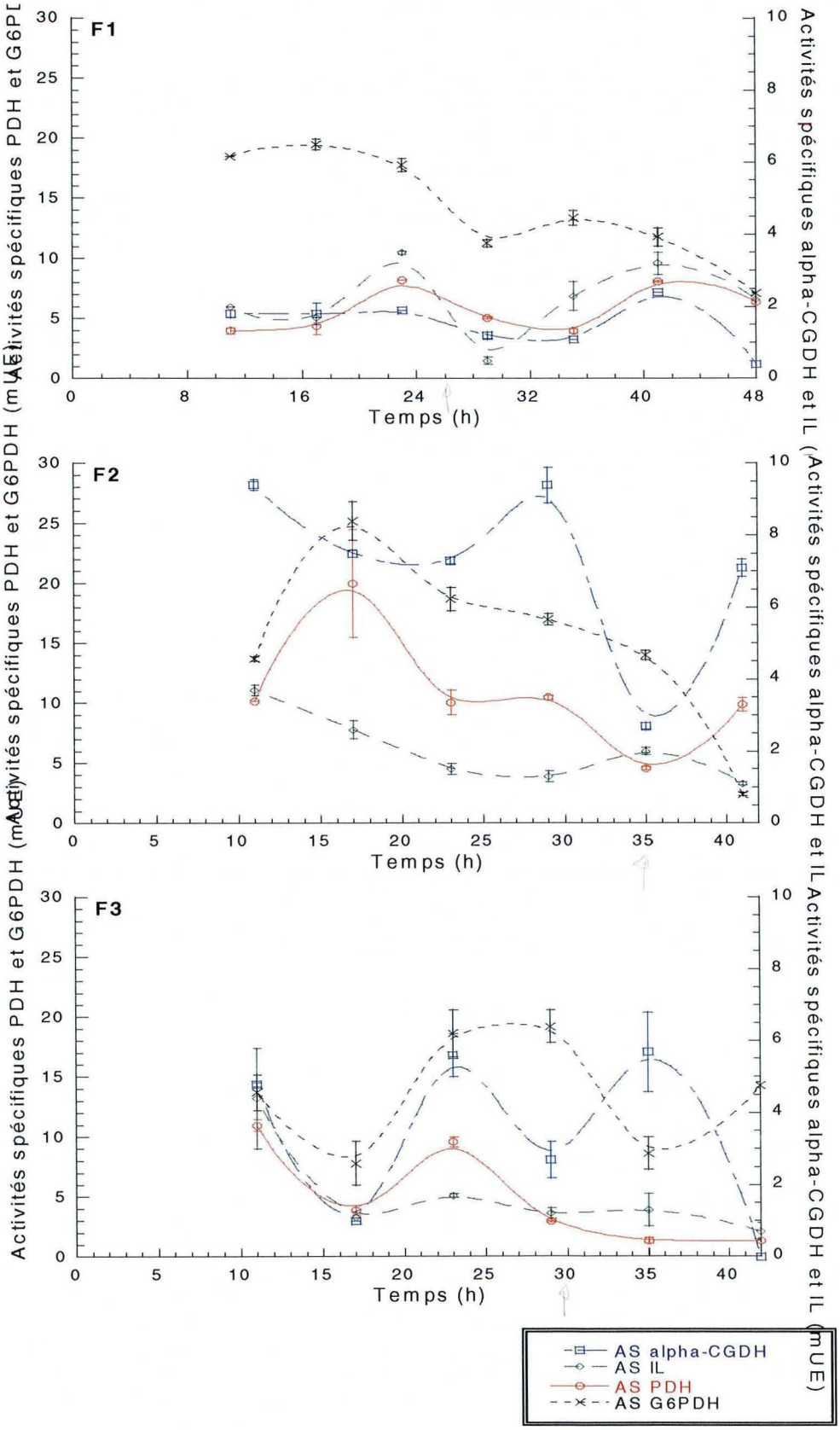


Figure III.4 : Activités spécifiques de : l'α-CGDH, l'IL, la PDH et la G6PDH en fonction du temps de culture en bioréacteurs discontinus.

G6PDH : Des taux de croissance élevés sont associés à une plus forte activité G6PDH (Fig. III.4). Lorsque μ diminue, précédemment à l'excrétion des pristinamycines, l'activité enzymatique baisse et atteint son minimum sur une période allant entre le début et la fin de l'excrétion de l'antibiotique suivant les fermentations. Une similitude, avec un léger décalage dans le temps, est observée entre les profils d'AS de la G6PDH et de la vitesse spécifique de consommation du glucose.

PFK : Le maximum d'activité PFK est observé en début de culture (Fig. III.5), alors que le taux de croissance est maximal pour F1 et F2. Dans le cas de F3, le maximum est observé après le point de chute corrélé à la vitesse spécifique de consommation du glucose maximale. Puis, la diminution d'activité est continue jusqu'à tendre vers un minimum d'activité en fin de culture. Les plus fortes AS PFK et G6PDH sont corrélées aux plus grandes consommations de glucose.

PEPc : La PEPc (Fig. III.5) suit les mêmes variations que l'IL dans la mesure où elle tend à diminuer après que le μ_{max} ait été observé. A l'instar de cette dernière, les minima sont observés en fin de culture et pas nécessairement au déclenchement de l'excrétion des pristinamycines.

PDH : La PDH suit le même type d'évolution que la G6PDH. Son activité est à l'identique corrélée aux μ, à la biosynthèse des pristinamycines et au quotient métabolique du glucose (Fig. III.4). Hormis le cas de F1 dans la zone de grand μ en début de culture, l'activité spécifique de la PDH est corrélée à ce paramètre de croissance de la même manière que la G6PDH. Dans le cas de F1, cette activité augmente lorsque le μ évolue vers de plus grandes valeurs (μ=0,1 h^{-1}) à 16 heures de culture.

IL : L'activité IL (Fig. III.4) est très faible. Toutefois, il semble que la tendance soit à la baisse continue de cette activité une fois que le μ « max »a été atteint (cas de F2 et F3).

IDH : Le maximum d'activité IDH (Fig III.5) est observé en début de culture pour F1 et F2 mais légèrement après (2-3 h) que μ_{max} ait été atteint. Puis, lorsque se déroule l'excrétion de l'antibiotique dans F1 et F2, l'activité IDH augmente. Enfin lorsque le titre maximal en pristinamycines est atteint, l'activité IDH chute à nouveau. Pour F3, l'activité est déjà maximale précédemment à l'excrétion des pristinamycines. Dans le cas de F3, la remontée de l'activité lors de l'excrétion n'est pas observée : il peut être supposé qu'à cet instant l'activité est suffisamment élevée pour permettre le déclenchement du métabolisme secondaire.

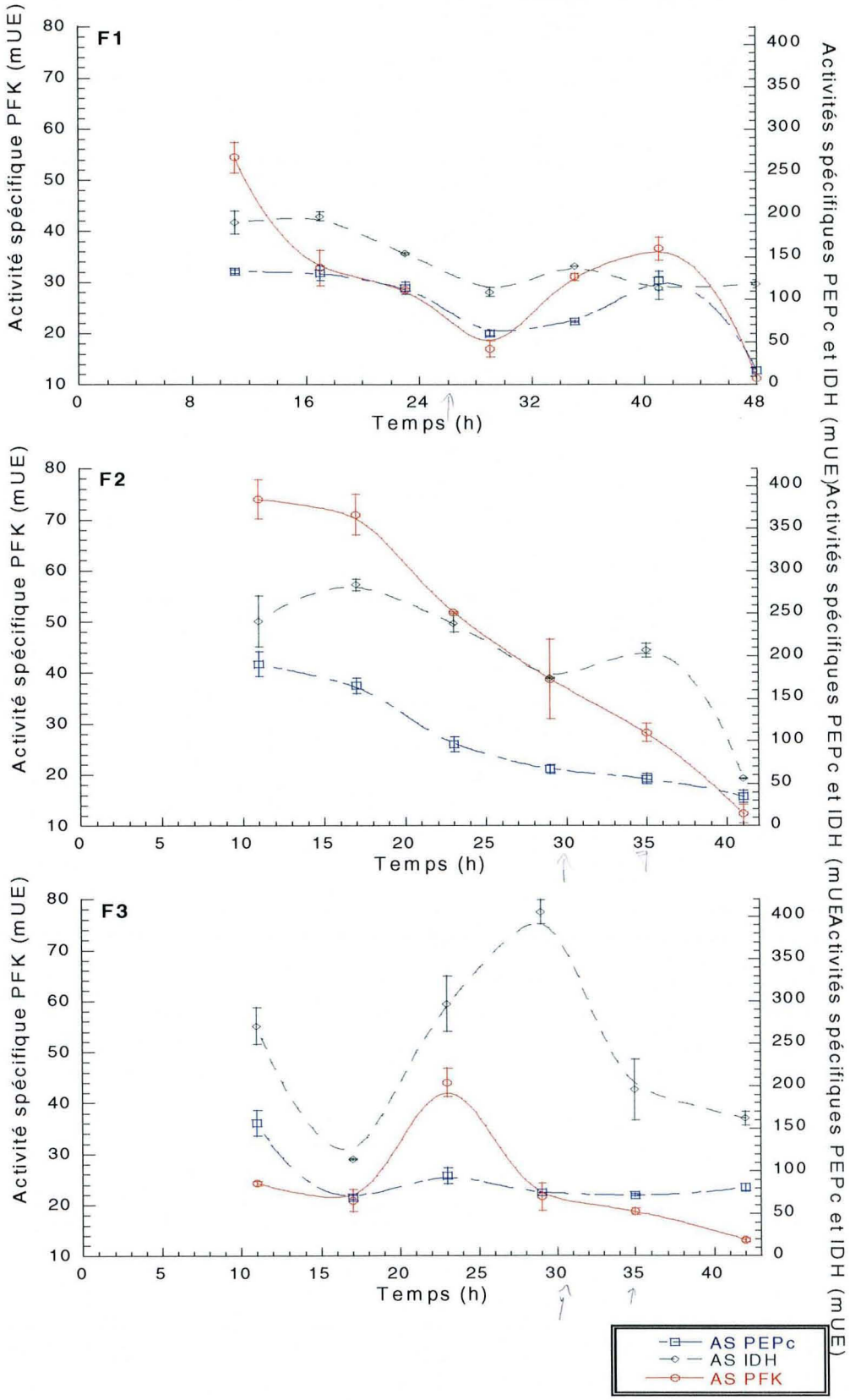


Figure III.5 : Activités spécifiques de : la PEPc, l'IDH et de la PFK en fonction du temps de culture en bioréacteurs discontinus

α-CGDH : La variation de l'activité α-CGDH est proche de celle de la PDH. Son activité est très forte en début de culture. S'il est considéré que les squelettes carbonés du glutamate et de l'arginine sont métabolisés, ceci devrait se faire au niveau de l'α-CG. Dans ce cas les fortes AS de l'α-CGDH en début de culture, alors que le glucose est peu consommé, peuvent s'expliquer par une bonne induction de la biosynthèse d'α-CGDH qui résulterait de l'assimilation des acides aminés. Par rapport à la production de pristinamycines, l'excrétion de ces dernières est aussi associée à un niveau minimal de l'activité α-CGDH.

III.5.3-Répartitions des activités enzymatiques :

III.5.3.1- Introduction :

Différents rapports d'activités enzymatiques ont été calculés à deux moments particuliers des cultures. Les données correspondant au moment appelé trophophase ont été déterminées lors du dernier prélèvement ne permettant pas encore de détecter la présence de pristinamycines. Les données caractérisant l'idiophase ont été collectées lors du premier prélèvement où il y a excrétion de pristinamycines.

L'objectif est de comparer les évolutions relatives de ces enzymes lorsque se produit le changement de métabolisme. L'intervalle de temps entre chaque prélèvement pour les dosages enzymatiques est de 6 h et celui pour le dosage des pristinamycines est de 3 h. Ceci signifie que pour la détermination de l'instant du déclenchement de l'excrétion l'incertitude est de 0 à 3 h. Ceci est propice à des erreurs d'appréciation sur le moment réel de déclenchement du métabolisme secondaire avec une information limitée pour ce qui est des activités enzymatiques dosées. De plus aucune activité enzymatique spécifique du métabolisme secondaire n'a été suivie.

Les erreurs commises sur les dosages enzymatiques peuvent se répercuter sur les valeurs des rapports calculés avec des amplitudes très variables suivant les niveaux respectifs de ces enzymes.

III.5.3.2- Rapport PFK/G6PDH :

Ce rapport est sensé rendre compte de l'évolution de la répartition des flux du glucose engagés vers la glycolyse et la PPP lors du glissement du métabolisme primaire au

métabolisme secondaire. Pour les interprétations, il est supposé que les flux carbonés sont corrélés aux activités enzymatiques spécifiques dosées *in vitro*.

Les rapports calculés pendant la trophophase vont de 1,7 à 2,8 et de 1,1 à 2,0 (Tab. III.2) lors de l'idiophase. Ceci indiquerait une évolution des flux relatifs glycolyse/PPP à l'avantage de la glycolyse lors de la trophophase.

L'examen de l'évolution des rapports d'activités spécifiques PFK/G6PDH révèle une diminution de ce *ratio* à mesure que la croissance ralentit et que commence le processus d'excrétion des pristinamycines. Lorsque se produit cette transition ces ratios atteignent alors des valeurs minimales (Tab. III.2). Ceci est la résultante d'une baisse d'activité de la PFK nettement plus marquée que celle de la G6PDH. La plus faible valeur de ce rapport lors de la trophophase pour F1 s'explique par une activité PFK d'un ordre de grandeur plus faible.

Eu égard à la grande nécessité en NADPH pour la biosynthèse des pristinamycines, la faible variation de l'activité G6PDH peut s'expliquer. Ceci témoignerait donc d'une réorientation relative des flux carbonés vers la voie des pentoses phosphate plutôt que vers la glycolyse.

Fermentation	Trophophase	Idiophase
F1	1,7	1,5
F2	2,8	2,0
F3	2,4	1,1

Tableau n°III.2 : Rapport PFK/G6PDH

III.5.3.3- Rapport PEPc/PDH :

Ce rapport peut rendre compte à la fois de variations concernant l'alimentation du cycle de Krebs dans sa globalité pour la décarboxylation oxydative du glucose, de la biosynthèse d'oxalo-acétate qui est un précurseur de la biosynthèse de certains acides aminés (aspartate, thréonine, *etc.*) et de la synthèse d'acétate pour la production de pristinamycines.

L'évolution relative de ces activités enzymatiques, excepté le cas de F1, est marquée par une diminution au cours du ralentissement de la phase de croissance faisant suite à une baisse importante et continue de la PEPc. Ceci pourrait traduire des besoins moindres en OA pour la biosynthèse d'autres composés.

Puis, lorsque débute l'excrétion des pristinamycines, le sens de variation de ce rapport s'inverse (Tab. III.3) pour les fermentations F2 et F3 car l'activité PDH atteint à ce moment

les minima observés. Les flux vers la synthèse de C4 augmentent par rapport au flux allant vers l'acétyl-CoA. Dans le cas de F1 ce phénomène n'est pas observé à ce moment précis, mais sur le prélèvement qui suit, car le minimum d'activité PDH est observé alors qu'il y a déjà eu excrétion de métabolites secondaires.

Les valeurs de ce rapport pourraient laisser envisager une synthèse d'acétyl-CoA plus importante en fin de trophophase, peu avant l'excrétion des pristinamycines.

Fermentation	Trophophase	Idiophase
1	13,9	11,8
2	6,4	12,1
3	9,9	24,9

Tableau III.3 :Rapport PEPc/PDH.

III.5.3.4- Rapport PDH/IDH :

L'intérêt du calcul de ce rapport est de déterminer si le changement de métabolisme peut se traduire par une limitation de l'entrée du flux carboné au niveau du cycle de Krebs pouvant mener à une accumulation d'acétate. Cependant, ceci n'est valable que si l'évolution de l'activité IDH est représentative de celles des premières enzymes du TCA.

Pour ce rapport des activités PDH/IDH, dans toutes les fermentations effectuées, il a pu être établi une diminution corrélée au début d'excrétion des pristinamycines (Tab. III.4). Dans ce cas, les chutes s'expliquent par des activités PDH qui baissent surtout lors de l'excrétion des pristinamycines alors que l'activité IDH diminue plus régulièrement. Ceci signifierait que si accumulation d'acétate il y a (pour la biosynthèse des pristinamycines), ceci ne sera rendu possible que par une limitation de l'entrée du carbone dans le TCA en amont de l'IDH.

Fermentation	Trophophase	Idiophase
1	0,053	0,047
2	0,070	0,042
3	0,032	0,007

Tableau n°III.4 : Rapport PDH/IDH.

III.5.3.5- Rapport des activités IDH/α-CGDH :

Le rapport des activités enzymatiques spécifiques IDH/α-CGDH tend à diminuer en fin de phase exponentielle de croissance (Tab. III.5). Puis il croît dès que se produit l'excrétion des pristinamycines, proportionnellement au titre maximal en antibiotique. Ceci semble refléter une diminution lente et précoce de l'AS de l'α-CGDH plus importante que celle de l'IDH en fin de phase de croissance. Puis lorsque l'activité α-CGDH commence à atteindre des valeurs minimales, l'activité IDH remonte, ceci ayant lieu à une vitesse plus rapide, la tendance de l'évolution du *ratio* est inversée. A l'échelle cellulaire, ce phénomène est susceptible de se matérialiser par une accumulation d'α-CG engendrée par une limitation imposée par l'α-CGDH au niveau du cycle de Krebs. Cette accumulation ne sera possible que si le flux de substrat alimentant l'IDH n'est pas limité en amont. Or la diminution constatée du rapport PDH/IDH lors de l'idiophase serait défavorable à une telle accumulation. Cependant l'éventualité d'un apport d'α-CG provenant des acides aminés doit être considérée bien qu'à ce moment de culture ces éléments soient certainement plus limitants que le glucose.

Fermentation	Trophophase	Idiophase
1	81	91
2	19	77
3	53	150

Tableau III.5 : Rapport des activités IDH/α-CGDH.

III.6- Conclusions :

Les résultats ont montré une grande consommation du glucose (2/3) lors de la phase de production de pristinamycines alors que pour la synthèse de biomasse, peu de glucose a été dégradé.

De cette étude, il ressort une diminution générale de toutes les activités enzymatiques lors du changement de phase.

Toute interprétation concernant les résultats obtenus au cours de ces fermentations ne peut se faire dans l'absolu. Les essais enzymatiques en conditions *in vitro* ne tiennent aucunement compte des conditions physiologiques intracellulaires que ce soit au niveau pH, environnement ionique, effecteurs allostériques ou non (inhibiteurs, activateurs),

concentration en substrats et en produits. Les évolutions relatives des AS ne fournissent que des indications sur les orientations des flux carbonés.

Cette étude rend compte des potentialités de *Streptomyces pristinaespiralis* à emprunter préférentiellement certaines voies, pour l'utilisation du glucose et probablement pour celle des acides aminés. Cette approche permet une évaluation de la concentration de chaque enzyme présente. Cette concentration est quant à elle la résultante de la vitesse de biosynthèse de l'enzyme et de sa vitesse de dégradation.

Afin d'avoir une vue générale du métabolisme central, il a été choisi de n'étudier qu'une ou deux enzymes pour chaque voie. Or au sein d'une chaîne de réactions, la vitesse globale de fonctionnement est assujettie à la vitesse de la réaction limitante.

Ainsi par exemple, il a été choisi d'étudier l'évolution de l'activité G6PDH pour la voie des pentoses phosphates alors que la 6PGDH a été rapportée comme étant l'enzyme limitante de cette voie chez *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 1988) et chez *S. C5* (Dekleva et Strohl, 1988 a).

Dans le cas du TCA, la citrate synthase a été déterminée comme limitante comparativement à la cis-aconitase et à l'isocitrate déshydrogénase chez *S. hygroscopicus* (Takebe *et al.*, 1991) et chez *S. aureofaciens* (Hostalek *et al.*, 1969).

L'activité PDH pourrait être limitante chez *S. pristinaespiralis* et elle est susceptible de conditionner le fonctionnement du cycle TCA puisqu'en amont du TCA et d'activité faible tout comme la citrate synthase chez *S. C5* (Dekleva et Strohl, 1988 a).

A propos des contributions relatives de la voie des pentoses phosphates et de la glycolyse il a été observé comme chez *S. coelicolor* A3 (2) (Obanye *et al.*, 1996) une réorientation des flux relatifs vers la PPP lors de l'idiophase, avec une participation de la glycolyse restant toujours majoritaire même au changement de phase. La différence avec cet organisme est due au fait que le rééquilibrage des flux ne semble pas dû à un pic d'activité de la G6PDH mais plutôt à son activité qui serait plus ou moins maintenue constante alors que la PFK enregistre une baisse d'activité.

Par ailleurs, il est probable que la suractivation de la PPP qui n'a pas lieu soit compensée par un niveau très fort de l'IDH qui pourrait subvenir aux besoins en NADPH.

Le rapport PEPc/PDH augmente en fin de phase de croissance au moment où s'enclenche l'excrétion de pristinamycines ce qui pourrait potentiellement conduire à une perte des acétyl-Co A produits pour la synthèse des P_{II}. De plus, l'évolution du *ratio* PDH/IDH vient étayer cette hypothèse puisqu'il diminue au moment du changement de phase. De ce fait, il peut être supposé une accumulation des acétyl-CoA dédiés à la

biosynthèse des P_{II} antécédente à la diminution générale des activités enzymatiques du métabolisme central.

D'après l'évolution du rapport des activités IDH/α-CGDH, il semble que soient réunies des conditions qui pourraient mener à une accumulation d'α-CG (en fin de fermentation) susceptible ou non d'activer les voies de production de glutamate *via* la GOGAT et ou la GDH. Cependant malgré les faibles activités IL, il ne peut être affirmé que tout le flux d'isocitrate est dirigé vers la production d'α-CG, d'autant plus que la PDH pourrait limiter le flux d'isocitrate et que l'AS α-CGDH pourrait être régulée par la concentration en acides aminés résiduels.

La production et l'excrétion d'α-céto-acides tels que le pyruvate et l'α-CG ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces de *Streptomyces* sur milieu glucosé. Chez *S. venezuelae* (Ahmed *et al.*, 1984), il a été établi, dans le cas de la souche hyperproductrice de chloramphénicol, que l'accumulation d'α-CG et de pyruvate étaient moindre de par des activités α-CGDH et PDH maintenues à un niveau *quasi* constant. Ces activités constitutives permettraient une réassimilation de ces acides organiques aboutissant à une concentration finale réduite. Il a même été démontré une suppression de la production de daunomycine (anthracycline) chez *S. peucetius* lorsque cette souche acidifiait le milieu glucosé par excrétion de pyruvate et d'α-CG, alors que sur maltose, dextrines et amidon, l'acidification n'avait pas lieu (Dekleva et Strohl, 1987).

Chez *S. lividans* TK24 il a été mis en évidence une forte dépendance de la production d'acides organiques par rapport à la source azotée. Dans le cas où la source aminée était fournie sous forme d'acide aminé (cas du glutamate) la production d'α-CG était accrue. Ceci résultait de l'entrée du squelette carboné au niveau du TCA (Madden *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré un phénomène de répression des activités citrate synthase, aconitase et IDH par l'α-CG et le glutamate chez *Bacillus subtilis* (Ohné, 1975).

Après considération du bilan global menant à la synthèse des pristinamycines, il est envisageable que ce fort afflux en α-CG soit dirigé vers les voies de l'anabolisme du glutamate afin de satisfaire à la très grande exigence en ce composé azoté.

Suite à ces résultats pourront être établis les deux modèles suivants :

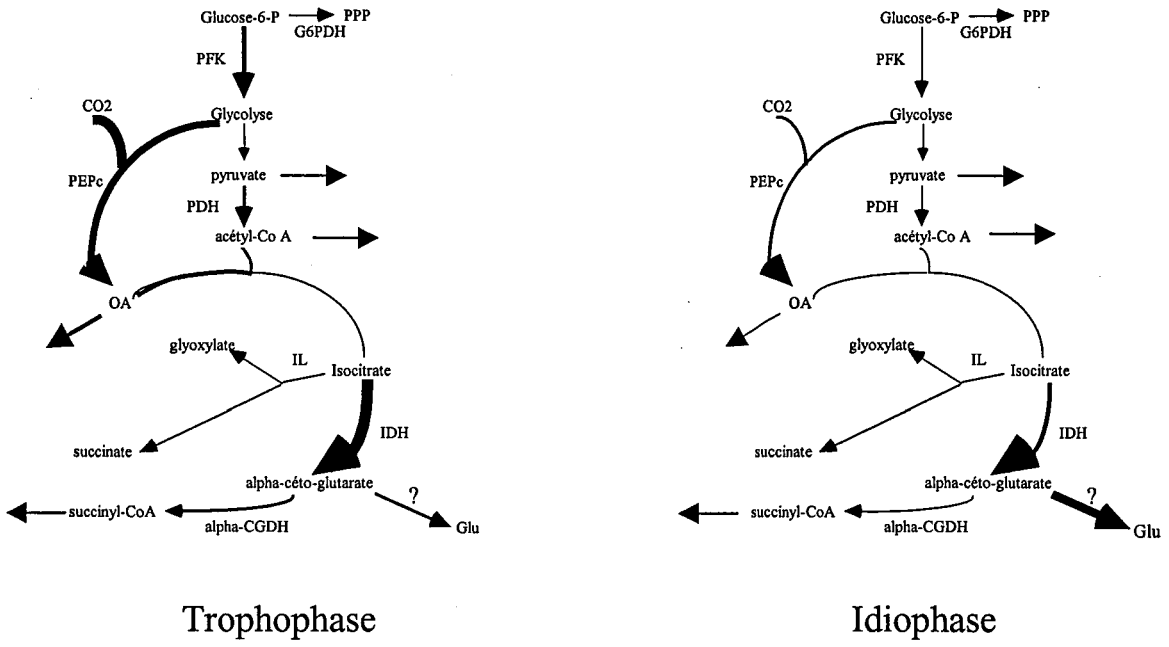


Figure III.6 : Schéma récapitulatif des niveaux des activités spécifiques des enzymes dosées entre la phase de croissance et la phase de production de pristinamycines.

rmq: l'épaisseur des flèches rend compte des niveaux d'activité des enzymes signalées.

Résumé :

L'amélioration de la production de métabolites d'intérêt industriel fait actuellement l'objet d'une stratégie rationnelle par génie métabolique. Ce domaine ne se restreint pas à quelques manipulations génomiques des cellules productrices. Il fait aussi appel à une approche de la physiologie des micro-organismes. Afin d'orienter les manipulations génétiques nécessaires à l'amélioration des performances des souches, il est nécessaire de connaître le métabolisme. Dans ce contexte, une partie du métabolisme de la source de carbone (glucose) par *Streptomyces pristinaespiralis* (bactérie filamenteuse) a été étudiée en relation avec la production de pristinamycines. Dans un premier temps, des activités enzymatiques du métabolisme central ont été mesurées *in vitro* au cours de cultures discontinues et ont montré une baisse générale du contenu enzymatique précédemment à l'excrétion de l'antibiotique. Un paramètre physiologique fondamental est le pH intracellulaire (pHi) qui est non seulement susceptible de conditionner les activités enzymatiques *in vivo*, mais rend compte également du métabolisme établi à l'intérieur des cellules. Une méthode originale de détermination du pHi par microscopie à épifluorescence et analyse d'image a été développée. Son application durant des cultures en bioréacteur discontinu a révélé d'importantes variations de ce paramètre, notamment en relation avec la production de pristinamycines et l'excrétion massive de succinate et de lactate. Enfin l'ensemble des paramètres a été mesuré pour différents taux de dilutions lors de cultures continues. Les résultats ont mis en évidence un phénomène de production cyclique de pristinamycines lié à la répression qu'elles exercent sur leur propre biosynthèse. Le mode continu a permis de quantifier les niveaux d'enzymes présents et les fluctuations du pHi pour différent taux de croissance de cellules non productrices d'antibiotiques.

Mots clés : *Streptomyces pristinaespiralis*, Pristinamycines, Activités Enzymatiques, Microscopie à Epifluorescence, Analyse d'Image, pH intracellulaire, Glucose, Acides Organiques.

Title :

Physiological study of *Streptomyces pristinaespiralis*, a pristinamycins producing strain : Central metabolism enzymes activities and intracellular pH measurements.

Summary :

In the last decade, a new rational strategy for fine optimization of industrial interest metabolites production has been achieved by means of metabolic engineering. This field does not only limits to ponctual genomic manipulations in the producing cells, but requires a deeper insight of their physiology. In this context, a part of carbohydrate (glucose) metabolism in the pristinamycins producing *Streptomyces pristinaespiralis* has been investigated during trophophase and idiophase. Specific activities for some enzymes belonging to the central metabolism were assayed during batch cultures and showed a general diminution before the antibiotic being excreted. Another basic physiological parameter is the intracellular pH (pHi), which not only affects enzymatic activities but also provides informations about intracellular metabolism. A novel method for its determination has been developped by means of epifluorescence microscopy combined to image analysis. pHi during batch fermentations undergone severe fluctuations correlated to pristinamycins production and to succinate and lactate excretions. Finally all parameters measurements were performed during different dilution rates chemostat. Cyclic productions of pristinamycins were observed due to the pristinamycins repression on their own synthesis. This study allowed quantification of enzymatic contents for different growth rates of non producing cells and revealed pHi changes of a lesser magnitude.

Keywords : *Streptomyces pristinaespiralis*, Pristinamycins, Enzymatic Activities, Epifluorescence Microscopy, Image Analysis, Intracellular pH, Glucose, Organic Acids.

Discipline : Biotechnologies et Industries alimentaires. Spécialisation en microbiologie industrielle.

Laboratoire des Bioprocédés Agroalimentaires (LABIAL), Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), 2 avenue de la Forêt de Haye 54505 Vandoeuvre lès Nancy Cedex.

Chapitre 4

Résultats :

Mise au point de la méthode de mesure du pH

Mise au point de la méthode de mesure du pHi :

IV.1- Introduction : 94

IV.2- Choix du fluorochrome : 94

IV.3- Choix des équipements pour les observations de fluorescence : 95

IV.4- Choix de la morphologie étudiée : 96

IV.5- Choix de l'objectif utilisé : 97

IV.6- Descriptif du traitement des images: 98

IV.6.1- Définition des termes utilisés : 98

IV.6.2- Principales étapes : 99

IV.7- Mise au point de la coloration des cellules : 100

IV.7.1- Concentration en BCECF-AM : 100

IV.7.2- Temps de traitement au BCECF-AM : 102

IV.7.3- Protocole de coloration : 103

IV.8- Calibrage du pH_i : 103

IV.8.1- Choix du mode de calibrage : 103

IV.8.2- Technique du calibrage *in vivo* : 104

IV.8.2.a- Ajout de nigéricine : 104

IV.8.2.b- Ajout de valinomycine : 106

IV.8.2.c- Temps d'incubation des ionophores : 107

IV.8.2.d- Séquence d'addition des ionophores : 108

IV.8.2.e- Protocole de calibrage : 109

IV.8.2.f- Gammes d'étalonnage : 109

IV.8.2.g- Gammes d'étalonnage en tampons isotoniques : 110

IV.8.2.h- Etalonnage des pH suivant le niveau de fluorescence à 600 nm : 111

IV.9- Vérifications de la méthode de mesure du pH_i : 114

IV.9.1- Estimation de l'influence du photoblanchiment sur le rapport des fluorescences : 115

IV.9.2- Estimation de l'influence de l'autofluorescence des cellules sur le rapport des fluorescences : 115

IV.9.3- Influence de l'état physiologique des cellules sur les mesures : 116

IV.9.3- Influence de la taille des pelotes sur le rapport des fluorescences : 117

IV.9.4- Influence de la profondeur de champ : 118

IV.10- Discussion sur la méthode : 119

IV.1- Introduction :

Le but premier de ce travail est la mise au point d'une méthode permettant d'approcher les valeurs de pH intracellulaire de *Streptomyces pristinaespiralis*.

La méthode retenue est celle utilisant une sonde fluorescente et la microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'image. Le choix a été effectué en procédant par élimination des autres possibilités bien souvent inadaptées à ce cas d'étude.

L'utilisation de micro-électrode qui est réservée aux cellules eucaryotes de grande taille n'a pas été considérée. La spectroscopie RMN du ^{31}P tout comme la méthode de distribution des bases et acides faibles présente l'inconvénient d'être longue et fastidieuse. Par ailleurs, elle n'est pas sans poser des problèmes de sécurité et de coût, et elle nécessite de travailler sur des suspensions cellulaires de fortes concentrations, susceptibles d'affecter les mesures effectuées. La cytométrie en flux dans le cas du genre *Streptomyces* n'a pu être envisagée de par des contraintes expérimentales liées aux capillaires qui restreignent l'emploi de cet outil à des cellules bien individualisées.

Certains choix préliminaires étant effectués (colorant, équipement optique, morphologie et grossissement), le travail consistera à mettre au point les conditions de coloration, de calibrage de la méthode, et à vérifier la validité de la technique développée.

Pour le travail de mise au point de la méthode, tous les essais pour un paramètre donné ont été réalisés sur des cellules provenant de la même préculture. Sauf indication contraire, les expériences ont été effectuées sur des cultures âgées de 24 h afin de s'affranchir d'éventuelles différences d'état physiologique.

IV.2- Choix du fluorochrome :

Parmi les fluorochromes usuellement employés pour des mesures de pH_i le **5 (et 6) carboxy SNARF 1 acétoxyméthyl ester, acétate** et le **BCECF-AM** ont été utilisés au cours d'essais préliminaires. Ils ont été testés sur leur capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes et à émettre de la fluorescence suite à des incubations de 20 min à 28 °C en présence de moût de culture pour une concentration finale de 10 µM. Les préparations traitées ont été observées au microscope à épifluorescence au moyen d'un bloc optique comportant un filtre d'excitation à 450-490 nm (domaine bleu du visible) et un filtre d'émission à 520 nm (vert).

Les intensités de fluorescence émise étant beaucoup plus faibles dans le cas du c-SNARF, le BCECF-AM a été choisi pour la suite des travaux. Par ailleurs, le BCECF-AM est intéressant car décrit comme non toxique pour la cellule bactérienne (Futsaether *et al.*, 1993).

IV.3- Choix des équipements pour les observations de fluorescence :

Le choix des blocs optiques de fluorescence a été conditionné par les propriétés spectrales de la molécule, tant pour les filtres d'émission que pour les filtres d'excitation.

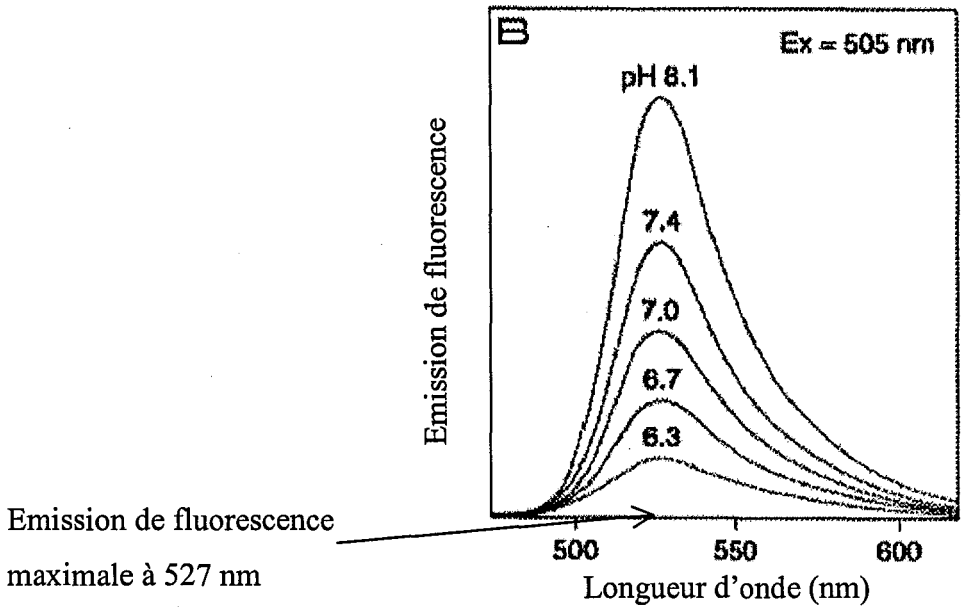


Figure IV.1 : Spectre d'émission du BCECF-AM à différents pH sous une excitation à 505 nm (document Molecular Probes).

La longueur d'onde de la lumière excitatrice doit se situer dans la bande spectrale de forte excitabilité du BCECF-AM afin de provoquer une émission de fluorescence suffisante. Le maximum d'excitabilité se trouvant être à 488 nm (source Molecular Probes), le filtre d'excitation retenu pour l'assemblage à façon des blocs de filtres possède les caractéristiques de transmission de la lumière suivantes : 480/40 nm (40 nm étant la largeur de bande à mi-hauteur du pic du spectre de transmission du filtre).

Le domaine de transmission du filtre d'émission qui permet de recueillir la fluorescence à une longueur d'onde où l'intensité de la lumière réémise est dépendante à la fois du pH et de la concentration de la sonde, est de 527/30 nm (Fig. IV.1). Pour ce domaine

de longueurs d'onde, l'intensité de fluorescence est très sensible aux variations de pH, ce qui offre de ce fait une résolution optimale.

Pour le deuxième filtre d'émission, le domaine spectral de transmission de la lumière de 600/40 nm a été choisi. A l'intérieur de ce domaine de longueur d'onde, l'intensité de fluorescence est relativement insensible aux fluctuations de pH.

En conséquence, deux blocs de filtres ont donc été réalisés sur demande par la société Leica (Tab. IV.1). La fluorescence de chaque objet sera enregistrée pour une longueur d'onde de 527 nm puis de 600 nm.

NOM DU BLOC	FILTRE D'EXCITATION	FILTRE D'EMISSION
K	480/40	600/40
L	480/40	527/30

Tableau IV.1 : Caractéristiques optiques des blocs filtres utilisés en épifluorescence.

IV.4- Choix de la morphologie étudiée :

Devant la diversité morphologique de *Streptomyces pristinaespiralis* (filaments, enchevêtrements de filaments et pelotes d'aspects divers) lors de cultures en milieu liquide et les contraintes liées au choix de l'objectif utilisé, l'option d'une étude portant sur un seul type morphologique a été retenue.

L'ajout de polymères anioniques comme le Junlon (polyacrylate) a été décrit comme promoteurs de répulsion de charges entre les différentes cellules par Hobbs *et al.* (1989) qui sont parvenus à obtenir une morphologie de type filamenteuse chez *Streptomyces coelicolor.* Dans l'optique d'une étude concernant uniquement les filaments mycéliens, des essais de cultures sur milieu MPS2 contenant des concentrations variables de différents polymères polyanioniques (Junlon pw 110 et sulfachitosane) ont été réalisés. A l'issue de ces tests, la proportion de filaments n'a pas été accrue. Une des causes de la non obtention de formes individualisées pourrait résider dans le fait que les cultures ont été réalisées en milieu synthétique. Les cultures de *Streptomyces* sur milieu synthétique favoriseraient la croissance à l'état de pelotes (Drouin, 1996). Or, dans cette étude sur le métabolisme de la source de carbone, des fermentations sur milieu complexe ne sont pas envisageables.

L'origine des filaments n'est pas toujours bien définie (Cox *et al.*,1998). Les cultures en bioréacteur de micro-organismes aérobies très exigeants en O_2 font intervenir de grandes

vitesses d'agitation afin de maintenir la teneur en O_2 dissous au delà d'une valeur critique. Dans le cas de cultures de *S. pristinaespiralis* cette vitesse d'agitation peut s'élever jusqu'à 1500 tr/min. A de telles vitesses, le fort cisaillement du milieu pourrait expliquer la présence d'une partie des filaments présents.

Un autre problème lié à une étude sur les filaments de *S. pristinaespiralis* est leur petite taille (largeur). Ceci peut poser problème au niveau de l'analyse d'image, notamment au niveau de l'étape de seuillage des images (délimitation des objets).

Le choix du type de morphologie s'est donc porté sur les pelotes mycéliennes de *S. pristinaespiralis*. Un des avantages non négligeable de ce choix est qu'il s'agit du type morphologique majoritaire au sein d'une culture immergée en milieu synthétique. Les pelotes sont par ailleurs présentes tout au long de la culture, bien que d'aspect variable. A ces conditions, la détermination du pH_i au niveau de cellules regroupées en pelotes, reflète une bonne estimation de l'état physiologique général de la culture. Un autre argument pouvant justifier un tel choix est qu'il a déjà pu être démontré l'existence d'une corrélation entre la production d'antibiotique et la morphologie en pelotes de certains *Streptomyces* (Thomas, 1992).

IV.5- Choix de l'objectif utilisé :

L'objectif permettant le travail au grossissement X 10 a été retenu car il permet l'enregistrement d'image contenant des objets conséquents (centaine(s) de µm), définis par un nombre de pixels suffisants pour subsister après des étapes de traitements en analyse d'image, tels que l'érosion.

Un autre avantage est qu'avec ce type de grossissement le faisceau excitateur est beaucoup moins focalisé et la puissance d'éclairage délivré par le brûleur à vapeur de mercure est répartie sur une plus grande surface (fluence). Il a pu être constaté à l'œil nu un déclin de fluorescence (photobleaching) très rapide lors d'observations avec les objectifs X 40 et X 100 biaisant la prise d'image dans la mesure où les intensités enregistrées sont inférieures à la réalité. Ce phénomène irréversible lié à la photosensibilité de la molécule est dû à une intensité lumineuse trop grande qui engendre toute une série de réactions photochimiques.

Dans le cas de colorations vitales, l'emploi d'agents atténuateurs du déclin de fluorescence tels que le ProLong® et le Slowfade® n'est pas envisageable, car réservé à une utilisation sur des préparations fixées. Aussi aurait-il été possible de contrevenir à ce

problème par l'emploi de filtres neutres intercalés entre la source lumineuse et la préparation. Les filtres neutres à disposition autorisent une transmission de 75 et 87,5 % de l'intensité lumineuse et permettent donc une excitation à une intensité réduite. Avec une telle intensité d'excitation, la fluorescence émise à 600 nm s'en trouve très fortement réduite et le signal capté par la caméra trop faible. Ceci nécessite des temps d'exposition beaucoup plus longs qui compliquent la prise d'image (mise au point fastidieuse) eu égard au nombre de couples d'images requis pour obtenir une bonne représentativité statistique. De plus, il a été rapporté que des temps d'exposition trop longs (supérieurs à 400 ms) pouvaient poser des problèmes de variabilité des signaux (Imai et Ohno, 1995).

En conséquence les images de pelotes ont été réalisées au grossissement 10 avec un temps d'exposition de 25 ms.

IV.6- Descriptif du traitement des images:

(*Cf.* programme détaillé en annexe)

IV.6.1- Définition des termes utilisés :

Seuillage : Transformation qui ne retient que les pixels dont la valeur est comprise dans un certain domaine de niveau de gris. Ces pixels se voient affecter la valeur 1 tandis que les autres la valeur 0.

Intersection : Elle définit l'ensemble des points qui sont communs à deux images.

Images binarisées : Images dont les pixels possèdent deux valeurs possibles 1 ou 0.

Masque : Il est obtenu lors d'une opération ponctuelle entre une image en niveaux de gris et une image binarisée ; le résultat est une image en niveaux de gris. Dans une telle image, seuls les pixels appartenant à l'objet sont visibles en niveaux de gris tandis que les pixels du reste de l'image se voient affecter la valeur 0 (noir).

Erosion : Au cours de cette opération les pixels des objets de taille inférieure à l'élément structurant (pelote ici) sont éliminés.

Reconstruction : Le principe est de reconstruire une image binaire à partir de marqueurs de l'objet initial, et de ne retenir que les objets ainsi repérés. Le résultat est la récupération de la forme exacte des objets originaux.

IV.6.2- Principales étapes :

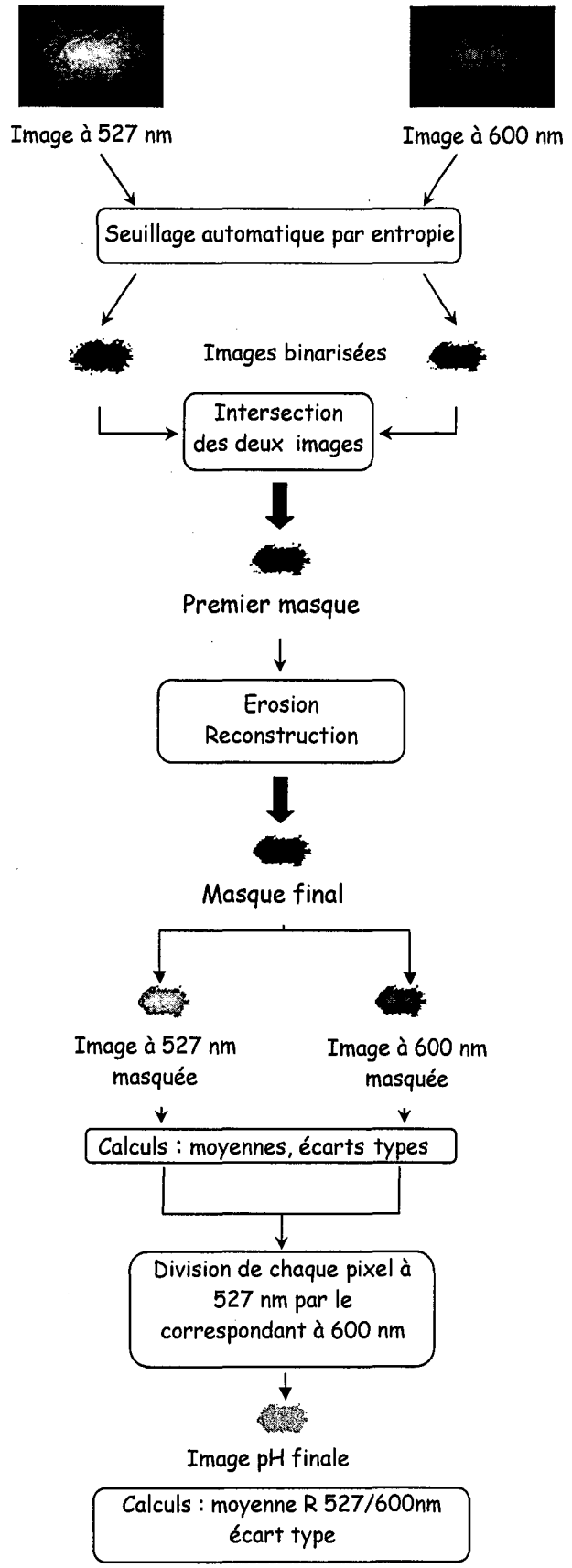


Figure IV.2 : Schéma simplifié du traitement d'image

Les couples d'images réalisés pour chaque pelote ont été analysés suivant un programme conçu en langage C par H. Vivier du groupe TASC du LSGC à l'ENSIC.

Ce programme est prévu pour être exécuté sous le logiciel d'analyse d'image Visilog 5.0 (Noesis). Il consiste tout d'abord, en l'ouverture des fichiers des images prises à 527 et 600 nm pour un même objet (Fig. IV.2).

L'étape suivante est le seuillage automatique des images par entropie, le but de cette opération est de déterminer une valeur limite de niveau de gris de pixels pour chaque image. Les pixels ayant un niveau de gris supérieur à cette valeur seront considérés comme appartenant à l'objet (pelote). De ce traitement il résulte l'obtention d'images binaires qui sont codées sur deux niveaux : 1 pour les pixels appartenant à l'objet et 0 pour ceux définissant le fond de l'image.

Lors de l'opération suivante, les deux images sont superposées et les pixels communs aux deux images binaires (intersection) constituent le premier masque.

L'image obtenue subit des traitements d'érosion et reconstruction afin d'obtenir une nouvelle image appelée masque final. Sur le masque final les petits objets n'appartenant pas à la pelote ont été éliminés.

Ce masque final est appliqué sur les images initiales à 600 et 527 nm et permet d'obtenir les images masquées où seuls sont représentés les pixels communs au masque final et aux images initiales. Dans les zones obtenues pour chaque superposition, sont calculés les moyennes de niveaux de gris ainsi que les écarts types à ces moyennes. Ainsi sont déterminées une moyenne de fluorescence verte et une moyenne de fluorescence rouge pour les images masquées

L'étape finale est la création de "l'image pH", obtenue par la division de la valeur de niveau de gris de chaque pixel de l'image à 527 nm masquée par celle du pixel correspondant de l'image à 600 nm masquée. Sur cette image pH sont calculés la moyenne des rapports mesurés et l'écart type à cette moyenne.

IV.7- Mise au point de la coloration des cellules :

IV.7.1- Concentration en BCECF-AM :

La concentration idéale en BCECF-AM pour traiter les échantillons de fermentation a été déterminée selon trois critères.

- Le but de ces manipulations était d'obtenir un marquage permettant la récupération d'images avec des niveaux de gris de pixels aux valeurs bien différenciées de celles du bruit de fond et bien distribuées (distribution gaussienne).
- Les cellules ayant subit un même traitement doivent présenter une émission de fluorescence bien homogène au sein de l'échantillon.
- Les valeurs doivent être suffisamment reproductibles.

Pour déterminer la valeur de ce paramètre, des échantillons de cellules ont été prélevés au bout de 24 H de mise en culture. Après dilutions dans du PBS de sorte que la DO_{660} soit de 1, les cellules ont été incubées en présence de différentes concentrations de BCECF-AM allant de 2,5 à 50 µM (Fig. IV.3).

Les concentrations inférieures à 20 µM n'ont pas été retenues car, bien que présentant une bonne homogénéité de marquage, les signaux enregistrés à 600 nm pour de telles concentrations sont trop faibles. Ceci pose des problèmes de délimitation des pelotes qui peuvent être éliminées par les étapes de seuillage et d'érosion du traitement des images.

Bien que les pH n'aient pas encore été calibrés à ce niveau et que le pH_i ne soit pas connu, de petites valeurs de ratio peuvent laisser présumer de problèmes de résolution. En effet, le but sera par la suite de corréler différents pH à des valeurs de ratio qui devront avoir le domaine de variation le plus grand possible avec la borne supérieure la plus éloignée de 1 pour des pH alcalins.

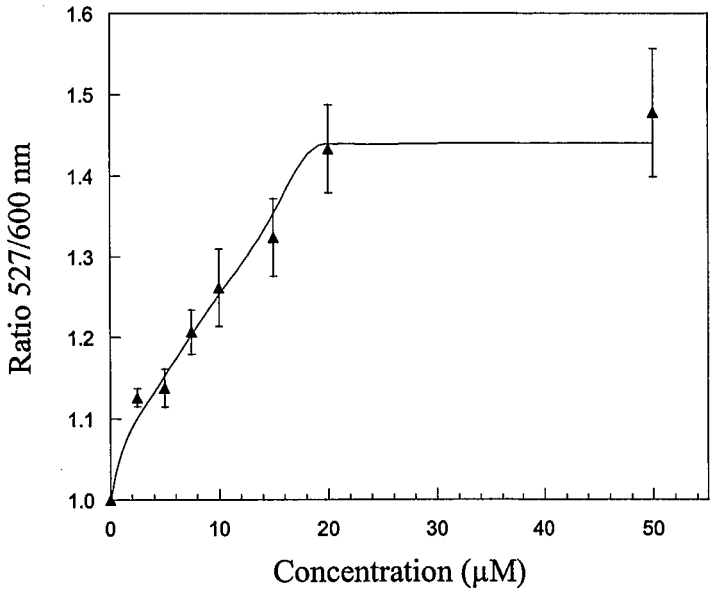


Figure IV.3 : Influence de la concentration en BCECF-AM sur le rapport des fluorescences à 527 et 600 nm.

A partir de 20 µM commence à se produire un phénomène de fuite du fluorochrome altérant la qualité des images. La fluorescence à 527 nm dépendant à la fois de la concentration en BCECF-AM et du pH, la concentration en BCECF-AM ne doit pas être trop grande pour ne pas occulter l'influence du pH sur l'intensité de fluorescence.

Pour ces raisons il a été décidé de travailler à une concentration de 20 µM.

IV.7.2- Temps de traitement au BCECF-AM :

Le BCECF-AM sous forme estérifiée n'est pas ou peu fluorescent. A l'intérieur des cellules le clivage des liaisons ester se produit sous l'action d'estérases intracellulaires. Le temps d'incubation des pelotes avec le fluorochrome peut intervenir sur le temps d'action de ces enzymes. Avec les mêmes critères que ceux exposés précédemment, il a été procédé à une mise au point du temps de marquage sur des échantillons (Fig. IV.4). Les cellules ont été traitées avec du BCECF-AM pendant des durées d'incubation variables, s'étalant de 0 à 40 min.

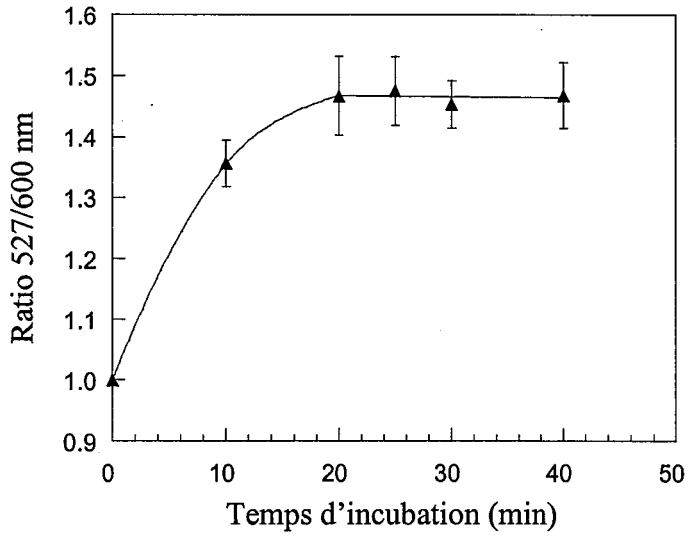


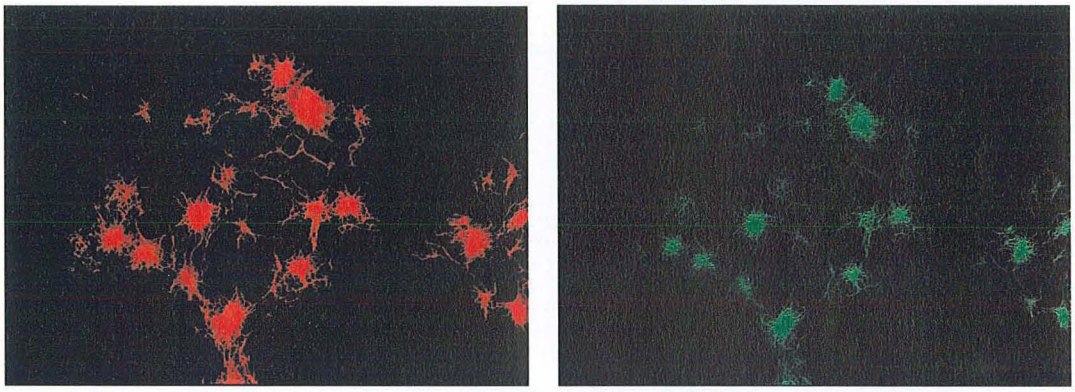
Figure IV.4 : Détermination du temps d'incubation du BCECF-AM.

Au vu des résultats obtenus, il s'avère que l'entrée du BCECF-AM à l'intérieur des cellules et l'action des estérases sont rapides, car 20 minutes d'incubation sont suffisantes.

Au delà de cette durée, ni les intensités de fluorescence ni le rapport de fluorescence n'augmentent. Il est probable qu'à ce stade la totalité du BCECF-AM a été désestérifié. Toutefois il a pu être noté une meilleure homogénéité de la coloration pour un temps de 30

Pour la suite des travaux, le protocole suivant a été défini :

- mesure de la densité à 660 nm
- dilution des échantillons dans du PBS de sorte que $DO_{660} = 1$
- mélange de 490 µL de dilution et 10 µL de BCECF-AM à une concentration finale de 20 µM
- incubation à 28 °C sur plaque d'agitation dans l'obscurité pendant 30 min
- centrifugation 30 s à la microcentrifugeuse
- resuspension des cellules dans du PBS
- stockage à 4 °C



Photographies de pelotes observées en épifluorescence à 600 nm (rouge) et 527 nm (vert).

IV.8- Calibrage du pH_i :

IV.8.1- Choix du mode de calibrage :

Le calcul des pH à partir des mesures effectuées peut se faire de deux manières différentes, à savoir le calibrage *in vitro* et le calibrage *in vivo*. Le premier consiste en la dissolution de BCECF (forme non estérifiée) dans différents tampons de pH connu. Le deuxième, après coloration des cellules, repose sur une équilibration du pH intracellulaire avec le pH extracellulaire de tampons dont les valeurs sont connues.

La possibilité du calibrage *in vitro* du pH a été écartée, car l'émission de fluorescence d'un fluorochrome est fortement assujettie à son environnement chimique. Le contenu intracellulaire ne peut être grossièrement assimilé à un simple tampon, car la polarité de solvant (ici tampon ou contenu intracellulaire) joue un rôle important sur la fluorescence. Il peut aussi être raisonnablement supposé que maints composés capables d'absorber une partie des longueurs d'ondes émises par le fluorochrome sont présents dans le cytoplasme, ce qui

La possibilité du calibrage *in vitro* du pH a été écartée, car l'émission de fluorescence d'un fluorochrome est fortement assujettie à son environnement chimique. Le contenu intracellulaire ne peut être grossièrement assimilé à un simple tampon, car la polarité de solvant (ici tampon ou contenu intracellulaire) joue un rôle important sur la fluorescence. Il peut aussi être raisonnablement supposé que maints composés capables d'absorber une partie des longueurs d'ondes émises par le fluorochrome sont présents dans le cytoplasme, ce qui provoque des phénomènes de "quenching" de fluorescence. Une des conséquences de l'environnement chimique est la modification du pK_a de la sonde. En ce sens, des mesures de pK_a en milieu intracellulaire et extracellulaire (dans des tampons) ont donné des valeurs significativement différentes pour le BCECF (Molenaar *et al.*, 1991). Un autre problème est que lors d'un calibrage *in vitro*, il est difficile de se placer à la concentration de BCECF-AM desestérifié réelle des cellules, puisque celle-ci peut-être propre à chaque cellule. Enfin il existe un autre argument technique à l'élimination de cette possibilité. L'utilisation de l'outil microscopique implique une étape de focalisation, ceci n'étant pas chose aisée pour un liquide déposé sur lame de verre (surface convexe du dépôt).

Toutefois ce type de calibrage a déjà été réalisé par Slavik (1983) et par Imai et Ohno (1995) pour étudier respectivement les pH intracellulaires de *Endomyces magnusii* et de *Saccharomyces cerevisiae*. L'influence du tampon de suspension des cellules dans le cas de *Sacch. cerevisiae* est minime car la différence entre la calibration *in vitro* et *in vivo* est faible (Slavik, 1997). Boyarsky et ses collaborateurs (1996 a et 1996 b) dans le cadre d'études sur des cellules de muscles lisses vasculaires ont aussi utilisé une technique de calibration *in vitro* avec correction. Leurs arguments motivant ce choix étaient fondés sur des difficultés rencontrées pour l'équilibration du pH_i avec le pH_e dues soit à l'ionophore employé qui ne permet pas le débordement des systèmes de régulation du pH cellulaire, soit à un contenu ionique (K^+) cellulaire trop variable. Pour ce type d'étude, le calibrage *in vivo* est généralement d'usage car il permet d'inclure divers facteurs cellulaires. Il a en conséquence été choisi pour cette étude.

IV.8.2- Technique du calibrage in vivo :

IV.8.2.a- Ajout de nigéricine :

La nigéricine a largement été utilisée pour ce type de calibrage *in vivo* (Leyval *et al.*,

1997 ; Franck *et al.*, 1996). Il s'agit d'un ionophore carboxylique encore nommé protonophore, d'un poids moléculaire de 747 Da. La présence de nombreux atomes d'oxygène, lui confère une bonne aptitude à former des complexes liposolubles avec les cations (Musgrove *et al.*, 1986, Pressman, 1976).

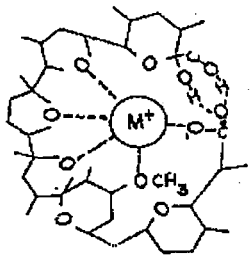


Figure IV.5 : Structure chimique de la nigéricine

En présence de tampons phosphate à fortes concentrations de K^+, la nigéricine a des propriétés chimiques qui permettent d'atteindre l'équilibre suivant :

$$\frac{(H^+)_i}{(H^+)_e} = \frac{(K^+)_i}{(K^+)_e}$$

Il s'ensuit un équilibre des valeurs de pH intracellulaire et extracellulaire.

Afin de déterminer la concentration adéquate de nigéricine à utiliser pour le protocole de calibrage, des pelotes préalablement traitées au BCECF-AM dans les conditions optimisées ont été centrifugées puis resuspendues dans du tampon phosphate à forte concentration en K^+, de pH égal à 7,0, en présence de concentrations variables de nigéricine (5-40 µM).

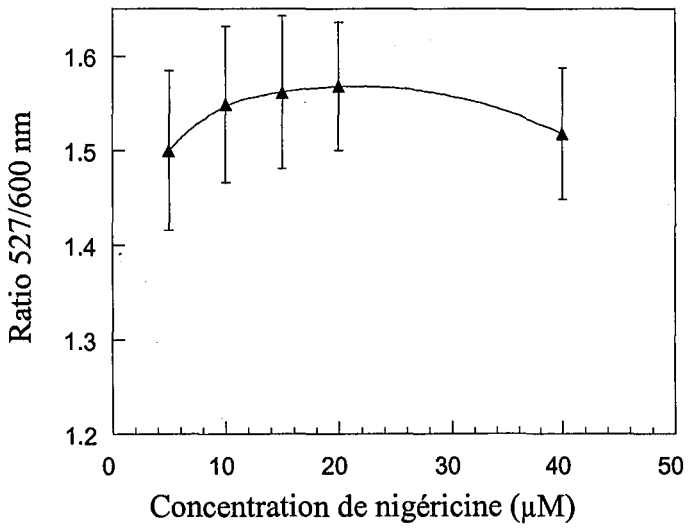


Figure IV.6 : Variation des rapports de fluorescence en fonction de la concentration en nigéricine en µM.

Les résultats obtenus ont montré une légère augmentation des valeurs de ratio jusqu'à une concentration de nigéricine de 20 µM. Ceci semblerait témoigner d'une non équilibration du pH_i pour ces concentrations. Ceci pourrait s'expliquer par un pH_i des cellules prélevées à ce stade de culture qui serait inférieur à 7,0. De l'entrée de K^+ et la sortie d'H^+ résulterait une augmentation du pH_i se traduisant par l'accroissement du ratio. Au delà de 20 µM, il a pu être observé une diminution du rapport des fluorescences et des intensités de fluorescence accompagnées par une fuite de fluorochrome à l'extérieur des cellules. Ce phénomène est vraisemblablement lié à une toxicité de la nigéricine qui provoquerait une lyse des cellules. Toutefois il est à noter que pour une concentration de 20 µM, l'hétérogénéité des valeurs de ratio reste importante, alors que les cellules sont censées être calibrées à un même pH. En conséquence l'ajout d'un ionophore supplémentaire a été envisagé.

IV.8.2.b- Ajout de valinomycine :

La valinomycine est un ionophore neutre de nature depsipeptidique (tout comme les pristinamycines I) et d'un poids moléculaire de 1111. La présence des nombreux groupements carbonylés en fait un excellent chélateur de cation (Fig IV.7). Sa conformation moléculaire en fait un complexant spécifique des ions K^+. Et tout comme la nigéricine elle permet l'équilibration des concentrations intra et extracellulaires en K^+.

La valinomycine est couramment utilisée pour la réalisation de protocoles de calibration *in vivo*, seule (Thomas *et al.*, 1979) ou en complément de la nigéricine (Siegumfeldt *et al.*, 1999).

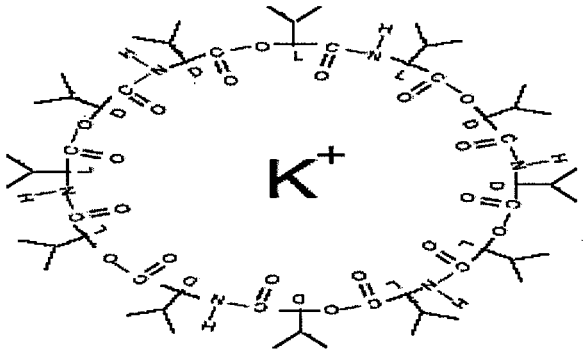


Figure IV.7 : Structure chimique de la valinomycine.

L'influence de l'ajout de valinomycine en concentrations allant de 0,5 à 10 µM a été étudiée sur des cellules colorées puis remises en suspension dans du tampon phosphate à forte concentration de K^+, à pH 7,0, en présence de 20 µM de nigéricine (Fig. IV.8).

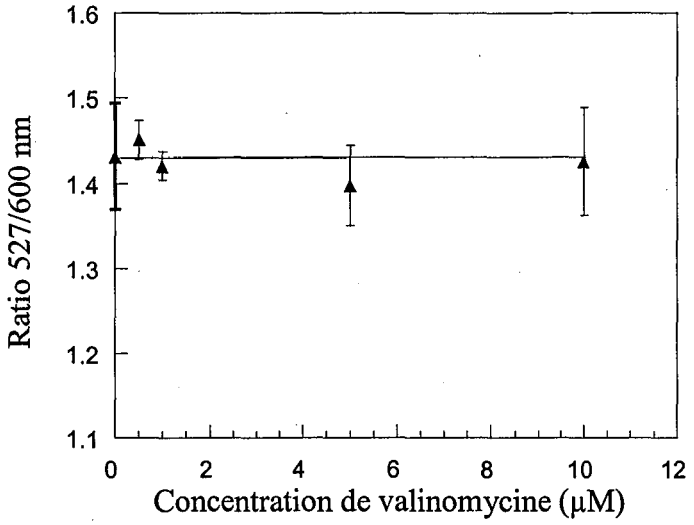


Figure IV.8 : Optimisation de la concentration en valinomycine en µM.

L'ajout de valinomycine ne modifie pas les valeurs des rapports de fluorescence en comparaison avec un essai ne contenant que de la nigéricine, mais son utilisation permet de réduire de façon importante l'hétérogénéité des rapports mesurés au sein d'un même échantillon ; l'écart type à la moyenne est réduit de deux à trois fois pour des concentrations de 0,5 et 1 µM.

Tout comme dans le cas de la nigéricine, il a pu être mis en évidence une toxicité de l'ionophore pour *S. pristinaespiralis*. A partir de 5 µM de valinomycine, le BCECF a tendance à ressortir des cellules (observation sur la lame) ; pour des concentrations supérieures à 10 µM, aucune prise d'image n'est réalisable. La concentration de valinomycine retenue pour les travaux ultérieurs est de 1 µM.

IV.8.2.c- Temps d'incubation des ionophores :

Le temps de traitement des pelotes avec les ionophores a été optimisé en incubant des pelotes préalablement colorées en présence de 20 µM de nigéricine et 1 µM de valinomycine, dans du tampon de calibrage à pH 7,0, pendant des durées allant de 5 à 30 min (Fig. IV.9).

Figure IV.9 : Influence du temps d'incubation des ionophores.

IV.8.2.d- Séquence d'addition des ionophores :

Des manipulations complémentaires ont été effectuées pour déterminer la séquence d'addition des ionophores permettant la meilleure équilibration des pH. (Fig. IV.10).

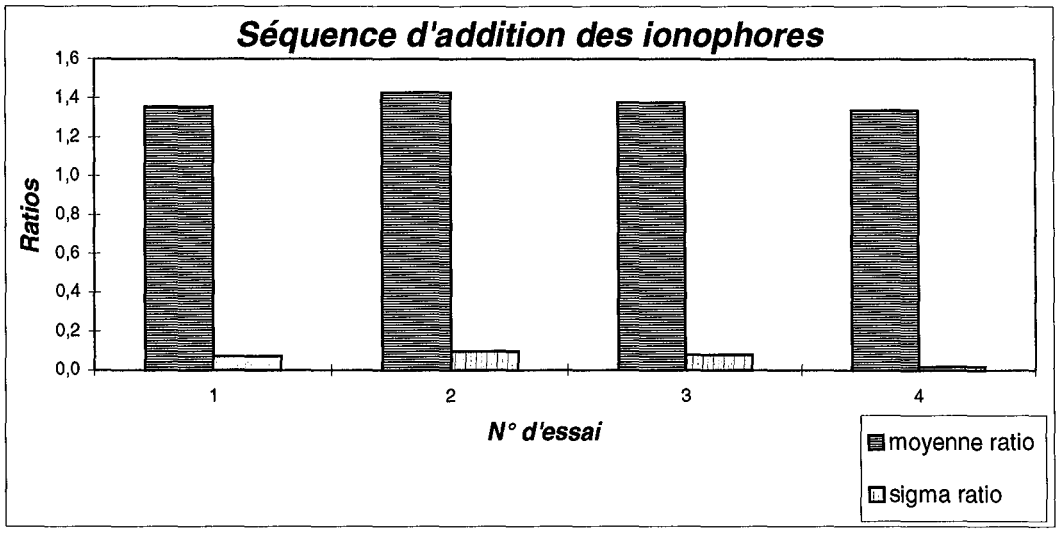


Figure IV.10 : Influence de la séquence d'addition des ionophores.

Les cellules colorées de l'essai 1 ont été incubées en présence de nigéricine seule pendant 10 min, puis la valinomycine a été ajoutée au tout pendant 10 min. Dans l'essai 2 la séquence inverse a été réalisée. Pour l'essai 3 la nigéricine a été ajoutée seule pendant 10 mn. et les cellules ont été rincées avant d'être mise à incuber en présence de valinomycine seule pendant 10 mn. L'essai 4 a été réalisé en ajoutant simultanément les deux ionophores.

L'essai avec addition simultanée des ionophores a permis d'obtenir la meilleure homogénéité des signaux. Pour les trois autres protocoles il n'a pu être mis en évidence de différences, hormis le fait que l'écart type à la moyenne est plus important. Ceci pourrait s'expliquer par un temps d'action deux fois plus long des ionophores (20 min au total) qui commencerait à donner lieu à un début de lyse cellulaire.

Les cellules colorées de l'essai 1 ont été incubées en présence de nigéricine seule pendant 10 min, puis la valinomycine a été ajoutée au tout pendant 10 min. Dans l'essai 2 la séquence inverse a été réalisée. Pour l'essai 3 la nigéricine a été ajoutée seule pendant 10 mn. et les cellules ont été rincées avant d'être mise à incuber en présence de valinomycine seule pendant 10 mn. L'essai 4 a été réalisé en ajoutant simultanément les deux ionophores.

L'essai avec addition simultanée des ionophores a permis d'obtenir la meilleure homogénéité des signaux. Pour les trois autres protocoles il n'a pu être mis en évidence de différences, hormis le fait que l'écart type à la moyenne est plus important. Ceci pourrait s'expliquer par un temps d'action deux fois plus long des ionophores (20 min au total) qui commencerait à donner lieu à un début de lyse cellulaire.

IV.8.2.e- Protocole de calibrage :

A partir de cellules colorées comme indiqué à la section IV.7.3 les gammes d'étalonnage sont réalisées de la façon suivante :

- centrifugation des cellules 30 s
- suspension dans 485 µL de tampon phosphate haute concentration en K^+ de pH déterminé
- ajout de 10 µL de nigéricine (C_f = 20 µM) et 5 µL de valinomycine (C_f = 1 µM)
- incubation 10 min à 28 °C sur table d'agitation dans l'obscurité
- centrifugation 30 s
- suspension dans 500 µL du même tampon
- conservation à 4°C
- observation et prise d'image
- *etc*

IV.8.2.f- Gammes d'étalonnage :

Les conditions de calibrage ayant été réalisées, les premiers essais de gammes d'étalonnage ont été réalisés pour des pH allant de 6,5 à 8,0.

Il est apparu au vu des différents essais effectués que l'équilibrage des pH se faisait mal pour les pH basiques 7,75 et 8,0. Les courbes obtenues ne permettent pas d'établir une relation linéaire (Fig. IV.11).

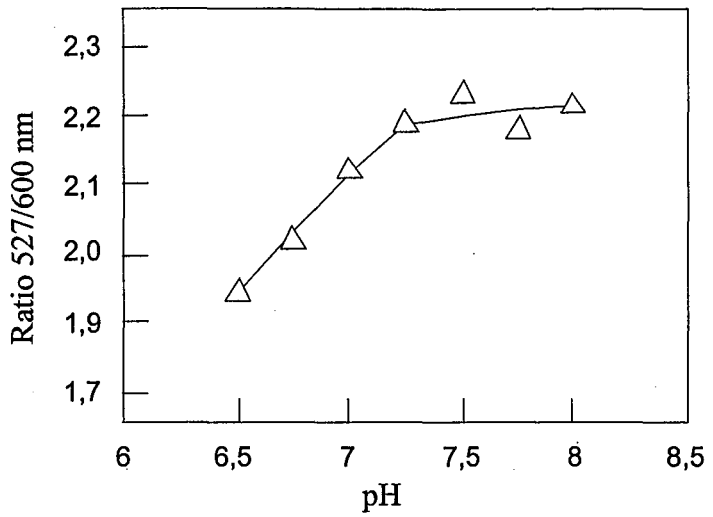


Figure IV.11 : Gamme de concentration en tampons phosphate haute concentration en K^+.

IV.8.2.g- Gammes d'étalonnage en tampons isotoniques :

Nous inspirant de travaux effectués sur le blocage rapide du métabolisme imposant que les solutions bloquantes soient de même osmolalité que celle du milieu de fermentation, (afin de diminuer les perturbations et donc les flux de composés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule), nous sommes parvenus à résoudre ce problème de non linéarité.

A partir de ce principe, l'osmolalité des tampons phosphate et PBS a été mesurée ; elle est inférieure d'environ 50 mOsm/kg par rapport à celle du moût de fermentation.

La suspension des cellules dans ce type de tampon engendre donc un choc osmotique (hypotonique). Il a été démontré chez *E. coli* qu'en réponse à un choc dû à la mise des cellules dans un milieu d'osmolalité plus élevée que le milieu intracellulaire, était observée une entrée massive d'ions potassium à l'intérieur des cellules (Epstein et Schultz, 1965). Ce phénomène transitoire dure 30 minutes chez *E. coli* et il serait un des mécanismes de régulation primaire de l'osmolalité intracellulaire (Dinnibier *et al.*, 1988).

Le phénomène inverse pouvait être observé chez *S. pristinaespiralis* : la suspension dans un tampon de plus faible osmolalité provoquerait un flux sortant de K^+. Or l'équilibrage des pH pour les valeurs basiques requiert une entrée de K^+ encore plus importante que dans le cas des pH acides.

Cette hypothèse n'a pas été vérifiée, mais il a été procédé à un ajustement de l'osmolalité de tous les tampons par ajout de xylose. Au cours de même séries de manipulations les étalonnages en tampons isotoniques et hypoosmotiques ont été comparés

(Fig. IV.12).

Les nouvelles gammes d'étalonnages obtenues en tampons isotoniques semblent aller dans le sens de cette hypothèse car le phénomène d'aplatissement des courbes n'est plus observé contrairement à celles effectuées en tampons hypoosmotiques.

Pour la suite des travaux les calibrages et les colorations se feront dans des tampons d'isotonicité contrôlée.

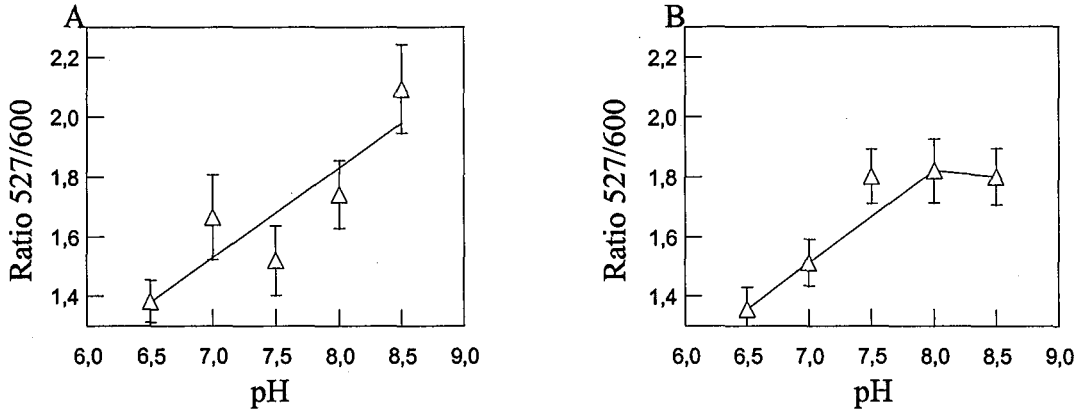


Figure IV.12 : A : gamme de calibration en tampons phosphate haute concentration en K^+ isotoniques ; B : gamme de calibration en tampon phosphate haute concentration en K^+ hypotoniques.

La concentration en ions K^+ des tampons a été choisie par analogie à celle utilisée dans des protocoles ayant servi à la calibration du pH_i chez *Corynebacterium*. Théoriquement l'élaboration d'un tel protocole nécessite la connaissance de la concentration intracellulaire en ion K^+ de l'espèce étudiée (Kaneko *et al.*, 1991), mais dans le cas de *S. pristinaespiralis*, cette donnée n'a pu être trouvée.

IV.8.2.h- Etalonnage des pH suivant le niveau de fluorescence à 600 nm :

En dépit d'un protocole de calibrage reproductible (Fig. IV.13), il subsiste une hétérogénéité des ratios au sein d'une population calibrée à un même pH.

Dans le cas présent on peut raisonnablement estimer que le pH est bien équilibré puisque les données brutes montrent une corrélation linéaire entre le pH et les ratios.

Il s'est avéré que la fluorescence à 600 nm n'est pas homogène, les niveaux de gris de pixels s'étendent majoritairement (+ de 93 %) entre 20 et 30. Des différences de coloration au niveau de la population microbienne pourraient être liées à une perméabilité des cellules au

Toutefois la fluorescence à 527 nm devrait augmenter dans les mêmes proportions (base de la technique ratiométrique) afin que les rapports des deux fluorescences restent constants. Or il été montré que plus les deux fluorescences étaient grandes plus le ratio était important, quel que soit le pH du tampon de calibrage.

La figure IV.14 représente l'évolution des valeurs de ratios en fonction de la fluorescence à 600 nm pour des pelotes calibrées à 3 pH différents (7,0 ; 8,0 et 8,5) et chaque point représente la moyenne d'au moins 10 événements.

Les résultats obtenus montrent que le rapport des fluorescences subit la même évolution en fonction de la valeur de fluorescence à 600 nm quelle que soit la valeur de pH (faisceau de droites parallèles).

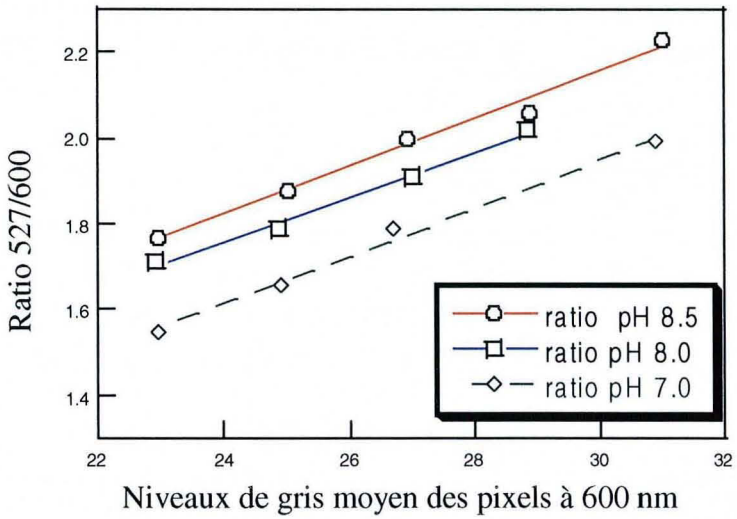


Figure IV.14 : Evolution des ratios 527/600 nm en fonction de la fluorescence (niveaux de gris des pixels) à 600 nm pour des cellules calibrées à différents pH.

Ceci démontre qu'à partir des valeurs de fluorescence dans le rouge et de ratio il est possible de déterminer le pH. Il apparaît que les fluorescences à 527 et 600 nm ne varient pas proportionnellement car si tel était le cas, les droites représentant les pelotes incubées dans un tampon de même pH seraient parallèles entre elles mais aussi à l'axe des abscisses. Puisque ce phénomène ne provient pas d'un effet pH, l'hypothèse selon laquelle la longueur d'onde à 600 nm ne serait pas un point parfaitement isosbestique (fluorescence indépendante du pH) a une influence moindre sur le résultat observé.

La même représentation (Fig. IV.15) avec les valeurs de fluorescence à 527 nm représentées en abscisse montre un décalage du premier point des droites correspondantes vers la droite à mesure que le pH s'accroît.

Ceci montre une bonne réponse de la fluorescence verte par rapport au pH. Les rapports évoluent vers de plus grandes valeurs lorsque la fluorescence à 527 nm augmente. La fluorescence à 600 nm semble donc ne pas répondre proportionnellement au paramètre auquel

elle est censée répondre, comparativement à la fluorescence à 527 nm qui varie plus amplement. Ceci se traduit par une perte sur l'enregistrement du signal à 600 nm.

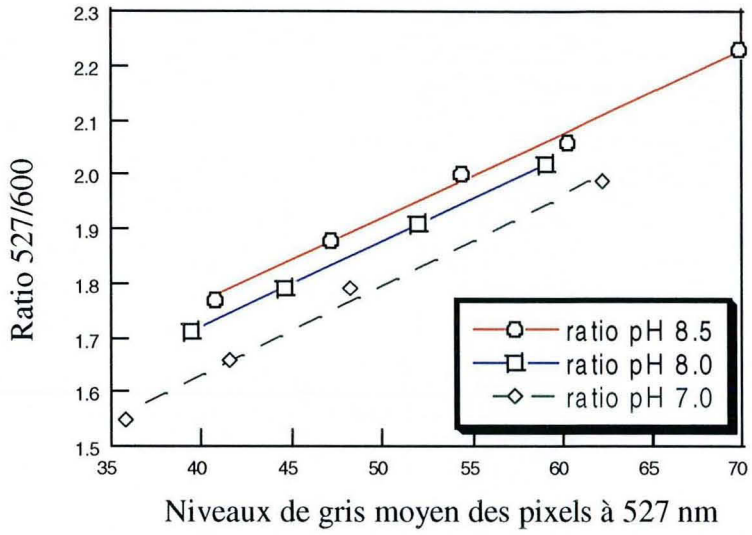


Figure IV.15 : Evolution des ratios 527/600 nm en fonction de la fluorescence (niveaux de gris des pixels) à 527 nm pour des cellules calibrées à différents pH.

Deux causes potentielles pouvant expliquer ceci. La première serait liée à la caméra : perte de sensibilité des capteurs dans le rouge. Un argument allant dans ce sens a été avancé par Imai et Ohno (1995) qui évoquent des difficultés à obtenir des relations linéaires entre l'intensité de fluorescence et la sensibilité des films.

L'autre raison pourrait être dépendante du micro-organisme. Celui-ci absorbe les longueurs d'ondes de l'ordre de 600 nm (il est possible d'évaluer la biomasse en mesurant l'absorbance à cette longueur d'onde). Il est alors envisageable qu'une partie de la fluorescence réemise à 600 nm soit absorbée par le micro-organisme au niveau de certaines molécules (quenching de fluorescence), par collision (quenching dynamique), ou complexation avec d'autres molécules (phénomène statique). Ce phénomène de quenching serait d'autant plus important que le niveau de fluorescence à 600 nm serait grand. Il n'a pu être trouvé de documentation traitant d'un tel phénomène dans la littérature, hormis la publication d'Imai et Ohno qui décrit une augmentation du phénomène de quenching pour des valeurs de pH_i acides. Ici le phénomène ne semble pas être relié à un effet du pH.

Pour la suite des travaux la détermination des valeurs de pH intracellulaires de pelotes non calibrées s'est donc fait suivant leur niveau de fluorescence rouge d'après deux courbes d'étalonnages : l'une pour les pelotes ayant une fluorescence à 600 nm comprise entre 20 et

L'autre raison pourrait être dépendante du micro-organisme. Celui-ci absorbe les longueurs d'ondes de l'ordre de 600 nm (il est possible d'évaluer la biomasse en mesurant l'absorbance à cette longueur d'onde). Il est alors envisageable qu'une partie de la fluorescence réemise à 600 nm soit absorbée par le micro-organisme au niveau de certaines molécules (quenching de fluorescence), par collision (quenching dynamique), ou complexation avec d'autres molécules (phénomène statique). Ce phénomène de quenching serait d'autant plus important que le niveau de fluorescence à 600 nm serait grand. Il n'a pu être trouvé de documentation traitant d'un tel phénomène dans la littérature, hormis la publication d'Imai et Ohno qui décrit une augmentation du phénomène de quenching pour des valeurs de pH_i acides. Ici le phénomène ne semble pas être relié à un effet du pH.

Pour la suite des travaux la détermination des valeurs de pH intracellulaires de pelotes non calibrées s'est donc fait suivant leur niveau de fluorescence rouge d'après deux courbes d'étalonnages : l'une pour les pelotes ayant une fluorescence à 600 nm comprise entre 20 et 25, et l'autre pour des niveaux s'étalant de 25 à 30. (Fig. IV.16). Les valeurs de pH_i ainsi calculées permettent une précision de mesure de ± 0.3 u pH.

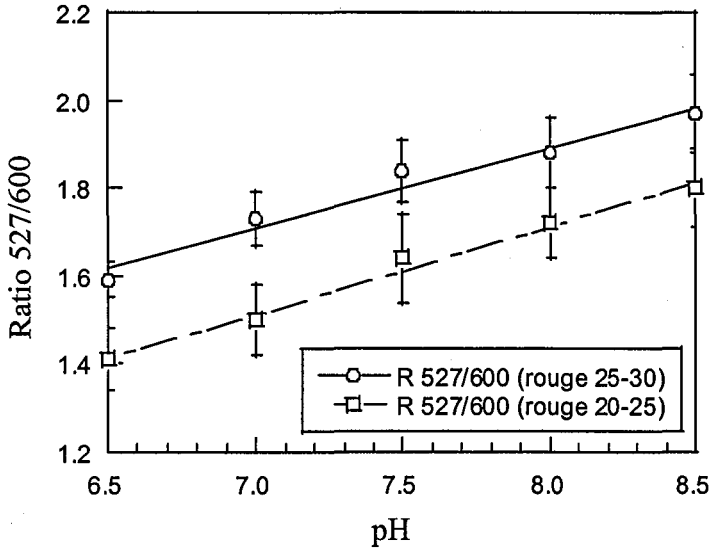


Figure IV.16 : Gammes de calibration suivant le niveau de fluorescence à 600 nm.

IV.9- Vérifications de la méthode de mesure du pH_i :

Avant d'appliquer la méthode développée à un suivi de l'évolution du pH_i au cours de cultures en fermenteurs nombre de vérifications sont nécessaires afin de valider la méthode.

IV.9.1- Estimation de l'influence du photoblanchiment sur le rapport des fluorescences :

Des phénomènes de photosensibilité de la sonde fluorimétrique ayant pu être mis en évidence, cette série de manipulations a pour but d'étudier l'influence de ce phénomène sur la valeur finale mesurée. Pour ce faire, des pelotes ont été colorées avec du BCECF-AM en tampon PBS. Puis sur une même pelote ont été effectués successivement 10 couples d'images (soit 20 excitations) à des intervalles de temps de 15 secondes. L'opération a été renouvelée pour 10 pelotes différentes. L'évolution du rapport des fluorescences en pourcentage du rapport initial en fonction du nombre de couples d'images effectué est représenté sur la figure IV.17.

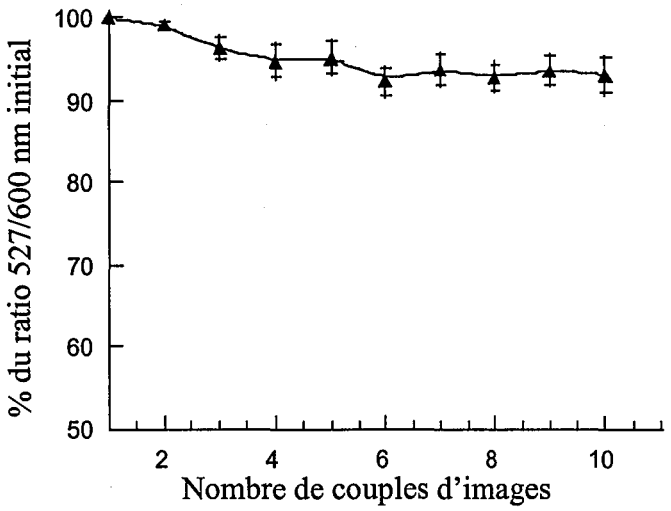


Figure IV.17 : Influence du déclin de fluorescence sur les rapports mesurés en fonction du nombre de couples d'images.

Une diminution sensiblement constante d'environ 1 % par couple d'image est observée Dans les conditions de prises d'image (un seul couple par pelote) ce facteur ne devrait pas avoir d'incidence importante sur les mesures finales.

IV.9.2- Estimation de l'influence de l'autofluorescence des cellules sur le rapport des fluorescences :

Les cellules possèdent une fluorescence naturelle liée à la présence de molécules capables d'émettre de la fluorescence aux longueurs d'ondes de travail. L'objet de cette étude est donc de déterminer si cette fluorescence naturelle est capable d'entacher les résultats

finaux, ou si les cellules à l'état naturel ont tendance à fluorescer plus à une longueur d'onde qu'à une autre. Pour le vérifier des images à 600 et 527 nm ont été effectuées pour des cellules non traitées au BCECF-AM.

Les résultats obtenus laissent supposer que ces valeurs ne risquent pas d'affecter les mesures de fluorescence pour des cellules colorées, d'autant plus que les valeurs moyennes de fluorescence sont bien inférieures à celles mesurées dans le cas de pelotes traitées au BCECF-AM (20-30 à 600 nm et 25-80 à 527 nm) et à celles des seuillages déterminées dans les cas précédents.

Nom de l'objet	Moyenne à 600 nm	σ 600 nm	Moyenne à 527 nm	σ 527 nm	527/600 nm	σ ratio
1	18,12	0,92	17,98	0,92	0,99	0,07
2	18,04	0,92	18,02	0,92	1,00	0,07
3	18,09	0,92	17,93	0,92	0,99	0,07
4	18,02	0,92	17,90	0,91	1,00	0,07
5	18,07	0,92	17,97	0,92	1,00	0,07
6	18,05	0,92	17,86	0,91	0,99	0,07
7	18,09	0,92	18,00	0,92	1,00	0,07
8	18,00	0,92	18,02	0,92	1,00	0,07
9	18,04	0,92	17,94	0,92	1,00	0,07
10	18,13	0,92	18,00	0,92	1,00	0,07
Moyenne des 10 objets	18,06	0,92	17,96	0,92	1,00	0,00

Tableau IV.2: Mesures d'autofluorescence à 527 et 600 nm et rapports des mesures sur des pelotes non colorées. σ représente l'écart type à la moyenne.

IV.9.3- Influence de l'état physiologique des cellules sur les mesures :

Les cellules étant dans des états physiologiques variables suivant le temps de culture, il semblait intéressant de vérifier si ce paramètre modifie les résultats de calibration comme il a été suggéré par Franck *et al.* (1996).

Deux courbes d'étalonnage ont été effectuées sur des images de pelotes ayant un niveau de fluorescence à 600 nm compris entre 25-30 pour des cellules prélevées à 16 H (phase de croissance rapide) et à 24 H de culture (phase de croissance ralentie) (Fig. IV.18). En tenant compte de l'erreur expérimentale, il semble que ce paramètre n'ait pas grande influence.

IV.9.3- Influence de la taille des pelotes sur le rapport des fluorescences :

Afin de savoir si le facteur taille de l'objet composant l'image joue un rôle sur la mesure des rapports, ces derniers ont été représentés en fonction des surfaces (en pixels) pour des pelotes calibrées à un même pH (8,5) pour un échantillon n>100 (Fig. IV.19).

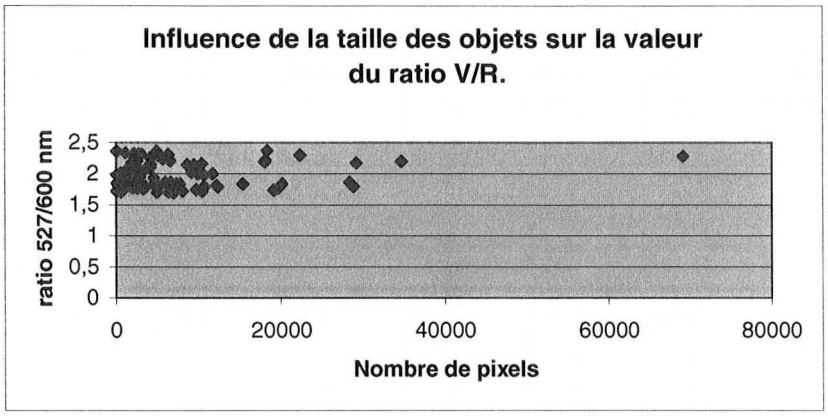


Figure IV.19 : Rapports des fluorescences 527 et 600 nm en fonction de la taille des pelotes en pixels.

Il ne semble pas que la taille des pelotes ait une influence puisqu'il ne se dégage aucune tendance.

IV.9.4- Influence de la profondeur de champ :

Les pelotes peuvent être assimilées à des sphères dont les images représentent la projection perpendiculaire de l'hémisphère supérieur. La mise au point étant effectuée sur le pôle supérieur des pelotes, la profondeur du champ d'observation se trouvera être différente pour des points situés à l'équateur. Si cette profondeur de champ jouait un rôle quelconque sur les mesures réalisées, des valeurs de rapports différents entre des pixels situés en périphérie de la projection et des pixels situés au centre de la projection s'observeraient.

Une fonction de Visilog permet de tracer une ligne (Fig. IV.20 A) sur les images et de relever les valeurs en niveaux de gris le long de cette ligne, permettant en quelque sorte d'effectuer un relevé topographique des niveaux de gris. Ceci a été effectué suivant la même ligne sur les images à 527 (Fig. IV.20 D), 600 nm (Fig. IV.20 C) et sur l'image pH finale (Fig. IV.20 B). Ceci démontre l'intérêt de la technique ratiométrique qui permet de s'affranchir de différences de coloration qui sont dues dans le cas présent à une différence de profondeur de champ. Il en résulte donc la non influence de ce facteur sur la mesure finale.

IV.9.4- Influence de la profondeur de champ :

Les pelotes peuvent être assimilées à des sphères dont les images représentent la projection perpendiculaire de l'hémisphère supérieur. La mise au point étant effectuée sur le pôle supérieur des pelotes, la profondeur du champ d'observation se trouvera être différente pour des points situés à l'équateur. Si cette profondeur de champ jouait un rôle quelconque sur les mesures réalisées, des valeurs de rapports différents entre des pixels situés en périphérie de la projection et des pixels situés au centre de la projection s'observeraient.

Une fonction de Visilog permet de tracer une ligne (Fig. IV.20 A) sur les images et de relever les valeurs en niveaux de gris le long de cette ligne, permettant en quelque sorte d'effectuer un relevé topographique des niveaux de gris. Ceci a été effectué suivant la même ligne sur les images à 527 (Fig. IV.20 D), 600 nm (Fig. IV.20 C) et sur l'image pH finale (Fig. IV.20 B). Ceci démontre l'intérêt de la technique ratiométrique qui permet de s'affranchir de différences de coloration qui sont dues dans le cas présent à une différence de profondeur de champ. Il en résulte donc la non influence de ce facteur sur la mesure finale.

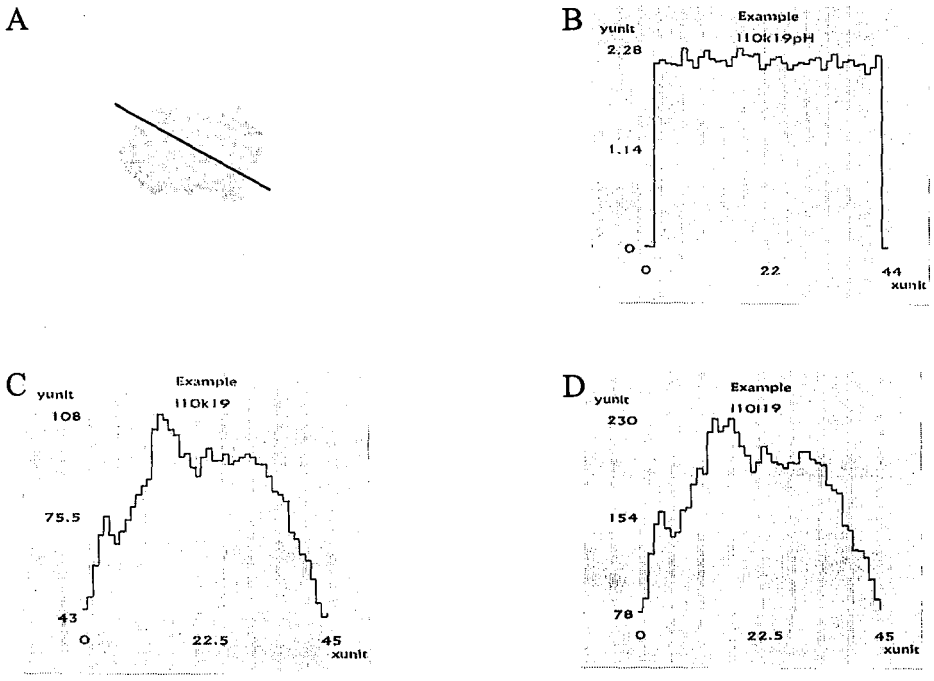


Figure IV.20 : A. Ligne sur l'image pH suivant laquelle seront effectués les relevés des niveaux de gris de pixels ; B. relevés des valeurs des pixels sur l'image pH en fonction de la distance en pixels parcourue sur la ligne ; C. relevés des valeurs des pixels sur l'image de fluorescence à 600 nm en fonction de la distance en pixels parcourue suivant la ligne ; D. relevés des valeurs des pixels sur l'image de fluorescence à 527 nm en fonction de la distance en pixels parcourue sur la ligne

IV.10- Discussion sur la méthode :

L'objet de cette méthode est la mesure du pH_i par microscopie à épifluorescence et analyse d'image pour des cellules se trouvant être en périphérie des pelotes. La précision de mesure obtenue est d'environ 0,3-0,4 unité pH, ce qui semble comparable à la résolution de 0,4 unité pH trouvée par cytométrie en flux et spectrofluorimétrie avec le BCECF (Musgrove *et al.*, 1986) alors que la morphologie étudiée est plus complexe.

Les résultats donnés par cette méthode n'ont pu être éprouvés par ceux d'une autre méthode. Cependant, divers arguments bibliographiques peuvent être avancés quant au bien fondé de telles mesures.

Tout d'abord il ne fait aucun doute que les signaux traités en niveau de gris sont bien corrélés à ceux captés par des spectrofluorimètres classiques, ce qui fait de l'analyse d'image un outil valable pour des études quantitatives (Tanasugarn *et al.*, 1984). Siegumfeldt et son équipe (1999), en ont aussi fait la démonstration récemment car ils ont comparé avec succès leurs résultats obtenus par microscopie à épifluorescence et analyse d'image chez *Listeria inoccua*, à ceux acquis par spectrofluorimétrie. Toutefois certains problèmes de linéarité du signal pris par la caméra peuvent être rencontrés (Slavik, 1983 ; Imai et Ohno, 1995).

Concernant l'utilisation de BCECF, il a été démontré que les valeurs de pH_i obtenues chez *Propionibacterium acnes* étaient aussi précises et du même ordre que celles obtenues par spectroscopie RMN du ^{31}P (Futsaether *et al.*, 1993) et que son utilisation en technique ratiométrique à double émission était prometteuse (Musgrove *et al*, 1986 ; Slavik, 1997).

En comparaison avec une méthode de distribution de l'acide benzoïque, il semblerait que le BCECF donne lieu à des valeurs légèrement plus élevées, mais plus exactes, dans la mesure où le benzoate pourrait perturber l'établissement du gradient électrochimique (Molenaar *et al.*, 1991).

Le domaine de calibration du pH (6,5-8,5) est quant à lui un peu différent de la zone de linéarité de 6,5-8 donnée dans la littérature pour le BCECF. De ce fait les valeurs de pH_i supérieures à 8,5 devront être considérées avec quelques réserves. Pour les valeurs de pH supérieures à 7,5, le c-SNARF serait plus adapté (Franck *et al.*,1996, Leyval *et al.*, 1997).

Cette méthode faisant appel à l'analyse d'image présente l'avantage de s'affranchir des problèmes de fuites du fluorochrome à l'extérieur des cellules car cette fluorescence peut être soustraite lors des étapes de seuillage des images, contrairement aux mesures spectrofluorimétriques qui peuvent être entachées d'erreur. Lorsqu'il y a relarguage de la

sonde, elle fluoresce selon le pH du tampon de suspension et non pas en fonction du pH_i (Futsaether *et al.*, 1993), ce qui peut nécessiter certaines corrections (Molenaar *et al.*, 1991).

Par ailleurs, les étapes de traitement des images autorisées par le logiciel d'analyse d'image utilisé permettent de ne pas avoir à effectuer plusieurs images de fond pour soustraire les valeurs d'autofluorescence et de fuite du fluorochrome comme cela peut parfois se faire (Kaneko *et al.*, 1991). Les problèmes classiques de délimitation des objets rencontrés en analyse d'image ont été évités puisque l'obtention des résultats n'implique pas la récupération de la totalité des objets (Sieracki *et al.*, 1989 ; Durant *et al.*, 1994 a et b), comme cela peut être le cas pour des mesures de paramètres morphologiques.

Cette technique soulève une interrogation sur la valeur significative des résultats dans la mesure où elle n'autorise qu'une étude des cellules appartenant aux couches superficielles des pelotes. Les cellules étudiées sont directement exposées aux variations du milieu environnant, contrairement à celles situées vers le cœur des pelotes, les résultats refléteraient les variations de pH_i au sein d'une certaine population de cellules.

Si l'hypothèse suivant laquelle la biosynthèse de métabolites secondaires aurait lieu au niveau des cellules subissant des conditions de cultures drastiques (limitations diffusionnelles en nutriments et O_2), la question de savoir si la biosynthèse de pristinamycines peut se caractériser par des variations de pH_i au niveau superficiel des pelotes peut se poser.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a fait part de la localisation de la biosynthèse à un quelconque niveau des pelotes. Par ailleurs, il a été suggéré que ces limitations diffusionnelles entraînaient une nécrose des cellules centrales, les pelotes pouvant être creuses en leur cœur (Thomas, 1992). Cela a été corroboré par Dusart pour une autre espèce de *Streptomyces* (communication personnelle). En tenant compte de communications intercellulaires au sein de mêmes colonies le long des hyphes (Chater et Hopwood, 1989), il est probable que les changements métaboliques au sein de cellules situées à l'intérieur des pelotes se répercutent au niveau superficiel et réciproquement.

Il serait néanmoins intéressant d'étudier la distribution du pH_i au sein de cellules situées dans les couches inférieures des pelotes en utilisant avec la même technique un microscope confocal.

Chapitre 5

Résultats:

Suivi du pH

en

fermenteurs discontinus

Suivi du pHi en fermenteurs discontinus :

V.1- Introduction : 122

V.2- Croissance, oxygène, glucose et production de pristinamycines : 122

V.2.1- Croissance et production de pristinamycines : 124

V.2.3- Consommation du glucose : 124

V.3- Evolution du pH_i : 125

V.3.1- Relations du pH_i avec la croissance et la production de pristinamycines : 125

V.3.3- Evolution du gradient de pH : 127

V.4- Acides organiques : 128

V.4.1- Le pyruvate 128

V.4.2- L'oxalo-acétate : 128

V.4.3- Le malate : 129

V.4.4- L'acétate: 129

V.4.5- L'α-céto-glutarate (α-CG) : 129

V.4.6- L'isocitrate : 131

V.4.7- Le lactate : 132

V.4.8- Le succinate : 134

V.5- Conclusions : 136

V.1- Introduction :

L'objet de cette étude est le suivi de l'évolution du pH_i et du ΔpH de *S. pristinaespiralis* au cours de cultures discontinues. Le principe d'homéostasie du pH_i voudrait que ce paramètre varie peu au cours de la fermentation. Cependant, le passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire fait intervenir toute une suite de changements physiologiques et morphologiques qui peuvent être susceptibles d'engendrer des variations de ce facteur. Parmi les principaux agents affectant les valeurs de pH_i, figurent les acides organiques du métabolisme central.

Le genre *Streptomyces* a été décrit comme étant un micro-organisme excrétant certains acides organiques tels que le pyruvate et l'α-cétoglutarate en quantités importantes dans le milieu de culture, provoquant de ce fait une acidification de son environnement (Ahmed *et al.*, 1984 ; Dekleva et Strohl, 1987 ; Madden *et al.*, 1996). Dans le cas de *Streptomyces citricolor* cultivé sur glucose et citrate, la présence de succinate et d'acétate a pu être mise en évidence dans les surnageants mais aussi, de grandes quantités de 2-phényléthylamine qui pourraient contribuer à atténuer l'acidification du milieu (Abel *et al.*, 1999).

Au cours de cette étude, des cultures en milieu synthétique (MPS2) en conditions de pH extracellulaire tamponné (présence de MOPS) ont été réalisées en triple, en réacteur discontinu, ayant un volume utile de 2 L.

Le pH intracellulaire a été mesuré parallèlement à la biomasse et à la production de pristinamycines afin d'étudier d'éventuelles relations entre la vitesse spécifique de croissance, la production de métabolites secondaires et des fluctuations de pH_i.

L'évolution de la vitesse de consommation du glucose (principale source de carbone) a été quantifiée, la présence d'acides organiques résultant du catabolisme de ce substrat a été recherchée au niveau des surnageants pour : le pyruvate, l'α-cétoglutarate, l'acétate, le phospho-énol-pyruvate, le lactate, le succinate, l'isocitrate, le fumarate, le malate et le lactate.

V.2- Croissance, oxygène, glucose et production de pristinamycines :

Les 3 fermentations effectuées diffèrent par la durée des cultures, le moment de déclenchement de la biosynthèse et la production de pristinamycines (Fig. V.1).

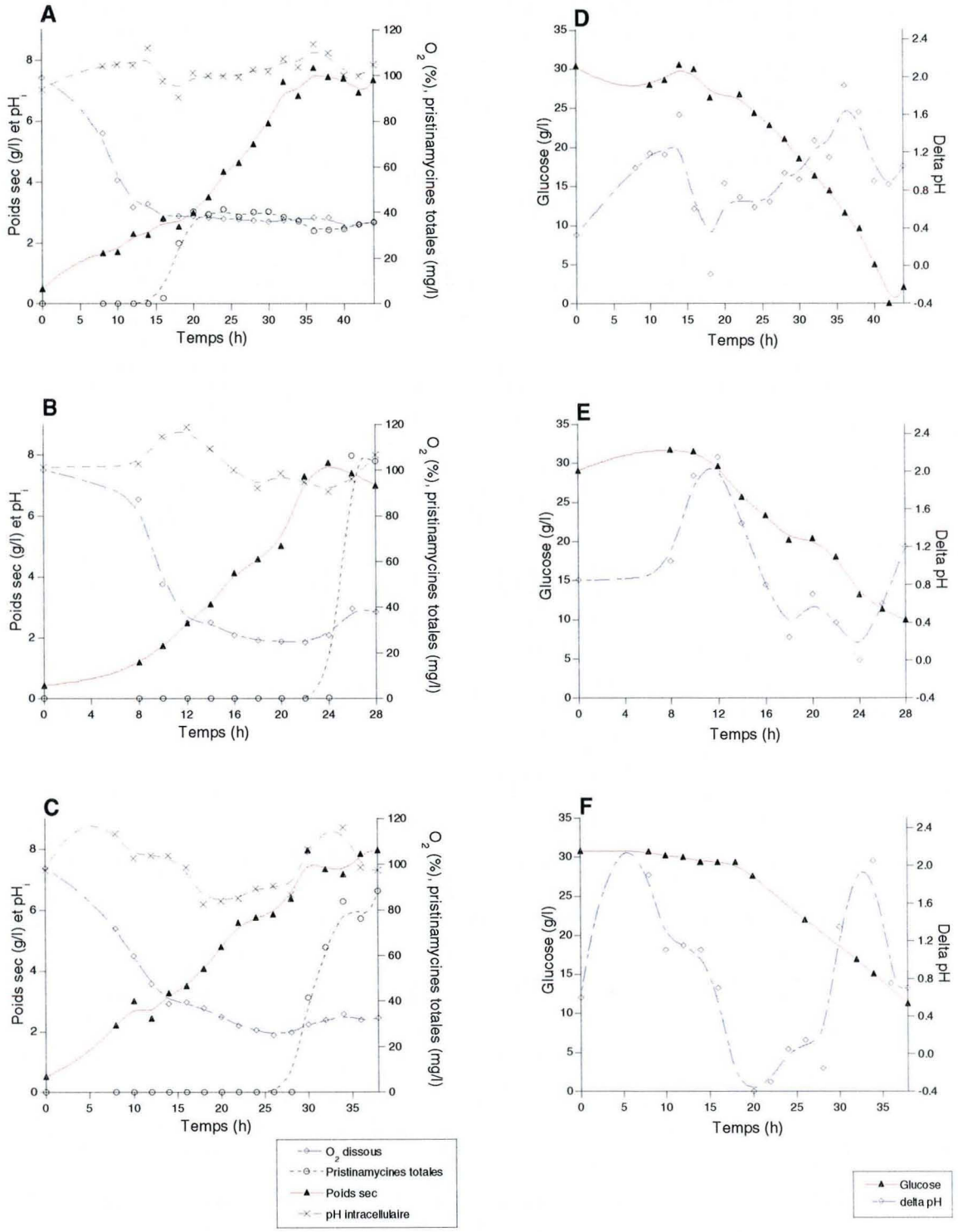


Figure V.1 : A, D : fermentation F1 ; B, E : fermentation F2 ; C, F : fermentation F3. A, B et C : biomasse, teneur en oxygène dissous, pH_i et pristinamycines totales. D, E et F : glucose et gradient de pH (ΔpH).

La fermentation n° 2 a été arrêtée précocement, les mesures de pH_i n'étaient plus possibles car les pelotes étaient lâches et les fuites de colorants importantes.

Sur les figures les vitesses spécifiques calculées ne sont pas représentées entre 0 et 8 h de culture compte tenu de l'erreur expérimentale sur les mesures de biomasse durant cette période.

V.2.1- Croissance et production de pristinamycines :

Les biomasses maximales obtenues pour les 3 fermentations F1, F2 et F3 sont respectivement de 7,7, 7,7 et 8,0 g/L (Fig. V.1). La teneur en oxygène dissous diminue pour atteindre les 30 % de saturation minimaux imposés alors que la biomasse est de 2,5-3 g/L. A cette période, les taux de croissance sont de 0,06, 0,13 et 0,06 h^{-1} pour F1, F2 et F3 et ces μ correspondent quasiment aux μ les plus élevés observés sur la période où les calculs étaient possibles(Fig V.2).

Les profils de croissance sont quasiment identiques hormis le fait que la biomasse maximale pour F1 a été obtenue en plus de 30 heures. Une explication pourrait être liée à la biosynthèse des pristinamycines qui débute de manière précoce dès la 16ème heure alors qu'elle ne commence qu'à la 26 et 28ème heure pour F2 et F3. Il est probable que certains changements physiologiques dont les causes restent obscures aient provoqué un ralentissement de la croissance des cellules au cours de cette culture. Parmi les paramètres ayant pu engendrer ceci, un état physiologique variable des précultures paraît être l'explication la plus probable. Dans le cas de F1, il peut être supposé que certaines cellules étaient déjà entrées dans un processus de différenciation physiologique. Il se produit effectivement une inflexion marquée de la croissance simultanément au début de production des pristinamycines et précédemment à cet instant μ passe de 0,08 à 0,04 h^{-1}.

Le début de biosynthèse des pristinamycines a lieu alors que les taux de croissance sont de 0,04, 0,04 et 0,03 h^{-1} pour respectivement F1, F2 et F3. En comparaison avec d'autres données obtenues chez *S. pristinaespiralis*, ces μ coïncident avec la valeur de 0,05 h^{-1}, croissance maximale observée lorsque débute la biosynthèse de pristinamycines (Paquet, 1990 ; Cans, 1987).

V.2.3- Consommation du glucose :

Au cours de ces fermentations, le quotient métabolique du glucose est corrélé aux taux de croissance dans la mesure où les μ sont proches de leur valeur maximale et que les vitesses spécifiques de consommation du glucose sont les plus élevées (Fig. V.2). Les quotients métaboliques maximaux calculés sont de 0,17, 0,5 et 0,25 g/g/h alors que les μ sont de 0,075 h^{-1} pour F1, 0,13 pour F2, et 0,075 h^{-1} pour F3. Cette période correspond sensiblement au moment où la teneur en O_2 dissous atteint le seuil des 30 %.

Au moment où a lieu l'excrétion de pristinamycines, la vitesse spécifique de consommation du glucose est relativement importante : 0,11, 0,20 et 0,11 g/g/h pour F1, F2 et

F3.

V.3- Evolution du pH_i :

V.3.1- Relations du pH_i avec la croissance et la production de pristinamycines :

Le pH_i mesuré au cours de ces cultures subit d'importantes variations : plus de 2 unités, alors que le pH extracellulaire reste quasiment constant. De prime abord, de telles variations paraissent surprenantes car de tels ordres de grandeur ne se rencontrent généralement qu'en cas de grandes variations du pH_e. Par exemple dans le cas de la levure un domaine de variation du pH_i sur 2 unités est obtenu alors que le pH_e varie entre 2,5 et 8,5 (Slavik, 1982).

En début de culture, lors de la croissance, avec des valeurs initiales de 7,0, 7,6 et 7,3 pour F1, F2 et F3, le pH_i augmente pour atteindre son maximum entre 8 et 16 heures. Le pH_i diminue alors que la concentration résiduelle de glucose commence à baisser significativement.

La biosynthèse de pristinamycines semble corrélée à de basses valeurs de ce dernier (6,8, 6,8 et 6,5) au début de l'excrétion de l'antibiotique. Cependant la vitesse d'acidification du milieu intracellulaire est plus rapide dans le cas de F1 que pour F2 et F3.Pour F1, la biosynthèse de pristinamycines suit immédiatement l'abaissement de pH_i alors que pour F2 et F3 , elle ne commence que plusieurs heures après la diminution de pH_i.

Les vitesses de production spécifique des pristinamycines obtenues pour F1, F2 et F3 sont respectivement de 2,1, 7,1 et 1,7 mg/g/h. Les vitesses spécifiques de production de pristinamycines devront être considérées avec prudence car l'excrétion est un phénomène très rapide (environ 6 heures) et peu de données sont acquises pendant cette période. Le délai entre la production et l'excrétion des pristinamycines n'est pas connu. Si ce délai varie, des changements de métabolisme tels que le pH_i peuvent être observés, alors qu'il n'y a pas encore de pristinamycines dans les surnageants. Ceci pourrait expliquer les différences de profils entre les vitesses spécifiques d'excrétion de pristinamycines et les variations de pH_i sur la figure IV.2 (D,E,F).

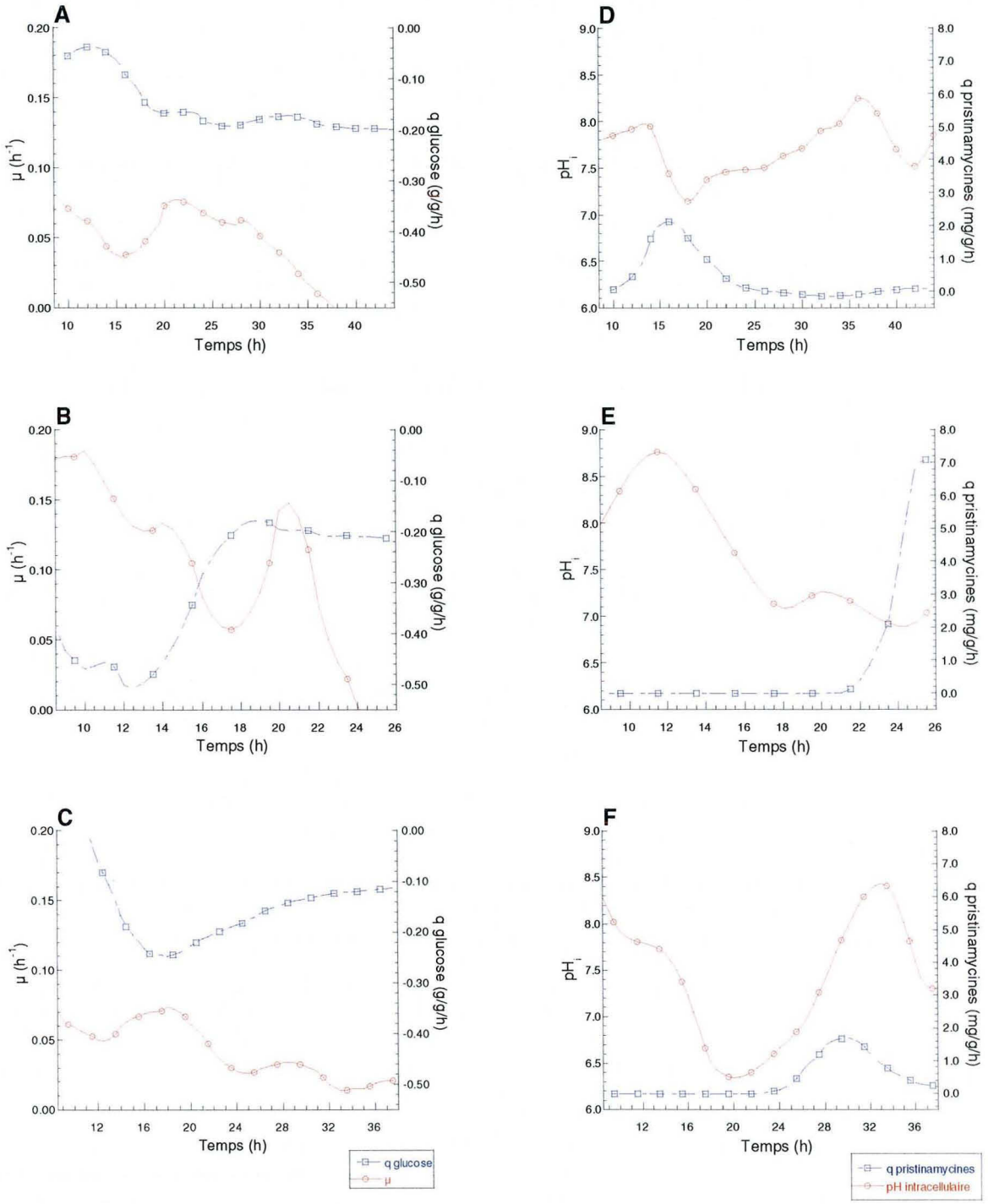


Figure V.2 : A, D : fermentation F1 ; B, E : fermentation F2 ; C, F : fermentation F3. A, B et C : vitesse spécifique de consommation du glucose et taux de croissance. D, E et F : vitesse spécifique de production des pristinamycines totales et pH intracellulaire.

Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, il a été rapporté que le pH_i d'une valeur initiale de 5,7 en début de fermentation discontinue à pH_e constant augmente jusque 6,8 en pleine phase exponentielle de croissance puis diminue jusque 5,6 lorsque la phase stationnaire est atteinte (Imai et Ohno, 1995). Un autre exemple d'évolution du pH_i en rapport avec la croissance en fermenteur à pH_e régulé est celui de *Corynebacterium glutamicum* : de 7,7 en

phase de latence il augmente jusque 8,3 en batch et fed-batch en pleine phase exponentielle (Leyval *et al.*, 1997). Dans ce dernier cas le ΔpH est relié au taux de croissance ; il est maximal alors que μ et le quotient métabolique du glucose sont maximals.

Dans les 3 cas en fin de culture, le pH_i remonte alors que les pristinamycines sont excrétées. Cette alcalinisation semble d'autant plus importante que la concentration de glucose résiduelle est grande. Un tel cas d'évolution du pH_i en relation avec un phénomène excrétoire a été obtenu chez *C. glutamicum* : une chute du pH_i de 8,3 à 7,7 est obtenue alors que l'excrétion de glutamate est déclenchée (Leyval *et al.*, 1997). A ce niveau peut être envisagée une relation plus ou moins directe du pH_i avec certains mécanismes permettant l'excrétion de métabolites.

V.3.3- Evolution du gradient de pH :

Durant ces cultures, le gradient de pH subit aussi d'importantes fluctuations qui sont essentiellement liées aux variations de pH_i car le pH_e ne varie au maximum que de 0,25 unités.

Le ΔpH reste positif tout au long de la culture tout comme chez les micro-organismes neutrophiles et acidophiles et il varie avec une amplitude d'environ 2 unités. De telles variations du gradient de pH sont importantes comparativement à celles de 0,8 unité observées chez *C. glutamicum* (Leyval *et al.*, 1997). Le ΔpH augmente en début de culture jusque 1,6, 2,0 et 2,1 unités pour F1, F2 et F3. Ce cas de figure est décrit comme favorable à l'entrée de nutriments (Imai et Ohno, 1995). Il diminue ensuite régulièrement à mesure que s'accumule la biomasse. Au moment où débute l'excrétion des pristinamycines, il n'est plus que de 0,5, 0,2 et 0,2 unités. Une des conséquences de cet abaissement du gradient de pH pourrait être une perturbation du gradient électrochimique et ou du potentiel de membrane qui serait susceptible de modifier la perméabilité membranaire en liaison avec des phénomènes d'excrétion et d'entrée de métabolites.

Dans le cas de F3, l'excrétion de pristinamycines est précédée par une période où le ΔpH devient nul puis négatif. De tels cas d'inversion du gradient de pH se rencontrent lorsque le pH_e varie pour atteindre un pH alcalin critique, où la cellule régule le pH_i à des valeurs inférieures au pH_e. Ce phénomène a été rapporté chez *Propionibacterium acnes* au delà de pH_i 7,4 (Futsaether *et al.*, 1993) et chez *E coli*, ce point d'inversion se situe à 7,6 (Padan *et al.*, 1981). Dans le cas de cellules de tumeurs d'ascites d'Ehrlich, l'ajout de glucose peut causer une diminution du pH_i et une inversion du ΔpH (Thomas *et al.*, 1979), mais ceci est

encore différent du cas observé ici puisque l'inversion n'a pas lieu en début de culture mais plutôt en fin, alors que la concentration de glucose est moindre. Pour ces cellules eucaryotes il est apparu que cette inversion était transitoire et faisait suite à une accumulation trop rapide de lactate qui débordait ses systèmes d'excrétion.

V.4- Acides organiques :

Préalablement à l'interprétation des résultats obtenus dans ce chapitre il est utile de préciser que le terme de production sera parfois employé. Cependant il serait plus exact de parler d'excrétion tout comme pour les pristinamycines. Sur les axes des représentations graphiques figurent les quotients métaboliques qui, lorsqu'ils seront positifs, seront assimilés à des vitesses spécifiques d'excrétions ; lorsqu'ils sont négatifs, ils sont assimilés à des vitesses spécifiques de consommation. Les conditions de dosage ne permettant pas la différenciation entre la forme acide et le sel correspondant, les deux qualificatifs seront indifféremment employés.

V.4.1- Le pyruvate

Les quantités de pyruvate dosées n'ont pu être correctement déterminées car l'analyse des chromatogrammes a révélé la présence d'un autre pic d'aire *quasi* constante et importante confondu avec celui du pyruvate. Au cours d'analyses complémentaires, l'identification de ce pic a pu avoir lieu et son origine a été assignée à la présence de malonate qui est un composant non métabolisé du milieu de culture MPS2 (Paquet, 1990). Pour les séries d'expériences ultérieures, le dosage du pyruvate se fera *via* une méthode enzymatique préférentiellement à des analyses chromatographiques.

V.4.2- L'oxalo-acétate :

Aucune présence de ce composé n'a pu être détectée tout au long des 3 cultures. Toutefois la stabilité de composé étant faible et les analyses ayant eu lieu quelques semaines après les fermentations, sa non production ne peut être affirmée de façon catégorique. En conséquence, son dosage sera effectué aussi rapidement que possible pour le reste des travaux.

V.4.3- Le malate :

La présence de malate n'a pu être observée qu'à un niveau très faible dans une seule culture (F3). La concentration maximale atteinte était d'environ 17 mg/L au bout de 32 h de culture. L'évolution des quantités de ce composé est telle que la concentration est plus grande entre 8 h et 16 h de culture ce qui correspond à une période de croissance active et au delà de 28 h de culture. En fin de fermentation sa présence pourrait être liée à un début de lyse cellulaire et de fuite vers le milieu extracellulaire.

La littérature ne fait état d'aucune trace de malate dans des surnageants de culture de *Streptomyces*.

V.4.4- L'acétate:

Des traces d'acétate ont pu être trouvées dans les surnageants allant de 87 à 91 mg/L en début de culture jusque 10 h puis lorsque les cellules commencent à se diviser activement sa présence n'est plus détectable. Son existence proviendrait des précultures ayant servi à inoculer les fermenteurs.

V.4.5- L'α-céto-glutarate (α-CG) :

L'α-CG est présent en quantités faibles durant toutes les cultures (Fig. V.3). Les maxima observés entre 10 et 14 h sont de 69, 86 et 93 mg/L pour F1, F2 et F3. Puis il est lentement dégradé ou plus vraisemblablement réassimilé.

Ces valeurs maximales correspondent aux points d'inflexions de la consommation d'oxygène. Ensuite, il y a diminution de la concentration, dans les 2-3 h suivant ces pics de concentrations, les vitesses spécifiques traduisent une consommation.

Etant donné les faibles concentrations extracellulaires d'α-CG les interprétations en relation avec le pH_i sont délicates. Toutefois de faibles concentrations extracellulaires n'impliquent pas forcément de faibles concentrations intracellulaires. Dans le cas de F1 et de F2 et moins nettement dans F3 la montée de pH_i en début de culture alors que la quantité de biomasse est faible est très nettement associée à l'observation des concentrations maximales d'α-CG dans le milieu extracellulaire. Il pourrait être supposé que cet α-CG excrété contribue à une alcalinisation du cytoplasme. Par contre les variations de fin de cultures ne peuvent être mises en relation avec ce composé car à ce moment la biomasse est importante.

Plusieurs origines hypothétiques de l'α-CG sont envisageables, à savoir le glutamate

et l'arginine (les deux sources d'azote du milieu), le glucose. Seulement il est difficile de favoriser une hypothèse dans la mesure où le dosage des acides aminés n'a pas été effectué.

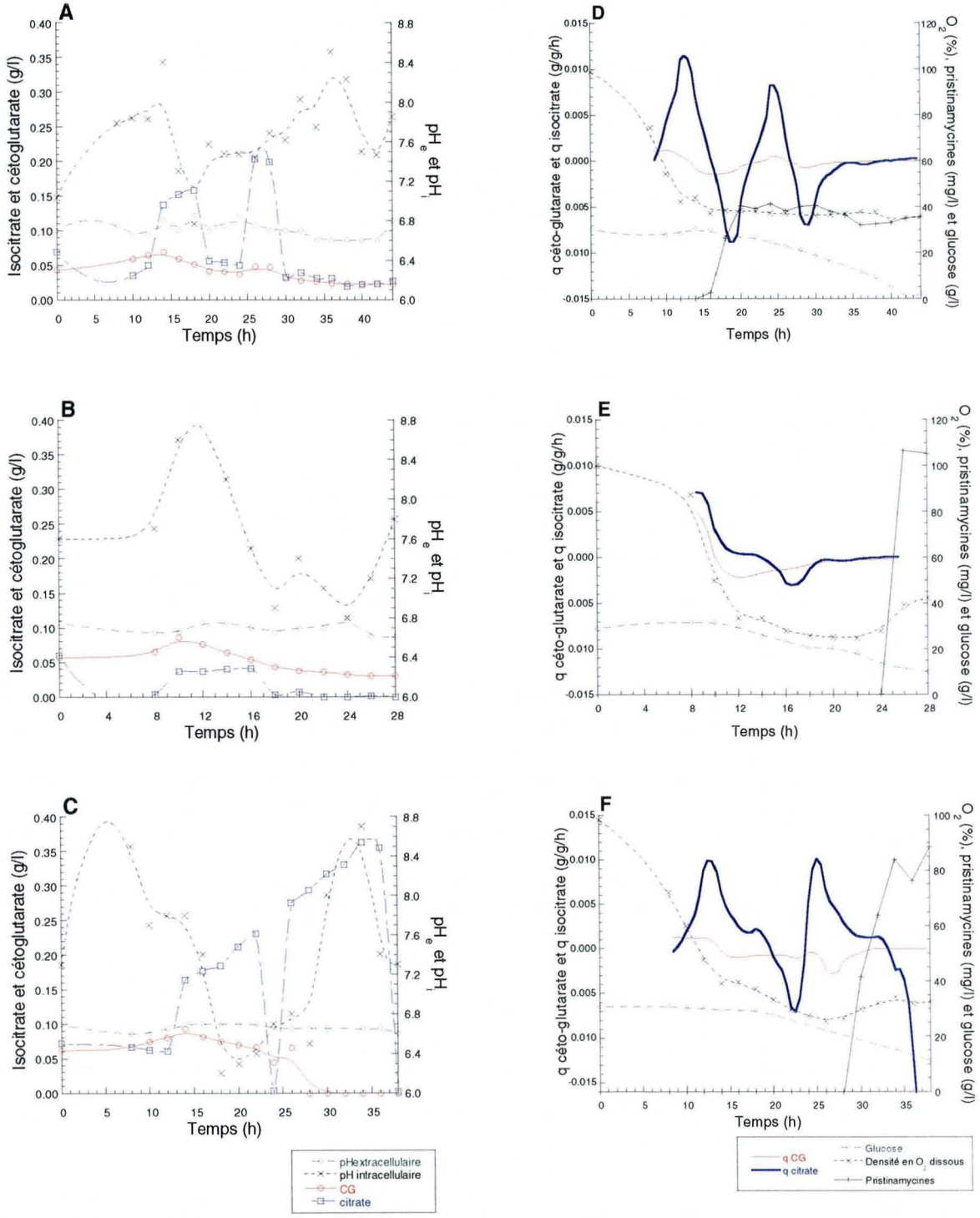


Figure V.3 : A, D : fermentation F1 ; B, E : fermentation F2 ; C, F : fermentation F3. A, B et C : pH extracellulaire, pH intracellulaire, α-céto-glutarate (CG), citrate. D, E et F : quotients métaboliques de l'α-CG et du citrate, glucose, densité en oxygène dissous et pristinamycines.

Les concentrations observées ici sont sans commune mesure avec les niveaux d'excrétion cités dans la littérature, jusque 0,9 g/L pour *S. lividans* (Madden *et al.*, 1996) et 1 g/L chez *S. venezuelae* (Ahmed *et al.*, 1984) qui entraînent de fortes chutes du pH_e. D'ordinaire sa présence est rapportée comme favorisée par la présence de glucose et d'une source d'azote rapidement assimilables (Ahmed *et al.*, 1984).

Il a même pu être établi une relation entre la perte progressive de l'activité α-CGDH avec une augmentation de son excrétion et une perte des capacités à le réassimiler associée à une non production d'anthracycline (Dekleva et Strohl, 1987). Dans le cas présent, les faibles activités α-CGDH en début de culture (chapitre III) conjointes aux activités relativement grandes de l'IDH et de la PEPc pourraient expliquer en partie ces traces d'α-CG. Cependant ces différences relatives d'activités qui augmentent au cours de la culture devraient contribuer à accroître les niveaux d'excrétion à moins que ces activités *in vitro* ne soient pas le reflet du métabolisme. Il est possible que les flux de carbone ne soient pas forcément dirigés vers la biosynthèse d'α-CG si le substrat de l'IDH est limitant.

V.4.6- L'isocitrate :

Le dosage de l'isocitrate ne permet pas la différenciation entre l'isocitrate et le citrate, aussi les résultats seront interprétés en tenant compte de ce fait.

La concentration en isocitrate subit d'importantes fluctuations pour les 3 cultures, dans le cas des fermentations 1 et 3 il est excrété jusque 210 et 370 mg/L tandis que pour F2 le maximum atteint n'est que de 60 mg/L. En fin de culture il semble qu'il soit complètement ou presque assimilé (Fig. V.3).

Lorsque les vitesses d'excrétion de l'isocitrate sont élevées, le pH_i augmente. Réciproquement lorsqu'il y a réassimilation ou diminution de la vitesse d'excrétion, le pH_i baisse. Toutefois ces observations ne peuvent expliquer entièrement les fluctuations de pH_i car dans le cas de F2 les amplitudes de variations du pH_i sont presque aussi importantes que pour les autres fermentations alors que la concentration maximale d'isocitrate est jusque 50 fois inférieure aux autres maxima.

Lorsqu'a lieu l'excrétion des pristinamycines les valeurs de q isocitrate sont quasiment nulles.

Le seul cas d'excrétion de citrate trouvé dans la littérature est celui de *S. venezuelae* qui produit jusque 110 mg/L d'isocitrate en association avec une excrétion d'α-CG et une perte de l'activité α-CGDH (Ahmed *et al.*, 1984). Si le composé dosé est plutôt du citrate que

de l'isocitrate les résultats obtenus pour les faibles niveaux d'α-CG pourraient en partie s'expliquer. Il y aurait dans ce cas des fuites de flux en amont de l'étape de déshydrogénation de l'isocitrate en α-CG.

V.4.7- Le lactate :

Le lactate n'apparaît qu'en fin de culture entre la 18 et la 24ème heure. Les concentrations maximales obtenues sont de 630, 370 et 460 mg/L pour F1, F2 et F3 (Fig. V.4).

Dans les 3 fermentations, les vitesses maximales d'excrétion sont observées alors que la vitesse de consommation du glucose est importante (supérieure à 0,1 g/g/h).

Cette constatation témoigne d'une moindre utilisation d'oxygène avec une oxydation incomplète du substrat glucose, et une accumulation de coenzyme(s) réduits. Une possibilité pour la cellule de réoxyder une partie de ces cofacteurs serait la réduction du pyruvate en lactate *via* la lactate déshydrogénase (LDH). Cette étape réactionnelle pourrait être favorisée par une activité PDH alors très faible et le pyruvate s'accumulant serait propice au déplacement de l'équilibre pyruvate-lactate vers la production et l'excrétion de lactate. Cette hypothèse ne peut être confirmée , l'activité LDH n'ayant été recherchée. Ces résultats sont en accord avec ceux de Thevelein *et al.* (1987) qui décrivent une acidification du milieu intracellulaire en cas d'anaérobiose.

Une des conséquences de cette hypothèse serait une perte de carbone pour la biosynthèse des pristinamycines. D'ailleurs, plus la quantité de lactate excrétée est grande, plus le titre final en antibiotique est faible. Cependant toute mise en relation directe du titre final en pristinamycines avec les quantités perdues de carbone donnant lieu à l'excrétion de lactate est délicate.

Enfin, le fait le plus marquant est la parfaite corrélation entre l'excrétion d'acide lactique et une remontée du pH_i. A ce niveau il peut être supposé qu'une accumulation de cet acide organique ait contribué à la phase d'acidification intracellulaire précédant cette remontée du pH_i. A ce moment, l'excrétion de lactate pourrait expliquer l'alcalinisation du milieu intracellulaire.

Chez certains eucaryotes, le rôle du lactate sur les perturbations du pH_i a été clairement démontré. Conséquemment à l'ajout de glucose, le pH_i diminue de 0,2 unité et le ΔpH devient négatif. L'analyse du contenu intracellulaire a révélé une montée transitoire de la teneur en lactate puis un retour à la normale pour le pH_i et la quantité de lactate (Thomas *et*

al., 1979). Les auteurs expliquent ces résultats par des réactions enzymatiques très rapides au niveau de la glycolyse qui déborderaient les systèmes d'excrétion du lactate.

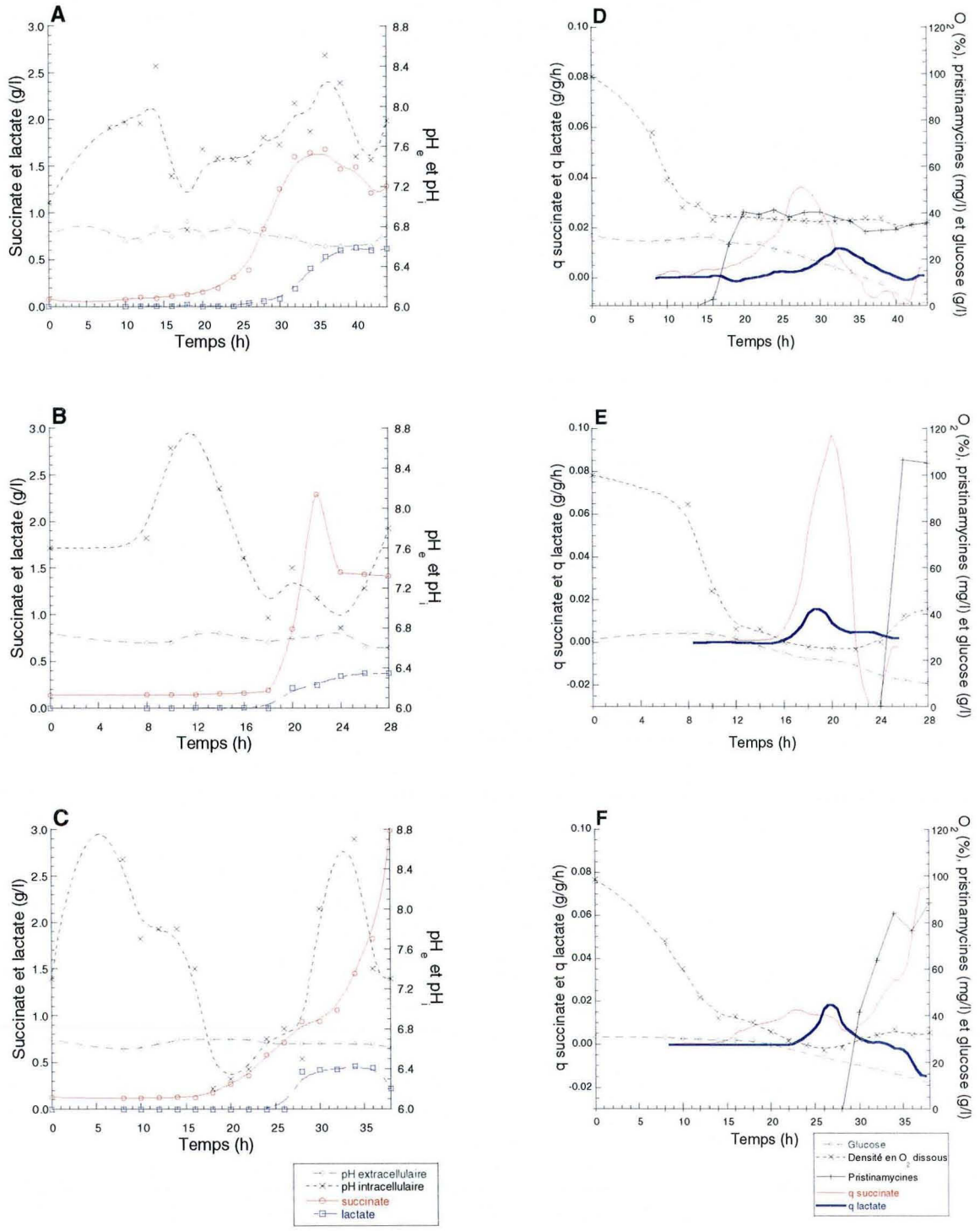


Figure V.4 : A, D : fermentation F1 ; B, E : fermentation F2 ; C, F : fermentation F3. A, B et C : pH extracellulaire, pH intracellulaire, succinate et lactate. D, E et F : quotients métaboliques du succinate et du lactate, glucose, teneur en oxygène dissous et pristinamycines.

Dans le cas présent se pose une question concernant la période durant laquelle est accumulé le lactate à l'intérieur des cellules. Existe-t-il une accumulation continue de ce composé préalablement à son excrétion ou est-il excrété de façon concomitante à sa synthèse ? Cette interrogation amène donc à une réflexion sur les moyens de transport du lactate vers le milieu extracellulaire. Un élément de réponse est qu'au moment où le pH_i est minimal et lorsque va avoir lieu l'excrétion de lactate, le gradient de pH tend à s'annuler. La difficulté est de savoir si un faible ΔpH est favorable à l'excrétion de lactate ou s'il n'est que la conséquence de l'accumulation de ce dernier.

V.4.8- Le succinate :

Ce composé se distingue par un niveau d'excrétion sans commune mesure avec ceux de tous les acides organiques dosés (Fig. V.4). Les maxima atteints sont très importants puisque de 1,69, 2,29 et 2,99 g/L pour F1, F2 et F3. De même que pour l'excrétion de lactate, une production massive de succinate a lieu en fin de fermentation.

A la différence du lactate, le succinate est présent en petites quantités dès le début de fermentation et reste d'un niveau constant jusque 16-20 heures de culture. L'excrétion de succinate précède celle du lactate. Mis à part le cas de F3, il semble qu'en fin de fermentation le succinate soit à nouveau métabolisé car sa concentration diminue et que les coefficients métaboliques du succinate deviennent négatifs.

Les résultats obtenus sont en accord avec la consommation de glucose car l'excrétion de grandes quantités de succinate est corrélée à de grandes vitesses spécifiques de consommation du glucose (0,15 à 0,2 g/g/h). Ces éléments pourraient indiquer l'établissement d'un métabolisme fermentaire.

Les grandes concentrations de succinate détectées soulèvent quelques interrogations. En premier lieu, quelles peuvent être les voies métaboliques menant à la synthèse de ce composé ?

Toujours dans cette logique de réoxydation des cofacteurs en cas de moindre utilisation de l'oxygène dissous, il peut être supposé qu'une autre possibilité de régénérer le stock de NAD^+ se ferait en empruntant la branche oxydatrice du TCA (métabolisme fermentaire) : conversion de l'oxalo-acétate en succinate *via* le malate et le fumarate suite à l'action de la malate déshydrogénase, la fumarase et la succinate déshydrogénase. Cette hypothèse est à considérer avec prudence car elle fait intervenir un nombre important d'enzymes dont les activités n'ont pas été dosées. Dans le cas de *S. aureofaciens* avait été

mise en évidence une activité MDH très forte qui augmente au cours de la fermentation, ainsi qu'une activité fumarase supérieure à l'activité IDH (Hostalek *et al.*, 1969). Les auteurs ne s'expliquaient pas une telle activité de la MDH mais supposaient que cette augmentation d'activité devait se traduire par une grande formation d'oxalo-acétate évacuée sous forme de pyruvate. Cependant, aucun dosage d'acides organiques n'avait été effectué. Un autre élément de réponse est que des extraits bruts intracellulaires de *S. aureofaciens* ayant servi au dosage de l'activité PEPc permettaient aussi la biosynthèse de malate en présence de NADH et que l'ajout de malate ne modifiait en rien l'activité PEPc. (Vorisek *et al.*, 1968).

Par ailleurs, les études enzymatiques effectuées avaient révélé de très faibles activités α-CGDH et IL. S'il est considéré que les délais entre l'accumulation intracellulaire du succinate et son excrétion ne sont pas très longs, il est probable que sur cette période l'activité α-CGDH soit relativement faible. Or une activité α-CGDH de l'ordre de la mUE en considérant la teneur protéique à 50 % de la biomasse ne permet qu'un $q_{succinate}$ de 3,5 mg/g/h (calcul théorique) alors que l'excrétion a lieu jusque 80 mg/g/h. Par ailleurs, le glutamate est l'acide aminé intracellulaire majoritaire. Ces deux constatations peuvent suggérer de faibles synthèses de succinyl-CoA et succinate à partir d'α-CG. Enfin la grande activité PEPc *in vitro* peut amener à émettre l'hypothèse sur la biosynthèse de grandes quantités d'oxalo-acétate qui ne sont pourtant pas retrouvées au niveau extracellulaire. L'absence de ce composé pourrait être due à des transformations enzymatiques non étudiées menant à la formation de succinate.

La phase d'accélération de q succinate coïncide avec les minima de pH_i. Dans les 3 cultures, l'excrétion semble associée à une remontée de pH_i et sa vitesse spécifique de production augmente aussi alors que les gradients de pH sont faibles. Comme pour le lactate (hormis le cas de F1), l'observation d'un pic de q succinate précède le début d'excrétion des pristinamycines. L'augmentation de ce quotient métabolique pourrait en quelque sorte rendre compte d'un début de changements métaboliques s'opérant au niveau intracellulaire.

Une autre question soulevée par ces titres de succinate élevés et valable aussi pour le lactate est la *quasi* non incidence sur le pH_e. Tamponné par ajout de MOPS le pH du milieu évolue peu, or l'ajout de 3,4 g/L d'acide succinique dans du milieu MPS2 provoque la diminution du pH de 6,9 à 5,5. *A priori* l'ordre de grandeur des concentrations trouvées indiquerait que ces acides organiques soient pour partie excrétés sous forme anionique à moins que ne soient excrétées en même temps de grandes quantités de bases. S'il s'agit de la forme ionique, le transport de ces acides organiques devrait faire intervenir des systèmes de transports actifs.

V.5- Conclusions :

Au cours de cette série de fermentations, différents éléments intéressants ont pu être mis à jour. Tout d'abord le pH_i de *S. pristinaespiralis* subit d'importantes variations comme cela a pu être décrit pour *C. glutamicum* (Leyval *et al.*, 1997). Ce fait est intéressant car il montre que ce paramètre varie au cours du temps au sein d'une population de cellules en fonction de leur état physiologique. Il peut même y avoir des différences de pH_i au sein du cytoplasme d'une même cellule comme cela a été décrit chez *Endomyces magnusii* où il est de 7,0-7,2 au centre alors que de 5,9-6,3 en périphérie (Slavik, 1983).

En fermenteur discontinu, il semble que le pH_i alcalin ne soit pas uniquement corrélé à des μ importants contrairement à *C. glutamicum* (Leyval *et al.*, 1997) mais qu'il soit aussi en rapport avec des phénomènes d'excrétion de pristinamycines. Il peut être intéressant de rappeler que les P_I sont d'excellents protonophores et que leur excrétion pourrait aussi contribuer à une diminution de la teneur en H^+ cytoplasmique (*Cf.* revue bibliographique). De fortes valeurs de pH_i pourraient contribuer à protéger les cellules, dans la mesure où les pristinamycines sont très insolubles à de tels pH et qu'elles sont même chimiquement instables.

L'analyse des surnageants a révélé la présence en faibles concentrations de nombreux acides organiques, autres que le pyruvate et l'α-CG, qui explique en partie certaines variations de pH_i. Par contre, la présence de grandes concentrations en succinate et en lactate, associées à de faibles concentrations en oxygène dissous a été détectée. Ces excrétions de lactate et de succinate sont aussi en rapport avec l'excrétion de pristinamycines et les fluctuations de pH_i allant de paire.

Le manque d'informations concernant le contenu intracellulaire rend hasardeuse toute interprétation définitive, et prématurée toute modélisation de l'évolution du pH_i. De plus, la discussion des résultats ne tient pas compte des constantes de dissociation des espèces acides qui peuvent elles même varier en fonction de l'environnement. De nombreux travaux sur le pH_i bactérien ont été consacrés à l'influence de variations du pH_e sur le pH_i, par conséquent peu de données existent en conditions de pH_e constant.

Alors que le pH_i peut être considéré comme indicateur de mort cellulaire lorsqu'acide pour les fibroblastes et les lymphocytes (Franck *et al.*, 1996) ou comme moyen de prédiction de la bonne fermentabilité des moûts par *S. cerevisiae* (Imai et Ohno, 1995), il pourrait être regardé ici comme révélateur du changement de métabolisme de *S. pristinaespiralis*. Enfin, l'absence de données sur le pH_i du genre *Streptomyces* donne un aspect inédit à cette étude.

Chapitre 6

Résultats: Cultures en réacteurs continus

Cultures en bioréacteurs continus :

VI.1- Introduction : 138

VI.2- Conditions de reproductibilité et erreurs expérimentales : 138

VI.3- Biomasse : 139

VI.4-Taux de croissance : 140

VI.5- Consommation du glucose en fonction du taux de dilution : 141

VI.6- Production de pristinamycines : 145

VI.7- Potentiel d'oxydo-réduction : 146

VI.8- Excrétion d'acides organiques : 147

VI.9- Activités enzymatiques en fonction du taux de croissance : 150

VI.9.1- G6PDH : 151

VI.9.2- La PFK : 151

VI.9.3- La PEPc : 152

VI.9.4- La PDH : 152

VI.9.5- L'IDH : 153

VI.9.6- L'α-CGDH : 153

VI.10- Influence du taux de croissance sur le pH_i : 153

VI.11- Conclusions : 155

VI.1- Introduction :

L'étude de certaines activités enzymatiques du métabolisme central (*Cf.* chapitre III) a révélé des changements d'activités de toutes les enzymes dosées *in vitro* lors du déclenchement de la production des pristinamycines.

Par ailleurs, des variations du pH_i en relation avec l'excrétion d'acides organiques et de pristinamycines et avec certains paramètres de la croissance microbienne ont été observées. Reste à savoir dans quelle mesure ces phénomènes peuvent interférer avec l'évolution de l'équipement enzymatique de *S. pristinaespiralis*.

L'objectif du travail effectué consiste à « stabiliser » des cultures, autant que faire se peut, autour de différents μ encadrant la production de pristinamycines et d'étudier : les mêmes activités enzymatiques qu'en fermenteurs discontinus (à l'exception de l'IL), le pH_i, ainsi que certains acides organiques excrétés. Il a été choisi de ne pas doser l'IL car l'activité de cette dernière est très faible et compte tenu de l'erreur expérimentale et des faibles variations enregistrées, son étude apporterait peu d'informations. Au cours de cette étude, 5 taux de dilution différents (0,02, 0,04, 0,07, 0,10 et 0,14 h^{-1}) ont été appliqués.

VI.2- Conditions de reproductibilité et erreurs expérimentales :

Afin de limiter la pression de sélection due en grande partie chez les *Streptomyces* à l'instabilité génétique, chaque fermentation pour un taux de dilution donné, s'est faite à partir d'un nouvel *inoculum*.

Pour chaque taux de dilution, les prélèvements pour les dosages enzymatiques et les mesures de pH_i ont été effectués à 3 reprises ou (2 dans le cas du taux de dilution à 0,10 h^{-1}) à des périodes comprises entre 5 et 7 temps de passage.

Chaque essai enzymatique a été répété deux, voire trois fois (quand les valeurs des mesures étaient trop différentes l'une de l'autre). Les résultats sont exprimés comme la moyenne des moyennes des essais, pour les trois prélèvements. Les barres d'erreur représentent les bornes extrêmes des mesures moyennes pour les trois prélèvements.

Pour la détermination du pH_i, 30 couples d'images ont été analysés lors de chaque prélèvement et les barres d'erreur ont la même signification que celles des tests enzymatiques.

VI.3- Biomasse :

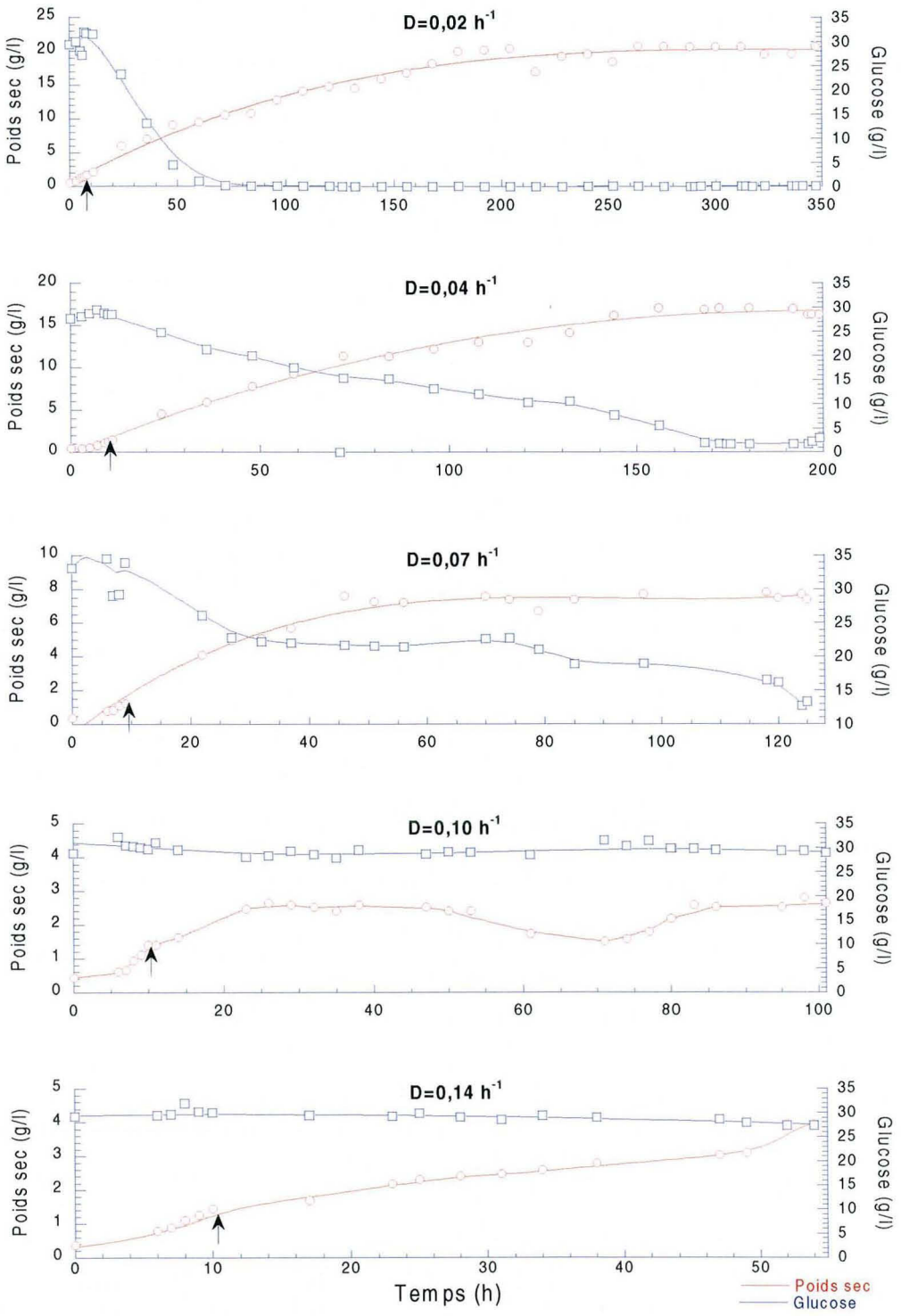


Figure VI.1 : Evolution de la biomasse et du glucose au cours de fermentations continues à différents taux de dilutions. Les flèches représentent le déclenchement de l'alimentation et du soutirage.

Dans l'ensemble la biomasse était relativement stabilisée pour les différents taux de dilutions imposés, mise à part la fermentation à D=0,14 h^{-1} pour laquelle une légère reprise de

croissance a eu lieu au moment des derniers prélèvements (Fig. VI.1). La petite baisse de biomasse enregistrée pour le fermenteur continu à D=0,10 h^{-1} s'explique par le polypropylène glycol (inhibiteur de la formation de mousse) qui a été ajouté en quantité insuffisante ; les cellules de *Streptomyces* se sont concentrées dans la mousse soutirée.

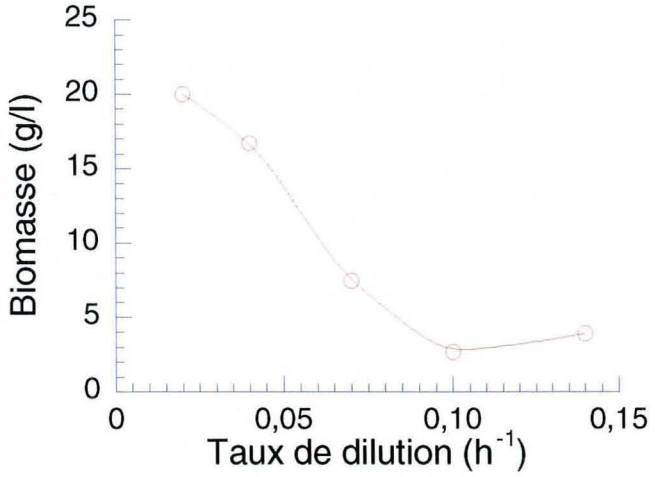


Figure n°VI.2 : Biomasse finale mesurée pour les différents taux de dilution après 5 temps de passage.

Au cours des différentes fermentations, la concentration de biomasse mesurée à l'état "pseudo" stabilisé diminue à mesure que le taux de dilution augmente (Fig. VI.2).

James et ses collaborateurs (1991) ont aussi observé une biomasse qui diminue pour des taux de dilution croissants et expliquent ces résultats par la croissance sous forme d'hyphes mycéliens de *S. thermoviolaceus*.

Dans le cas de *S. pristinaespiralis*, aucune différence morphologique notable n'a pu être mise en évidence entre les différents taux de dilution, les conditions expérimentales d'agitation (1160 tr/min) très fortes imposant des contraintes de cisaillement drastiques.

Une explication serait que pour les grands D, le temps de contact entre les cellules et certains nutriments soient trop brefs pour permettre l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance.

VI.4-Taux de croissance :

Lorsque les cellules ont un taux de croissance proche de μ_{max} (> 0,20 h^{-1}) les conditions de cultures continues sont initialisées. Le μ diminue jusqu'à se stabiliser autour de valeurs proches de celles imposées par le taux de dilution (Fig. VI.3).

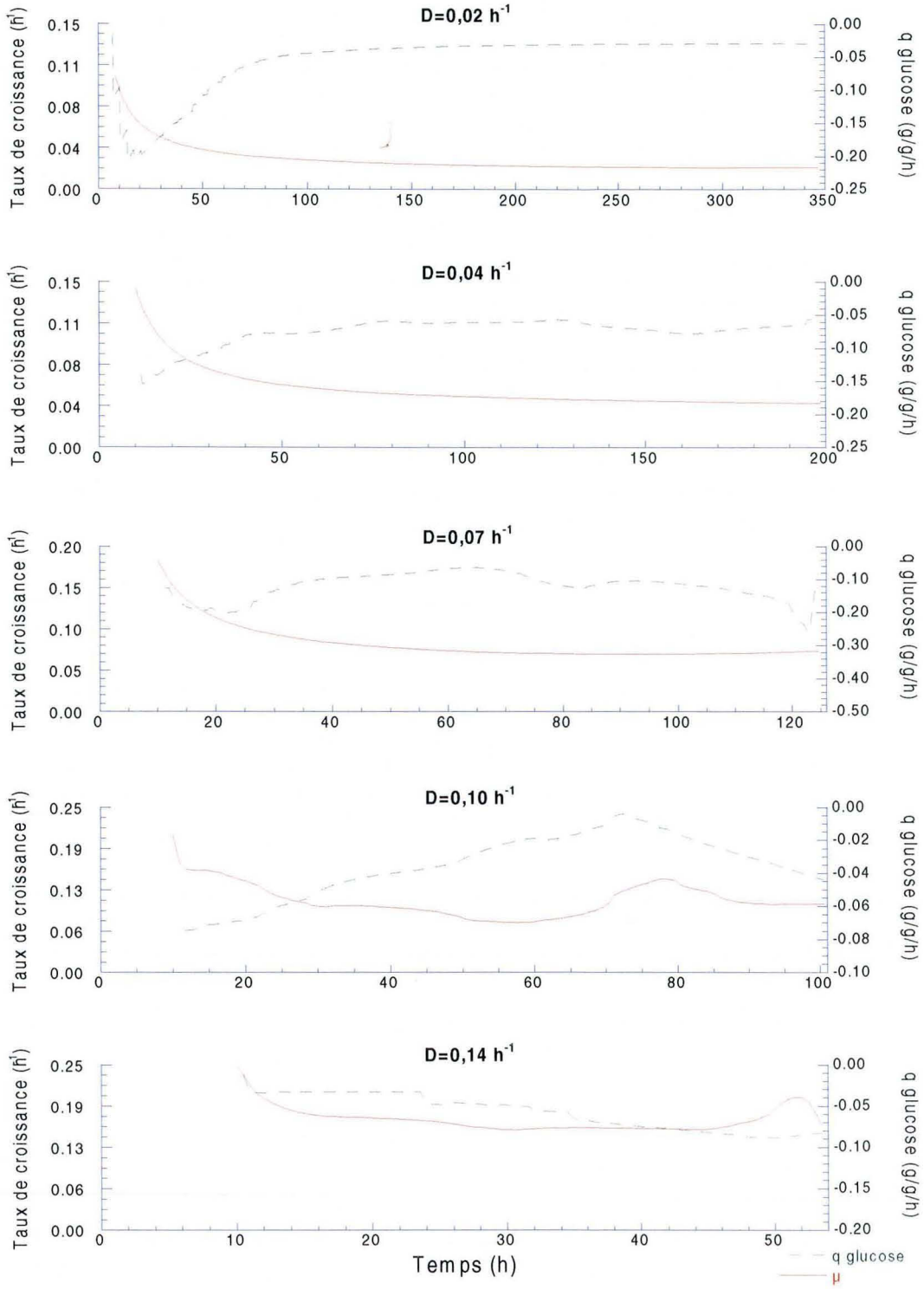


Figure VI.3 : Taux de croissance et quotient métabolique du glucose instantanés en cultures continues pour différents taux de dilutions.

VI.5- Consommation du glucose en fonction du taux de dilution :

La quantité de glucose résiduelle augmente avec le taux de dilution (Tab. VI.1). Dans le cas du fermenteur à D=0,02 h^{-1}, le glucose pourrait être limitant (q glucose # taux de

dilution) car la concentration résiduelle est quasiment nulle.

D (h^{-1})	Concentration résiduelle de glucose (g/L)	q glucose (g/g/h)	$Y_{X/Glucose}$ (g/g)
0,14	28,5	0,05	2,8
0,10	29,2	0,03	3,3
0,07	13	0,16	0,44
0,04	2	0,07	0,57
0,02	0,1	0,03	0,67

Tableau VI.1 : Concentration, vitesses de consommation volumique et spécifique du glucose et rendement biomasse-glucose à l'état pseudo stabilisé (après 5 temps de passage) pour différents taux de dilution.

La vitesse spécifique de consommation du glucose diminue parallèlement au taux de dilution entre 0,07 et 0,02 h^{-1}. Elle est très faible pour les D de 0,14 et 0,10 h^{-1} et les rendements $Y_{X/glucose}$ très grands. Bien que la vitesse spécifique de consommation du glucose soit faible et que la concentration résiduelle soit grande pour ces D, de telles concentrations de biomasse (2,7 et 3,9 g/L) sont forcément rendues possibles par l'assimilation d'une source énergétique et carbonée autre.

Une explication serait que les acides aminés du milieu (glutamate et arginine) jouent le rôle de source d'azote et de carbone en complément du glucose. Cependant, le dosage de ces acides aminés n'a pas été effectué. Si cette hypothèse est vérifiée, une contribution majoritaire du squelette carboné des acides aminés pour de grands D (suite à une répression du catabolisme du glucose par un métabolite de dégradation des acides aminés) est envisageable.

Si la formule brute chimique bactérienne générale $C_5H_7O_2N$ est considérée et que l'on admet qu'environ 50 % du carbone métabolisé se retrouve sous forme cellulaire (50 % de CO_2 dissipé), le calcul de l'apport carboné par les acides aminés sous forme α-CG et le peu de glucose consommé peut justifier les biomasses observées pour les grands D. Dans le cas de D= 0,1 h^{-1}, les 0,8 g/L de glucose consommés ne permettraient qu'une concentration de biomasse de 0,32 g/L, or le poids sec est de 2,7 g/L. Aux concentrations du milieu MPS2, le glutamate apporte 1,86 g/L de carbone et l'arginine 1,24 g/L ; leur seule contribution permet d'obtenir une biomasse de 2,9 g/L.

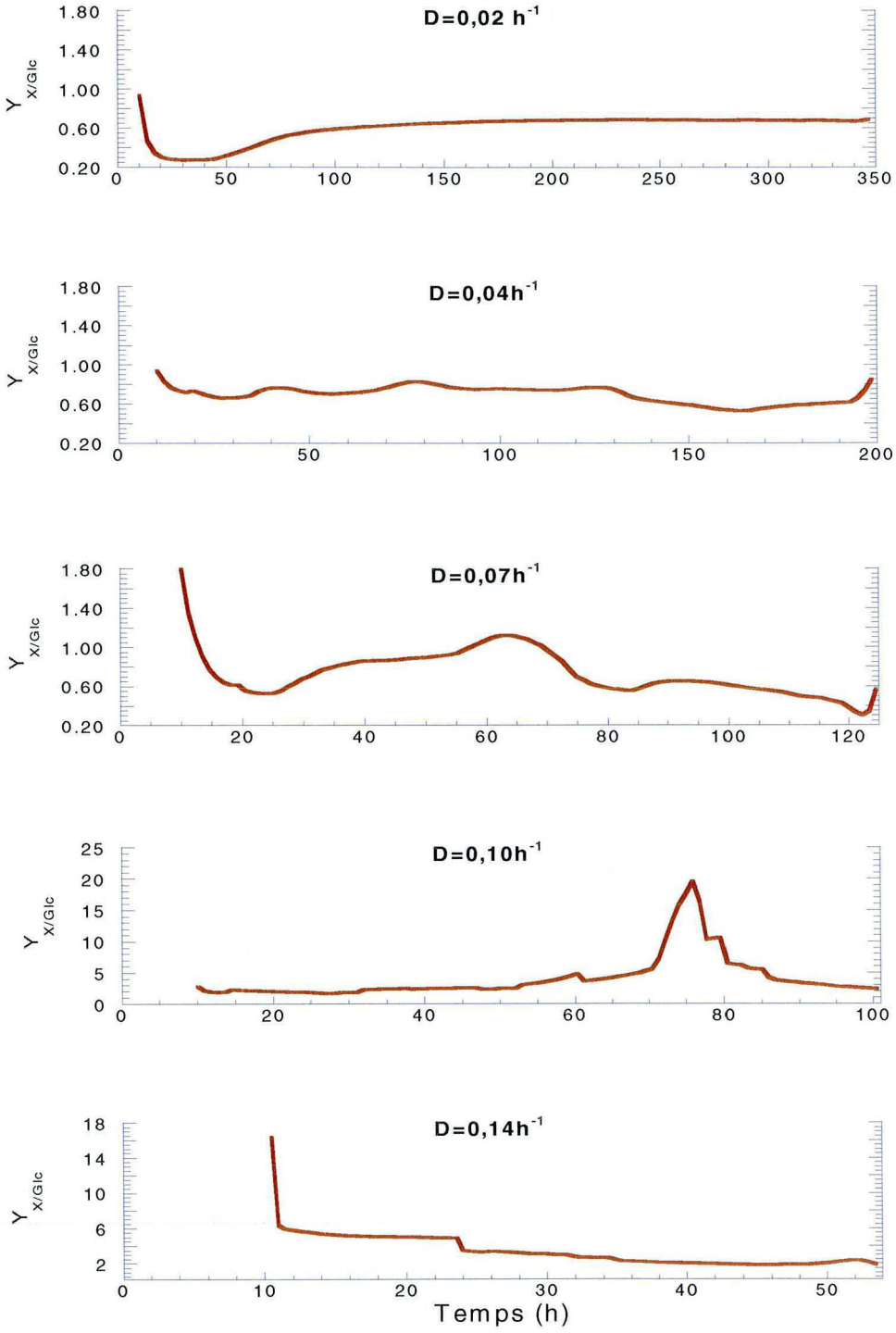


Figure VI.4 : Rendements instantanés de biomasse formée-glucose consommé (g/g) pour différents taux de dilutions.

Pour des biomasses supérieures à 2,9 g/L, le glucose devrait être obligatoirement métabolisé. L'examen des vitesses spécifiques instantanées de consommation du glucose (Fig. VI.3) avec celui de l'évolution de biomasse (Fig. VI.1) montre que le glucose est consommé avant que la biomasse n'atteigne 2,9 g/L. Pour atteindre cette biomasse il y a donc

consommation simultanée du glucose et du squelette des acides aminés.

L'alimentation est déclenchée avant que la biomasse de 2,9 g/L ne soit atteinte et les durées requises pour atteindre ce poids sec sont nettement plus courtes pour les D de 0,02 à 0,07 h^{-1} (entre 13 et 17 h), comparativement à D=0,14 h^{-1} (43 h). Pour D=0,10 h^{-1}, cette concentration de biomasse n'est jamais observée et il faut 17 h pour atteindre 1,9 g/L. Ce phénomène n'est pas uniquement lié aux grandes dilutions, car au moment où le poids sec est de 2,9 g/L, les q glucose instantanés sont de 0,14 à 0,18 g/g/h pour les D de 0,02 à 0,07 h^{-1} ; tandis que de 0,04-0,08 g/g/h pour les D de 0,10 et 0,14 h^{-1}. Les grands D sont apparemment défavorables à des q glucose permettant la synthèse de biomasse.

En reprenant les mêmes chiffres que dans le cas du calcul de biomasse permise par le glucose consommé, théoriquement $Y_{X/glc}$ maximal est de 0,38 g/g. Or l'examen des $Y_{X/glc}$ instantanés (Fig. VI.4) montre que ceux ci sont supérieurs à ce $Y_{X/glc}$ théorique maximal. Ceci confirme le catabolisme du squelette des acides aminés qui constitue une grande proportion du carbone métabolisé ($Y_{X/glc} > Y_{X/glc}$ max). Ce catabolisme préférentiel est instauré dès les premières heures de mise en culture des cellules. Suivant le taux de dilution appliqué, ce phénomène est plus ou moins long. Pour les D de 0,02 à 0,07 h^{-1}, $Y_{X/glc}$ diminue rapidement et se stabilise vers 0,6 g/g tandis que toujours supérieur à 2 g/g pour les D de 0,10 et 0,14 h^{-1}.

Comparativement aux biomasses obtenues en bioréacteurs continus pour des μ de 0,02 h^{-1} par Paquet (1990), les poids secs obtenus sont doublés. Les conditions d'aération n'étaient que de 1 VVM, tandis que de 3,3 VVM (O_2 non limitant) dans le cas présent.

Par rapport à une formule brute chimique bactérienne générale $C_5H_7O_2N$, les valeurs de 20 et 16,7 g/L (D de 0,02 et 0,04 h^{-1}) sont trop élevées car la composition en azote du milieu MPS2 n'autorise au mieux qu'une biomasse de 9,25 g/L si tout l'azote est dédié à l'anabolisme. Lorsque la biomasse dépasse 9,25 g/L pour les D de 0,02 et 0,04 h^{-1}, il se produit un changement de la composition de la formule brute de ces cellules avec un rapport C/N accru et une déficience en azote. A l'état pseudo stabilisé, la teneur en azote ne serait plus que de 5,6 et 6,6 % pour les cellules cultivées à des D de 0,02 et 0,04 h^{-1}, alors que de 12 % pour des cellules normalement constituées.

Des mises en réserve de composés hydrocarbonés tels que le tréhalose et le glycogène peuvent être envisagées. Ces composés sont les principales formes de mise en réserve lorsque l'azote est l'élément limitant pour la croissance. Ils peuvent représenter jusque 20% de la biomasse pour le genre *Streptomyces* (Ranade et Vining, 1993 ; Brana *et al.*, 1982 et 1986). De telles accumulations de biomasse seraient alors rendues possible par la concentration de glucose de 30 g/L.

VI.6- Production de pristinamycines :

Pour tous les taux de dilutions appliqués, il a pu être observé une production de pristinamycines (Fig. VI.5) de nature cyclique, même pour les fortes valeurs de D (0,10 et 0,14 h^{-1}). L'interprétation des résultats est complexe car les conditions d'état stationnaire pour le métabolisme secondaire ne sont pas maintenues.

Les titres maximaux de pristinamycines mesurés sont plus faibles pour les grands taux de dilution (Tab. VI.2). Lorsque plusieurs pics d'excrétion sont observés, l'intervalle de temps entre ces maxima est d'environ 50 heures, quel que soit le taux de dilution imposé. Ce phénomène cyclique est dû au fait que les pristinamycines exercent une répression sur leur propre biosynthèse (Cans, 1987 ; Paquet, 1990). Lorsque l'excrétion est telle qu'il y a répression, la synthèse de pristinamycines n'a plus lieu et la concentration diminue conséquemment à une dégradation, un soutirage et une alimentation continus.

La dégradation des pristinamycines est évidente car les vitesses de disparition des pristinamycines dans les fermenteurs sont supérieures au débit de soutirage. En admettant que la vitesse de production est nulle après que le titre maximal ait été atteint, dans le cas du fermenteur à D=0,02 h^{-1} entre 48 et 72 heures, le titre aurait dû passer de 78,2 à 48,4 mg/L si la diminution de la concentration est uniquement due à un effet de dilution. Le titre résiduel de 31 mg/L montre l'ampleur de la dégradation des pristinamycines.

D (h^{-1})	Nombre de cycles de production de pristinamycines	Titre maximal de pristinamycines (mg/L)
0,14	1	12
0,10	1	8
0,07	3	37
0,04	5	30
0,02	8	148

Tableau VI.2 : Récapitulatif de la production de pristinamycines en fermenteurs continus.

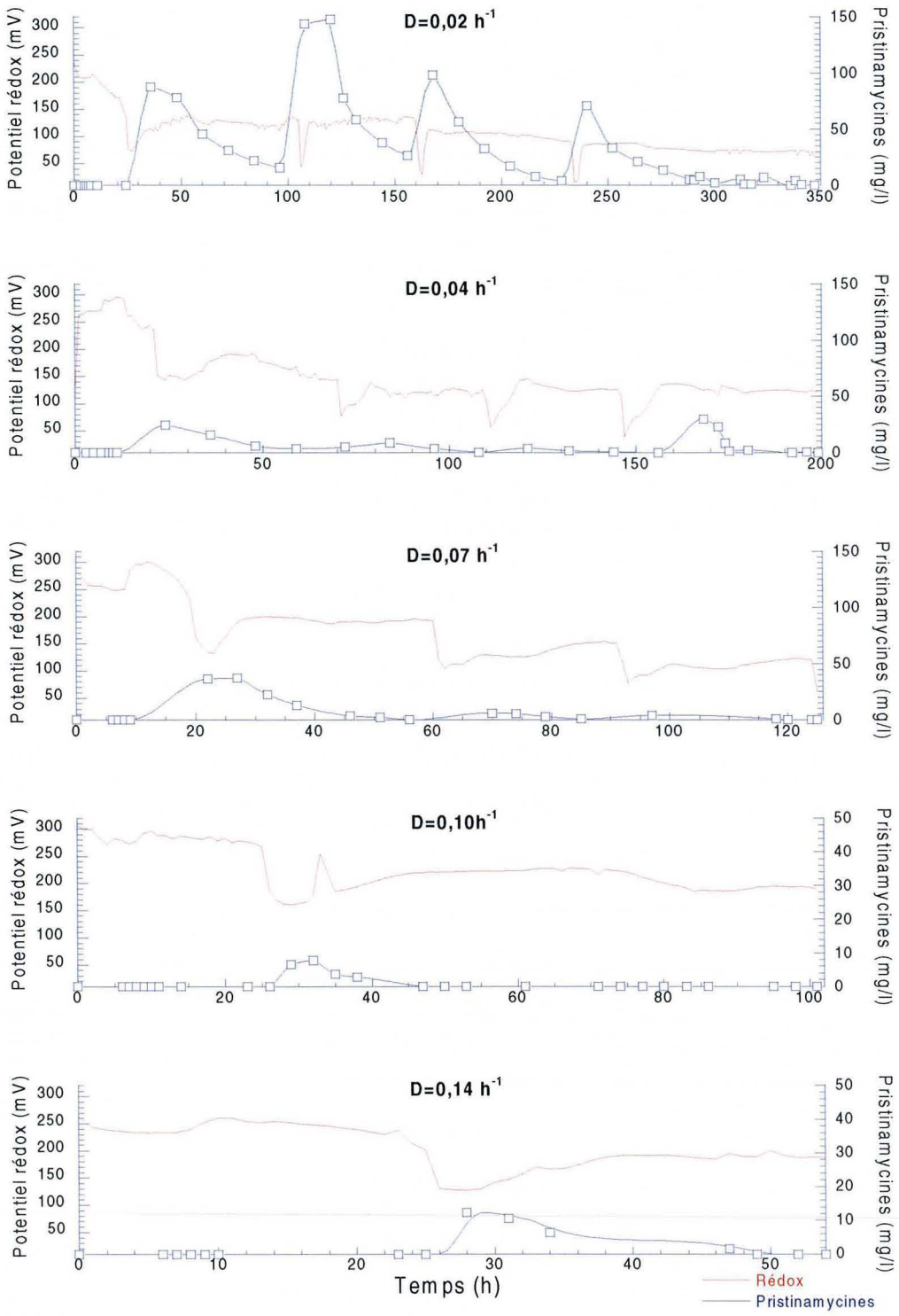


Figure VI.5 : Evolution de la production de pristinamycines et du potentiel rédox au cours de fermentations continues à différents taux de dilutions.

VI.7- Potentiel d'oxydo-réduction :

Pour cette série de fermentations le potentiel rédox (en mV) a été suivi en ligne (Fig.

VI.5). Ce paramètre est proportionnel au Log du rapport des concentrations des espèces réductrices par les espèces oxydantes et il est censé rendre compte de variations de composition du milieu dans le bioréacteur suite aux excrétions et consommations de composés.

En début de culture, il subit une baisse continue traduisant un début de croissance bactérienne vraisemblablement reliée à la consommation d'oxygène pour l'oxydation des substrats. Cependant, la mise en relation directe de ces deux paramètres est difficile car les relevés d'oxygène dissous ont été rendus impossibles à faibles D du fait d'un colmatage de la membrane de la sonde à O_2.

Le potentiel rédox est parfaitement corrélé à la production de pristinamycines car il diminue brusquement lors du déclenchement de l'excrétion des pristinamycines. Dans le cas du premier cycle de production, en début de culture, cette diminution résulte à la fois d'un métabolisme actif (consommation d'O_2 avec accroissement de la biomasse, consommation, production de métabolites) et du changement physiologique qui s'opère. Les chutes de potentiel rédox ne sont pas la conséquence de l'excrétion des pristinamycines dans le milieu car suite au début de détection des pristinamycines, le potentiel rédox augmente à nouveau jusqu'à son niveau initial (avant excrétion) alors que le titre maximal n'est pas encore atteint. En fin de fermentation, le potentiel rédox se stabilise et il est plus grand pour les D importants (Tab. VI.3).

D (h^{-1})	Potentiel rédox (mV) à l'état stabilisé
0,14	190
0,10	185
0,07	120
0,04	120
0,02	70

Tableau VI.3 : Potentiel rédox (+/- 10 %) pour les différents taux de dilutions, mesurés après 5 temps de passage.

VI.8- Excrétion d'acides organiques :

Des calculs de vitesses d'excrétion spécifiques ont été effectués sur la période où ont été effectués les prélèvements pour les mesures d'activités enzymatiques et de pH_i (Fig. VI.7,

fonction du taux de dilution est cohérente avec les rendements biomasse-glucose calculés puisque les rendements sont meilleurs pour de plus faibles vitesses d'excrétion de métabolites.

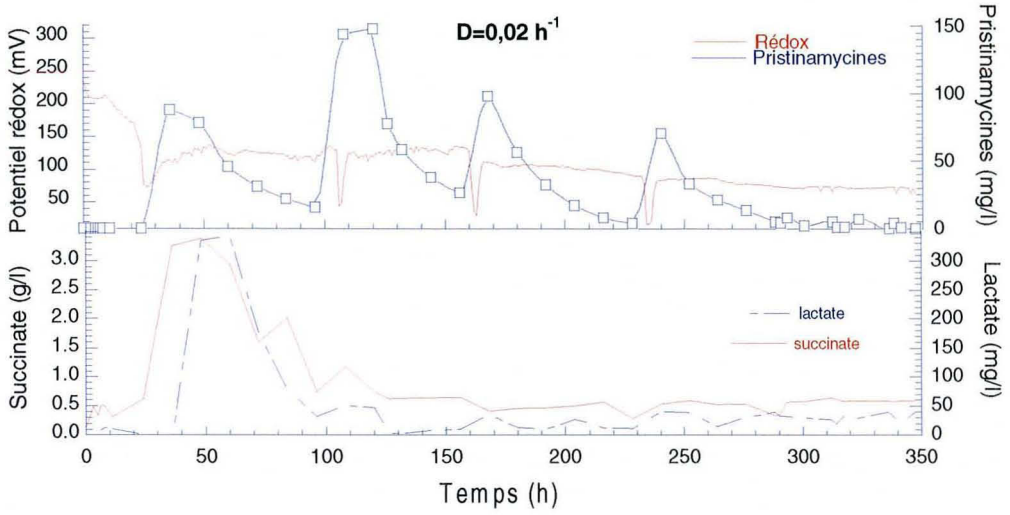


Figure VI.6: Excrétions de succinate et de lactate en relation avec la production de pristinamycines et le potentiel rédox.

Avant d'atteindre les états stationnaires, de fortes concentrations en succinate et lactate sont dosées dans les surnageants du continu à D=0,02 h^{-1} (Fig VI.6). Ces phénomènes excrétoires sont corrélés à la production de pristinamycines et confortent les résultats trouvés au chapitre V. Comme pour les fermentations discontinues, aucune trace de malate à l'état stabilisé n'a pu être décelée.

Les excrétions des différents acides organiques dosés sont faibles à l'état stationnaire tant par leur vitesses spécifiques que par leur concentration (Tab. VI.4 et Fig. VI.7, VI.8 et VI.9).

D	PEP	Iso	OA	CG	malate	pyruvate	succinate	lactate	fumarate	acétate
0,02	0	19	0	0,0	0	2	1	32	0,7	0
0,04	6,1	38	0	468	0	144	160	6,9	2,1	63
0,07	0	37	55	96	0	34	185	1,1	3,1	49
0,10	1,0	83	0	76	0	197	0	4,2	1,4	25
0,14	0,4	0	0	25	0	0	62	0	0,4	65

Tableau VI.4 : Concentrations des acides organiques en mg/L à l'état pseudo stabilisé après 5 temps de passage pour différents taux de dilution.

Le dosage enzymatique du pyruvate a permis de mettre en évidence sa présence et il semble être excrété plus rapidement lorsque la croissance est rapide (Fig. VI.7).

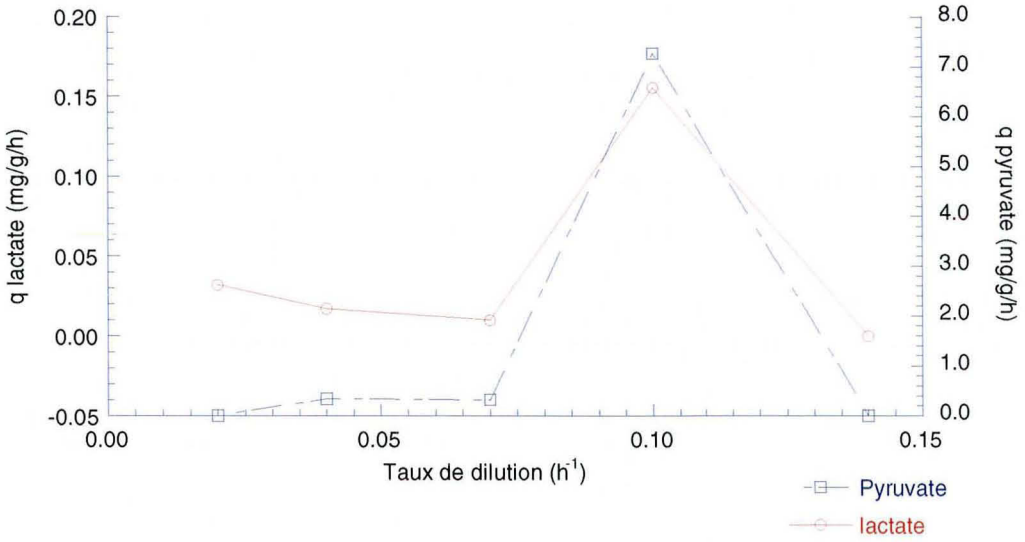


Figure VI.7 : Quotients métaboliques du lactate et du pyruvate après 5 temps de passage en fonction du taux de dilution.

Le lactate est aussi excrété lentement mais plus fortement vers les faibles taux de dilution à l'exception de la culture à 0,1 h^{-1} de taux de dilution (Fig. VI.7).

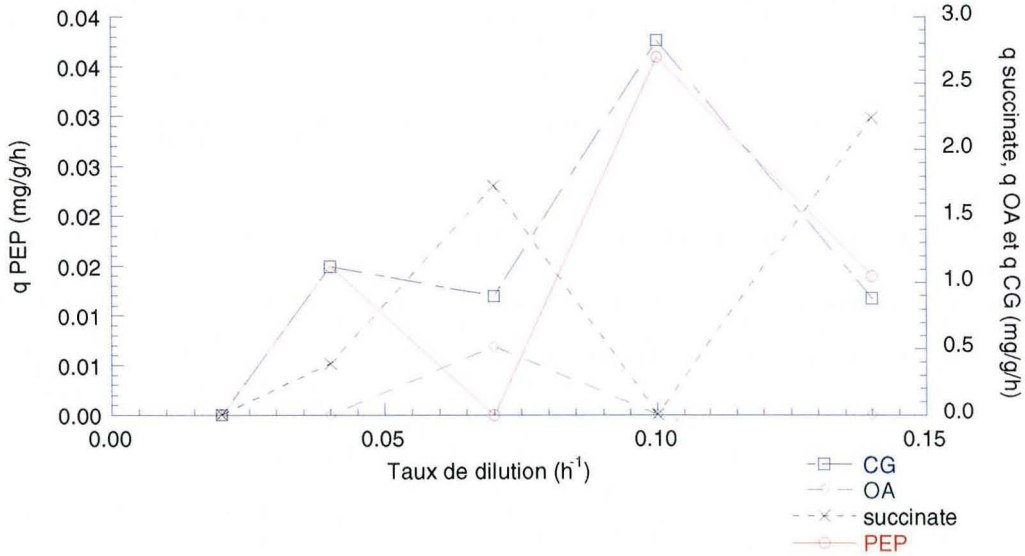


Figure VI.8 : Quotients métaboliques de l'α-céto-glutarate (CG), de l'OA, du succinate et du PEP après 5 temps de passage pour différents taux de dilution.

Les productions de PEP et α-CG (Fig. VI.8) varient de manière similaire en augmentant vers les taux de dilutions plus importants à l'exception des μ de 0,07 h^{-1} et de 0,14 h^{-1} où l'excrétion est ralentie. Pour l'α-CG les résultats sont cohérents avec ceux de discontinus dans la mesure où les plus fortes vitesses spécifiques d'excrétion étaient observées en début de cultures alors que les μ était relativement grands.

L'oxalo-acétate (Fig. VI.8) a été détecté seulement pour le taux de dilution de 0,07 h^{-1}. Ces résultats tendent à valider l'absence de ce composé, absence établie au cours des cultures

discontinues.

La vitesse spécifique d'excrétion de l'isocitrate (Fig. VI.9) augmente avec le taux de dilution jusque 0,10 h^{-1} puis pour 0,14 h^{-1} il n'est plus retrouvé dans le milieu.

La vitesse spécifique d'excrétion de l'acétate (Fig. VI.9) évolue dans le même sens que celle de l'isocitrate à la différence près que ce composé est encore observé à 0,14 h^{-1} et que pour ce taux de dilution sa vitesse est maximale.

Le succinate (Fig. VI.8) est plus rapidement excrété pour des grands taux de dilution (hormis le cas le où D=0,10 h^{-1}) alors que les plus fortes concentrations ont été observées pour de faibles μ avant d'atteindre l'état stabilisé.

Le fumarate (Fig. VI.9) est aussi excrété de la même manière que l'isocitrate à mesure que s'accroît le D et il est même présent pour un D de 0,14 h^{-1} alors qu'il n'avait pas pu être détecté en fermenteur discontinu.

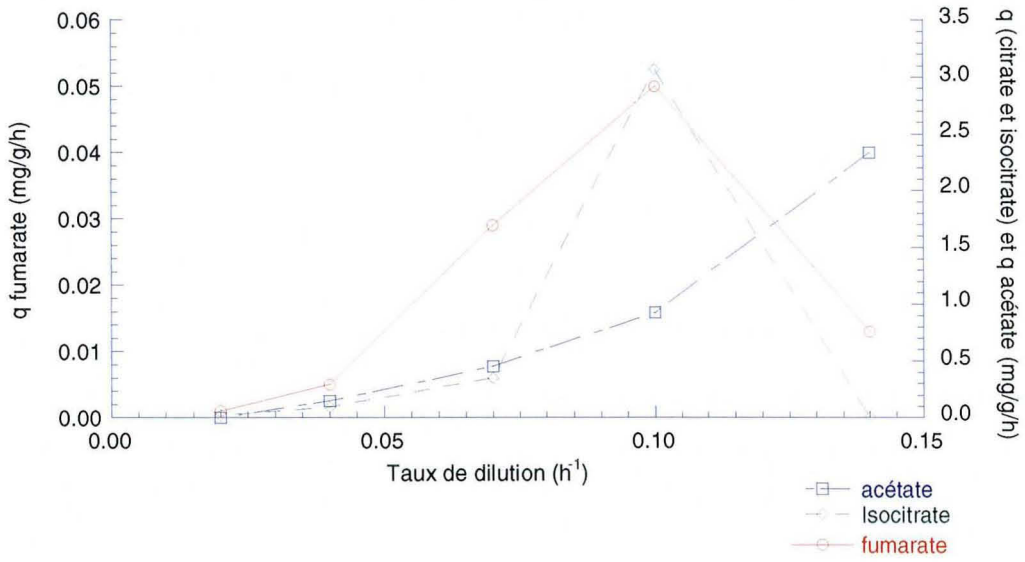


Figure VI.9 : Quotients métaboliques de l'acétate, de l'isocitrate et du fumarate après 5 temps de passage pour différents taux de dilutions.

VI.9- Activités enzymatiques en fonction du taux de croissance :

Les activités enzymatiques et le pH_i sont mesurés en fin de fermentations à l'état stabilisé alors qu'il n'y a plus production de pristinamycines. Les résultats ne permettent pas d'atteindre l'objectif prévu à savoir l'étude de ces paramètres pour des cellules passant de la phase de croissance à la phase de production d'antibiotiques, en appliquant différents taux de dilution.

Les valeurs mesurées sont de l'ordre de celles mesurées en fermenteur discontinu, mais il est difficile de comparer ces activités avec celles dosées en discontinu. Pour des μ faibles la distribution de population est différente car en culture discontinue une forte proportion de cellules présente un métabolisme de type secondaire, alors qu'en continu ces activités sont mesurées pour des cellules qui ne sont plus productrices d'idiolites.

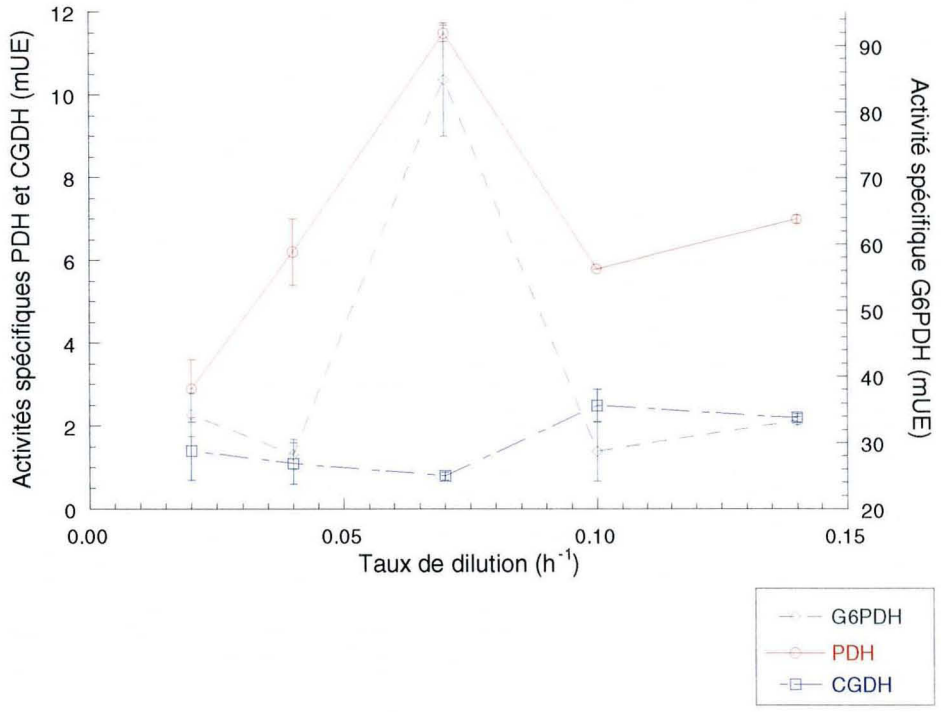


Figure VI.10 : Activités spécifiques de la G6PDH, de la PDH et de l'α-CGDH après 5 temps de passage pour différents taux de dilution.

VI.9.1- G6PDH :

L'activité G6PDH possède un profil qui suit celui de la PDH (Fig. VI.10). Le maximum est observé pour un D de 0,07 h^{-1} (comme pour la PDH) et peut s'expliquer par la consommation de glucose. Lors des prélèvements à ce D, la concentration de glucose n'est plus que de 13 g/L alors qu'elle était stabilisée aux environs de 18 g/L. Ce résultat montre que le niveau d'activité G6PDH est très dépendant de q glucose.

VI.9.2- La PFK :

L'activité PFK (Fig. VI.11) n'évolue pas selon une tendance très marquée en fonction du taux de dilution. Une similarité du profil de variation de son activité observée avec celui de la vitesse d'excrétion du lactate dans la mesure où une forte activité PFK se concrétise par une excrétion de lactate plus conséquente.

Le sens de variation de l'AS PFK qui est inverse à celui de la G6PDH pourrait signifier des changements de répartition des flux entre la glycolyse et la PPP par suractivation de la voie PPP.

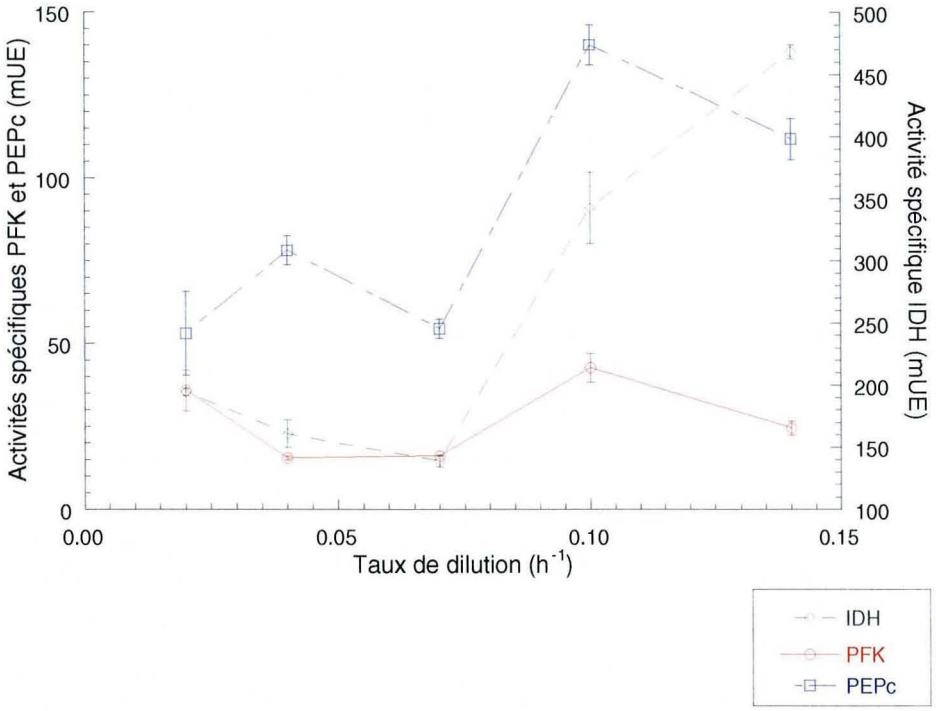


Figure VI.11 : Activités spécifiques de l'IDH, de la PFK et de la PEPc pour différents taux de dilution.

VI.9.3- La PEPc :

A l'exception de l'activité dosée pour D 0,07 h^{-1}, la PEPc a une plus grande AS lorsque les D sont importants (Fig. VI.11). Un fait intéressant est qu'en réponse à la suractivation des AS de la PDH et de la G6PDH pour le taux de dilution 0,07 h^{-1}, l'activité spécifique de la PEPc diminue. Cette baisse peut paraître surprenante car l'acétyl-CoA produit par l'action de la PDH est considéré comme activateur de la PEPc à moins qu'il y ait une limitation au début du TCA.

VI.9.4- La PDH :

L'activité PDH semble croître avec le taux de dilution (Fig. VI.10). De fortes vitesses spécifiques d'excrétion du pyruvate, bien que l'AS PDH soit importante montrent une limitation de l'activité *in vivo* de cette enzyme. L'augmentation d'activité PDH est liée à une augmentation de la vitesse spécifique d'excrétion de l'acétate. Si cet acide est excrété il doit

limitation de l'activité *in vivo* de cette enzyme. L'augmentation d'activité PDH est liée à une augmentation de la vitesse spécifique d'excrétion de l'acétate. Si cet acide est excrété il doit vraisemblablement se produire en aval de cette chaîne de réactions une étape limitante, ce qui irait dans le sens de l'hypothèse de limitation par la citrate synthase ou par la cis-aconitase. D'ailleurs, il y a excrétion d'oxalo-acétate alors que la PDH est très active et que la PEPc est faible.

VI.9.5- L'IDH :

Comme la PEPc cette enzyme a une activité qui augmente parallèlement avec le D (Fig. VI.11). Une autre similitude est que l'IDH subit également une baisse d'activité lorsque le taux de dilution est égal à 0,07 h^{-1}. Ceci conduit à l'hypothèse d'une régulation de la biosynthèse de ces enzymes très liée.

Plusieurs constatations tendent à montrer qu'il existe une limitation de la biosynthèse d'acides tricarboxyliques vers les forts D. Il se produit une accumulation d'acétate due au fonctionnement de la PDH, alors que les AS IDH et PEPc sont grandes. Cependant, il ne se produit pas d'excrétion d'OA et il y a une accumulation de C6 détectée au niveau des surnageants.

VI.9.6- L'α-CGDH :

Les activités de l'α-CGDH (Fig. VI.10) mesurées ici sont beaucoup plus faibles que celles mesurées en discontinu : maximum d'activité jusque 5 fois inférieur. Pour les grands taux de dilution, les niveaux d'activité α-CGDH sont plus forts et ceci peut aller dans le sens d'un apport de carbone par les acides aminés.

VI.10- Influence du taux de croissance sur le pH_i :

Le taux de dilution a peu d'influence sur le pH_i car l'amplitude du domaine de variation du pH_i de 0,8 unité pH est beaucoup moins importante qu'en réacteur discontinu (plus de 2 unités pH) (Fig. VI.12). Cette constatation peut trouver une explication dans le fait que les conditions de cultures sont telles que la composition extracellulaire en nutriments et acides organiques est quasi constante pour un même taux de dilution. De ce fait, les systèmes

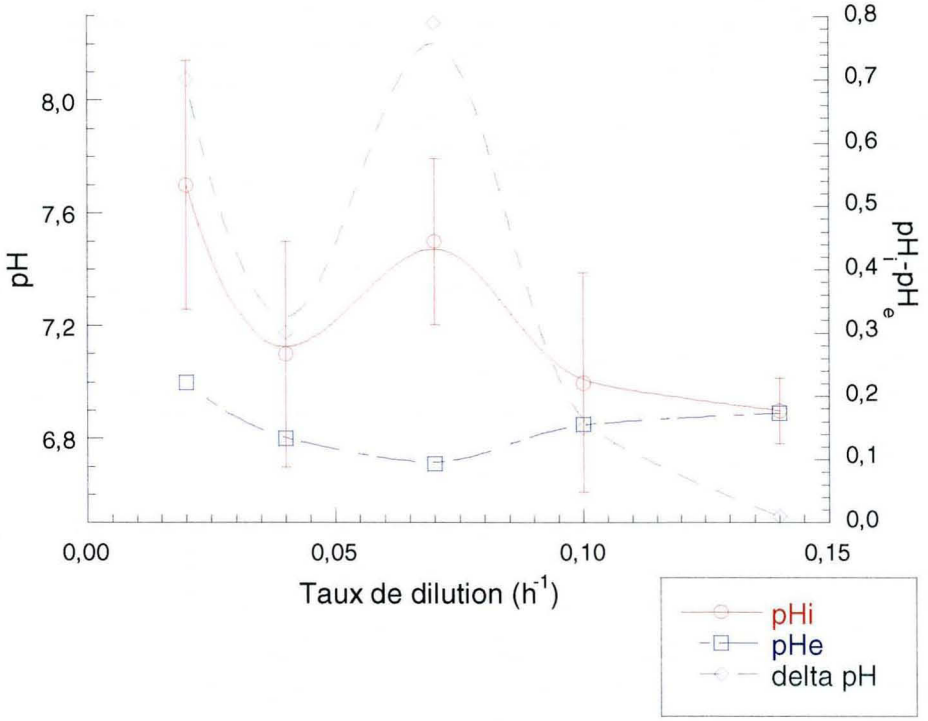


Figure VI.12 : Variations du pH intracellulaire, du pH extracellulaire et du gradient de pH (ΔpH) après 5 temps de passage en fonction du taux de dilution.

Le pH intracellulaire semble varier légèrement dans le sens inverse de celui des taux de dilutions (hormis le cas du fermenteur à un D de 0,07 h^{-1}). Ces résultats confirment la conclusion effectuée lors de fermentations discontinues sur le fait que le taux de croissance à lui seul ne suffit pas à expliquer les variations de pH_i. Par ailleurs, il n'y a apparemment pas de relation claire entre le quotient métabolique du glucose et les valeurs de pH_i mesurées contrairement à ce qui a pu être rapporté dans le cas de *C. glutamicum* (Leyval *et al.*, 1997). Cependant, les résultats sont difficilement comparables car ces cultures étaient effectuées en mode semi-continu ou discontinu.

A la différence de ce qui a été fait en cultures discontinues, les mesures en continues n'ont pas été effectuées sur des cellules synthétisant des pristinamycines. Ceci peut aussi expliquer que les valeurs de pH_i ne seraient pas élevées pour les taux de dilution faibles.

Le ΔpH varie aussi sur un domaine de 0,8 unités et reste positif quel que soit le taux de dilution. A l'instar du pH_i, il diminue lorsque le taux de dilution augmente. Il tend à s'annuler pour de forts taux de dilution. Ce fait est intéressant car ceci va dans le sens où peu de glucose est consommé lorsque les D sont élevés.

En prenant en compte tous les protons appartenant à une fonction acide carboxylique (ou phosphorique dans le cas du PEP), le calcul des vitesses d'excrétion de protons a été effectué pour les différents acides organiques produits (Tab. VI.5). En considérant que ces

En prenant en compte tous les protons appartenant à une fonction acide carboxylique (ou phosphorique dans le cas du PEP), le calcul des vitesses d'excrétion de protons a été effectué pour les différents acides organiques produits (Tab. VI.5). En considérant que ces protons à l'intérieur des cellules étaient en concentrations proportionnelles à la vitesse spécifique d'excrétion des acides organiques correspondants, ces calculs pourraient donner une idée du pH_i. Les résultats de ces calculs peuvent expliquer certaines valeurs de pH_i, mais pas toutes. Ceci peut se comprendre dans la mesure où le pH est la résultante de la présence de multiples composés acides et basiques. De plus, subsiste le manque d'informations concernant les concentrations intracellulaires en métabolites et leurs modes d'excrétion.

D (h^{-1})	pH_i	Flux de protons (mg d'H^+/g/h)
0,02	7,7	0,0007
0,04	7,1	0,0301
0,07	7,5	0,0664
0,10	7,0	0,1877
0,14	6,9	0,0893

Tableau VI.5 : Valeurs des pH_i et des vitesses spécifiques d'excrétion en équivalents H^+ pour les acides organiques dosés pour différents taux de dilution.

VI.11- Conclusions :

L'objectif premier de ces fermentations continues était l'étude de l'influence du μ sur le métabolisme de *S. pristinaespiralis* : enzymes du catabolisme du glucose, l'excrétion de catabolites en résultant, pristinamycines et variations de pH_i allant de paire.

Contrairement à la production d'actinorhodine par *S. coelicolor* (Melzoch *et al.*, 1997) et à la production de granaticine par *S. thermoviolaceus* (James et Edwards, 1991), l'influence du taux de dilution sur la production de pristinamycines n'a pas été étudiée. L'excrétion cyclique des pristinamycines résultant de la rétro-inhibition sur leur propre biosynthèse puis la disparition de ces cycles de production centrent l'étude des différents paramètres sur le métabolisme de *S. pristinaespiralis* en phase de croissance. La perte de l'aptitude de *S. pristinaespiralis* à synthétiser des pristinamycines au cours des générations est probablement liée à l'instabilité génétique caractéristique du genre bactérien.

L'excrétion de pristinamycines pour de grands D (0,14 h^{-1}) avait précédemment été rapporté par Paquet (1990), mais aucune explication hormis une carence en phosphate n'a été fournie. Il paraît difficilement concevable que le phosphate ait pu être complètement consommé, étant donné les biomasses présentes (2,6 et 2,5 g/L pour les D de 0,10 et 0,14 h^{-1}) au moment du déclenchement de l'excrétion des pristinamycines. Un problème de stabilité de ce composé dans le milieu peut être supposé, mais le phosphate n'est pas stérilisé à l'autoclave mais par filtration. De plus, le changement métabolique s'est opéré très tôt (détection des pristinamycines dès 25-28 h), ce qui laisse peu de temps pour une dégradation de ce composé. Le dosage du phosphate n'ayant pas été effectué, cette hypothèse ne peut être exclue définitivement. Une explication possible tient à l'état physiologique des cellules car la population au sein d'une culture n'est pas homogène. Il est envisageable que soit une partie des cellules apportées au niveau des précultures, soit des cellules issues de nouvelles générations dans le fermenteur soient déjà engagées dans un processus de différenciation physiologique. Ce processus s'exprimerait par une libération précoce de pristinamycines et/ou de molécules signal telles que les butyrolactones (Kinoshita *et al.*, 1997 ; Paquet, 1990), suite à des conditions physico-chimiques (pH, fortes vitesses d'agitation) différentes par rapport aux conditions de précultures ou de cultures discontinues. Ces paramètres physico-chimiques sont constants, ce qui pourrait expliquer la constance des intervalles de temps entre chaque cycle de production. L'observation de ces cycles de production en parfaite relation avec une chute brutale du potentiel rédox suggèrent l'utilisation de ce type de sonde en ligne pour contrôler l'arrêt ou la conduite des fermentations plutôt que d'effectuer l'extraction et le dosage des pristinamycines hors ligne.

Du fait prélèvements effectués entre 5 et 7 temps de passage, les hypothèses sur l'excrétion de succinate et de lactate n'ont pu être approuvées. Bien que les vitesses spécifiques d'excrétion des acides organiques soient faibles comparativement aux cultures discontinues, elles restent néanmoins cohérentes avec les vitesses de consommation spécifique du glucose et ont permis un certain nombre d'explications concernant les activités enzymatiques étudiées et certaines variations de pH_i.

Contrairement aux cultures discontinues, le pH_i subit des fluctuations moins dépendantes du μ. Ceci va dans le sens d'une homéostasie du pH_i, puisque les conditions expérimentales de culture pour un même D sont maintenues durablement constantes, ce qui est favorable à l'établissement d'un équilibre. Les faibles variations de pH_i confirment de faibles pertes carbonées sous formes d'acides organiques.

Le pH_i semble diminuer avec le taux de croissance et n'est pas corrélé à la vitesse spécifique de consommation du glucose contrairement à ce qui a été rapporté chez *Corynebacterium glutamicum* en culture semi-continue (Leyval *et al.*,1997). En effet dans le cas présent, le glucose n'est pas la seule source de carbone assimilée car il semble que le glutamate et l'arginine le soient aussi.

Les faibles ΔpH sont retrouvés pour les forts D lorsqu'il y a encore beaucoup de glucose résiduel. Dans un registre un peu différent chez *Lactococcus lactis*, l'apport d'arginine comme source d'énergie abaisse le ΔpH comparativement à un apport de lactose (Molenaar *et al.*, 1991). Ceci pourrait expliquer les observations dans le cas présent.

Ces cultures ont permis de suggérer une consommation préférentielle des acides aminés comme source de carbone pour des taux de dilution élevés. Le rapport des contributions carbonées acides aminés/glucose semblerait dépendant du taux de dilution car divers éléments ont été constatés :

- La faible consommation de glucose pour les grands taux de dilution ne suffit pas à elle seule pour justifier la biomasse mesurée.
- Les rendement $Y_{X/glucose}$ toujours supérieurs à 2 g/g pour les grands D vont à l'encontre du $Y_{X/glucose}$ théorique maximal de 0,38 g/g.
- Les voies de dégradation de l'arginine et du glutamate mènent à un composé intermédiaire, l'α-CG. Or en début de culture discontinues alors que les μ sont importants (*Cf.* chapitre IV), les activités α-CGDH sont plus élevées et les vitesses spécifiques d'excrétion de l'α-CG peuvent faire penser à une certaine abondance de ce composé à l'intérieur des cellules.
- Le rapport des activités IDH/α-CGDH en comparaison avec la cinétique d'excrétion de l'α-CG tendrait à montrer que l'activité IDH n'est pas la seule voie de formation de l'α-CG pour un μ de 0,1 h^{-1} (*Cf.* chapitre IV).
- Lors des cultures discontinues le glucose n'est pas consommé alors qu'il y a production de biomasse.

Un mécanisme probable de cette consommation préférentielle des acides aminés pourrait être une répression de la consommation de glucose par l'α-CG. Il a été démontré chez *E. coli* que ce composé réprime la traduction de l'ARN correspondant à l'enzyme III du système PTS. L'existence de ce système d'entrée des sucres est sujette à bien des controverses : inexistant chez *S. violaceus* et *S. venezuelae* (Sanchez et Hardisson, 1980 ; Chatterjee et Vining, 1982) et chez tout le genre *Streptomyces* (Hindle et Smith, 1994).

Cependant, cette généralisation a été mise en défaut par Parche *et al.* (1999) chez *S. coelicolor* et par Titgemeyer *et al.* (1995) chez *S. lividans* et *S. griseofuscus*, où la présence de ce mécanisme a été mise en évidence.

Ce type de répression du catabolisme du glucose pourrait être corroboré par une activité PDH imposant une première limitation. Une autre étape limitante de l'oxydation du glucose peut être supposée au niveau d'une des deux premières enzymes du TCA *i.e.* la citrate synthase et/ou la cis-aconitase. Pour un taux de dilution de 0,07 h^{-1} l'excrétion d'OA concomitante à celle d'acétate peut laisser entrevoir un déficit de l'activité citrate synthase. Cependant, il a pu être observé l'excrétion de molécules à 6 atomes de carbone qui n'ont pas pu être clairement identifiées. Etant donné les niveaux d'activité IDH, il est fort probable que ce ne soit pas de l'isocitrate mais plutôt du cis-aconitate ou du citrate. Il est alors envisageable que soit les deux enzymes sont limitantes, soit il existe une inhibition ou une répression du cis-aconitate sur la citrate synthase. Ceci irait dans le sens de ce qui a pu être observé chez *S. aureofaciens* (Hostalek *et al.*, 1969) où la citrate synthase est limitante et les mécanismes de régulation de sa biosynthèse relativement à celle de l'aconitase concourent à accroître la teneur en citrate des cellules.

Ainsi que conclu dans le chapitre IV, des enzymes telles que la PEPc et l'IDH ne paraissent pas limitantes d'un point de vue quantités synthétisées pour l'assimilation du glucose. Enfin pour ce qui concerne l' α-CGDH son activité *in vitro* est très faible mais semble plus forte à grand D. Seulement son substrat provenant aussi de l'assimilation d'acides aminés, il est difficile de conclure sur la limitation qu'elle pourrait avoir sur l'assimilation du glucose.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives :

Cette étude a porté sur une partie du métabolisme de *Streptomyces pristinaespiralis*, elle a été focalisée sur l'assimilation du glucose par des cellules en phase de croissance et par des cellules différenciées productrices de pristinamycines. Aux différentes interrogations soulevées par ce type d'étude, a été apportée une réponse.

- **Quelles sont les voies cataboliques impliquées ?**

La présence des activités des enzymes : PFK (glycolyse), G6PDH (PPP), PDH (fin de la glycolyse), PEPc (voie anaplérotique en C4), IDH (TCA et synthèse de glutamate), IL (shunt glyoxylique) et α-CGDH a été démontrée au cours de fermentations discontinues de *Streptomyces pristinaespiralis*. Par ailleurs, il semble qu'il y ait une co-régulation des activités PDH et G6PDH.

- **La dégradation du glucose est-elle potentiellement limitée par certaines enzymes synthétisées en quantité insuffisante (notion d'étapes limitantes) ?**

Au vu des ordres de grandeur des différentes activités mesurées durant toute la culture, les activités de la PDH et de l'α-CGDH pourraient être limitantes pour l'utilisation du glucose. Un fait notable est la faible consommation de glucose en début de fermentation qui peut faire penser à une utilisation préférentielle de l'α-CG provenant de la dégradation des acides aminés. Cette hypothèse est étayée par un niveau relativement fort de l'α-CGDH en début de fermentation. Par ailleurs, certains résultats suggèrent l'existence d'une ou plusieurs limitations au niveau des premières réactions du TCA.

- **Existe-t-il durant le glissement de métabolisme une réorganisation des flux cataboliques du carbone à l'intérieur des cellules par des changements d'activité des biocatalyseurs ?**

Lorsque l'excrétion des pristinamycines a lieu, une baisse générale des activités dosées a été observée. La seule exception à cette baisse des quantités d'enzymes synthétisées est

l'IDH qui augmente ou reste d'un niveau élevé de façon concomitante à la sortie des pristinamycines. Cette activité d'un niveau encore important pourrait compléter l'apport de NADPH par la G6PDH pour la biosynthèse des précurseurs de pristinamycines et leur assemblage.

- **A quels niveaux du métabolisme carboné se produisent des fuites de carbone (si engorgement du flux il y a) ? L'existence de fuites se traduit-elle par une accumulation préalable de ces composés et quelles peuvent être les répercussions engendrées sur le pH intracellulaire ?**

Une méthode de mesure du pH_i par microscopie à épifluorescence et analyse d'image a été développée pour la première fois pour une bactérie filamenteuse avec succès et a fait l'objet d'une publication (P.F.X. Corvini, H. Gautier, E. Rondags, H. Vivier, J.L. Goergen & P. Germain, Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis, *Microbiology* 2000; **146**: 2671-2678). Elle permet la mesure du pH_i de pelotes de mycélium dans un domaine allant de 6,5 à 8,5 unités pH avec une erreur de plus ou moins 0,3-0,4 unité.

Cette méthode a été appliquée pour suivre le pH_i de *S. pristinaespiralis* au cours de cultures en réacteur discontinu. Ce paramètre physico-chimique subit des variations de forte amplitude (plus de 2 u pH). Il a été remarqué une forte alcalinisation du milieu intracellulaire dans les premières heures qui est corrélée à l'excrétion de citrate et d'α-CG. La majeure partie de l'α-CG pourrait provenir de l'assimilation des acides aminés. Une partie du squelette carboné serait excrétée contribuant à une « désacidification » tandis que la fonction amine restant à l'intérieur provoquerait une alcalinisation du milieu intracellulaire.

Lorsque la consommation de glucose devient importante, il se produit une chute du pH_i qui pourrait traduire de forts niveaux d'accumulation de certains catabolites intermédiaires du glucose. Il est à ce stade tentant de corréler cette diminution du pH_i aux activités enzymatiques élevées qui diminuent au fur et à mesure que le pH_i reste acide.

Lors de l'excrétion de pristinamycines, un des faits les plus marquants a été mis en évidence. Pendant cette période des quantités de lactate et de succinate allant respectivement jusque 630 mg/l et 3 g/l ont été mesurées. Ceci pourrait se concrétiser par de grandes pertes carbonées en terme de profit pour les cellules. A ces phénomènes excrétoires, est associée une forte remontée du pH_i.

Le lactate provient d'une réaction permettant la réoxydation des coenzymes lors d'une utilisation d'oxygène moindre. Le succinate pourrait être formé dans le sens classique du cycle de Krebs et serait accumulé par l'action de l'α-CGDH et/ou de l'IL. Cependant, ce composé est synthétisé alors que l'AS α-CGDH est faible. Une hypothèse plus vraisemblable est qu'il est issu d'un métabolisme de type fermentaire : il proviendrait de l'OA formé par la PEPc (forte AS) *via* la MDH, la fumarate hydratase et la SDH qui fonctionneraient dans le sens inverse du TCA en rapport avec une capacité amoindrie des cellules à utiliser l'oxygène.

Pour apporter un complément aux réponses, dans la dernière partie l'étude a porté sur le suivi des activités enzymatiques, l'excrétion des acides organiques et le pH intracellulaire lors de fermentations continues à différents taux de dilution (D). L'objet de ce travail était l'étude de tous ces paramètres pour des cellules ayant un métabolisme primaire pour les grands D et un métabolisme secondaire pour les faibles D. Le but était de déterminer l'influence de μ sur les activités enzymatiques, le pH_i et la synthèse de pristinamycines. Du fait d'une perte de l'aptitude des cellules à synthétiser des pristinamycines, ces paramètres ont été mesurés sur des cellules possédant uniquement un métabolisme primaire dont le taux de croissance est imposé par le taux de dilution. Toutefois divers éléments intéressants ont été mis en évidence.

Il est apparu que les conditions expérimentales d'états stationnaires atténuent les phénomènes d'excrétion des acides organiques et de fortes variations du pH_i. Toutefois, les phases dynamiques précédant l'atteinte des états stabilisés ont confirmé l'excrétion massive de succinate et lactate avec celle des pristinamycines.

Un autre fait intéressant est la chute de potentiel rédox associée à l'excrétion de pristinamycines, du lactate et du succinate qui laisse envisager l'utilisation de sondes à potentiel rédox à l'échelle de production industrielle pour déterminer le moment opportun d'arrêt des fermentations.

Diverses observations concernant les activités enzymatiques et les acides organiques en relation avec la production de biomasse et la concentration résiduelle de glucose abondent dans le sens d'une utilisation préférentielle du carbone provenant des acides aminés du milieu MPS2 (D de 0,10 et 0,14 h^{-1}).

Pour les taux de dilutions de 0,02 et 0,04 h^{-1} le glucose est nettement consommé et il s'agit vraisemblablement de la source principale de carbone pour la production de biomasse.

Un cas particulier a été observé pour le taux de dilution de 0,07 h^{-1} qui suggère qu'à un tel taux de dilution, un métabolisme particulier se soit instauré. Il pourrait se produire un début de limitation par la source d'azote qui expliquerait une suractivation de l'assimilation du glucose par la PPP. Pour cette fermentation l'étroite liaison entre la G6PDH et la PDH est largement confirmée.

Enfin le dernier élément est une confirmation de l'excrétion d'acide tricarboxylique qui pourrait témoigner d'une certaine limitation en amont de l'IDH.

Perspectives :

Les résultats obtenus au cours de ces différentes études ont soulevé nombre de questions et ont amené à émettre de nombreuses suggestions et hypothèses. Les perspectives de ce travail sont innombrables étant donné la complexité du métabolisme de *Streptomyces* qui est capable d'assimiler d'autres molécules que le glucose du milieu MPS2 pour ses besoins carbonés.

Il peut être envisagé un complément d'information en dosant le glutamate et l'arginine apportés avec le milieu de culture MPS2 dans un premier temps. Cependant, le dosage au niveau extracellulaire ne permet en rien de mesurer leur contribution au métabolisme central. Pour y parvenir il faut envisager l'utilisation d'acides aminés marqués adéquatement sur les atomes de carbone. Une autre solution pour simplifier cette étude serait d'utiliser une source d'azote directement assimilable (ammonium, nitrate, ...).

Les activités enzymatiques *in vitro* permettent quant à elles des évaluations sur les quantités d'enzymes synthétisées. Pour avoir une idée plus précise de l'activité de ces enzymes *in vivo*, le dosage de métabolites intracellulaires est incontournable. Cependant, ceci nécessite la mise au point d'une méthode de blocage rapide du métabolisme qui permette de stopper instantanément toutes les réactions enzymatiques sans altérer les structures cellulaires et affecter le contenu intracellulaire. Or de telles techniques ne sont pas sans difficultés et doivent être adaptées pour chaque micro-organisme.

Enfin une autre voie de recherche est le dosage d'autres enzymes participant à ce métabolisme central qui pourrait permettre d'avoir une vision plus précise du catabolisme du glucose. Il serait intéressant de doser les premières enzymes du TCA. Ceci permettrait de déterminer si la PDH et l'α-CGDH sont réellement limitantes.

Les perspectives à plus long terme sont nombreuses et font appels à divers domaines (biologie moléculaire, physiologie et génie des procédés). Au niveau physiologique, il peut être envisagé de doser le CO_2 afin d'effectuer des bilans de recouvrements carbonés et de tenter autant que faire se peut d'établir un modèle des flux de carbones à l'intérieur des cellules.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques :

Abel, C.B.L., Lindon, J.C.,Noble, D., Rudd, B.A.M., Sidebottom, P.J. & Nicholson, J.K. (1999). Characterization of metabolites in intact *Streptomyces citricolor* culture supernatants using high-resolution nuclear magnetic resonance and directly coupled high-pressure liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* **270** : 220-230.

Ahmed Z.U., Shapiro S. & Vining L.C. (1984). Excretion of α-keto acids by strains of *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol* **30** : 1014-1021.

Aigle, B., Schneider, D., Morhilat, C., Vandewiele, D., Dary, A., Holl, A.C., Simonet, J.M. & Decaris, B. (1996). Amplifiable and deletable locus of *Streptomyces ambofaciens* RP 181110 contains a very large gene homologous to polyketide synthase genes. *Microbiology* **142** : 2815-2824.

Aumercier, M., Bouhallab, S., Capmau, M.L. & Le Goffic, F. (1986). Irreversible binding of pristinamycin II_A (streptogramin A) to ribosomes explains its "lasting damage" effect. *J Antibiot* **39** (9) : 1322-1328.

Bamas-Jacques, N., Lorenzon, S., Lacroix, P., De Swetschin, C. & Crouzet, J. (1999). Cluster organization of the genes of *Streptomyces pristinaespiralis* involved in pristinamycin biosynthesis and resistance elucidated by pulse-field gel electrophoresis. *J Appl Microbiol* **87** : 939-948.

Barrière, J.C., Berthaud, N., Beyer, D., Dutka-Malen, S., Paris, J.M. & Desnottes, J.F. (1998). Recent developments in streptogramin research. *Curr Pharm Design* **4** : 155-180.

Behal M. & Vanek Z. (1970). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. XII AcetylCoA carboxylase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* **15** : 354-357.

Bergey's Manual of systematic bacteriology (1986). Editions Williams & Wilkins.

Blanc, V., Blanche, F., de Crecy-Lagard, V., Crouzet, J., Debussche, L., Jacques, N., Lacroix, P., Thibaut, D & Zagorec, M. (1994). Polypeptides involved in streptogramins biosynthesis, nucleotide sequences coding for said polypeptides and used thereof. Patent Co-operation Treaty International Publication No 94/08014.

Blanc, V., Gil, P., Bamas-Jacques, N., Lorenzon, S., Zagorec, M., Schleuniger, J., Bisch, D., Blanche, F., Debussche, L., Crouzet, J. & Thibaut, D. (1997). Identification and analysis of genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I. *Mol Microbiol* **23** (2) : 191-202.

Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gil, P., Lacroix, P. & Crouzet, J. (1995). Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin II_B to pristinamycin II_A (PII_A) : PII_A synthase and NADH : Riboflavin 5'-phosphate oxydoreductase. *J Bacteriol* **177** (18) : 5206-5214.

Booth, I.R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* **49** (4) : 359-378.

Boyarsky, G., Hanssen, C. & Clyne, L.A. (1996 a). Inadequacy of high K^+/nigericin for calibrating BCECF. II. Intracellular pH dependance of the correction. *Am J Physiol* **271** : 1146-1156.

Boyarsky, G., Hanssen, C. & Clyne, L.A. (1996 b). Superiority of *in vitro* over *in vivo* calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* **10** : 1205-1212.

Brana, A. F., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. (1982). Characterization of intracellular polysaccharides of *Streptomyces*. *Can J Microbiol* **28** : 1320-1323.

Brana, A.F., Mendez, C., Diaz, L.A., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1986). Glycogen end trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* **132** : 1319-1326.

Brock & Madigan (1979). Biology of microorganisms 5th edition. Filamentous Actinomycetes : 766-769.

Bu'lock J.D., Hamilton D., Hulme M.A., Powell A.J., Smalley H.M., Shepherd D. & Smith G.N. (1965). *Can J Microbiol* **11** : 765.

Campbell, I.M. (1984). Secondary metabolism and microbial physiology. *Adv Microbiol Physiol* **25 :** 1-60.

Cans, P. (1987). Contribution à l'identification des dynamiques de production des pristinamycines et à la mise au point de nouvelles procédures de fabrication. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.

Chater, K.F. & Merrick, M.J. (1979). *Streptomyces*. Developmental biology of procaryotes. Parish J. H. ed., University of California Press : 93-114.

Chater, K.F. & Hopwood, D.A. (1989). Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. Genetics of bacterial diversity. *Ed. Chater K.F. and Hopwood D.A. Academic press Inc, London :* 129-150.

Chatterjee, S. & Vining, L.C. (1982). Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β-galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. *Can J Microbiol* **28** : 311-317.

Cochrane V.W. & Peck H.D. Jr. (1953). The metabolism of species of *Streptomyces*. VII. The hexose monophosphate shunt and associated reactions. *J Bacteriol* **66** : 17-23.

Cocito, C. (1979). Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol Rev* **43** (2) : 145-198.

Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. & Vannufel, P. (1997). Inhibition of protein biosynthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemoth* **39**, Suppl. A : 7-13.

Cox, P.W. & Thomas, C.R. (1992). Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol Bioeng* **39** : 945-952.

Cox, P.W., Paul, G.C. & Thomas, C.R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology* **144** : 817-827.

Daae, E.B. & Ison, A.P. (1999). Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans*. *Metab Eng* **1** (2) : 153-165.

Dary, A., Bourget, N., Girard, N., Simonet, J.M. & Decaris, B. (1992). Amplification of a particular DNA sequence in *Streptomyces ambofaciens* RP 181110 reversibly prevents spiramycin production. *Res Microbiol* **143** (1) : 99-112.

Dekleva M.L. & Strohl W.R. (1988 a). Biosynthesis of ε-rhodomycinone from glucose by *Streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. *Can J Microbiol* **34** : 1235-1240.

Dekleva M.L. & Strohl W.R. (1988 b). Activity of phosphoenolpyruvate carboxylase of an anthracycline-producing streptomycete. *Can J Microbiol* **34** : 1241-1246.

Dekleva M.L. (1987). PhD thesis, Ohio State university, USA.

Dekleva M.L. & Strohl W.R. (1987). Glucose stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius. Can J Microbiol* **33** : 1129-1132.

Demain, A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **52** : 455-463.

Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S. & Shewale, J.G. (1988). Biologically active secondary metabolite from *Streptomyces. Enzyme Microb Technol* **10** : 455-473.

Di Giambattista, M., Engelborghs, Y., Nyssen, E., Clays, K. & Cocito, C. (1991). Interaction between virginiamycin S and ribosomes is partly provided by a salt bridge with a Mg^{2+} ion. *Biochemistry* **30** : 7277-7282.

Dinnibier U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E.P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *E. coli K-12* to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150** : 348-357.

Dixon G.H.& Kornberg H.L. (1959). Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* **72** : 2-3.

Drouin, J.F. (1996). Caractérisation de la différenciation cellulaire de *Streptomyces ambofaciens* en culture submergée. Etude des relations avec la production de spiramycine par analyse quantitative d'images. Thèse de doctorat, ENSAIA, Nancy, France.

Drouin, J.F., Louvel, L. Vanhoutte, B., Vivier, H., Pons, M.N. & Germain, P. (1997). Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. *Biotechnol Tech* **11** : 819-824.

Durant, G., Cox, P.W., Formisyn, P. & Thomas, C.R. (1994 a). Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining. *Biotechnol Tech* **8** : 759-764.

Durant, G., Crawley, G. & Formisyn, P. (1994b). A simple staining procedure for the characterisation of basidiomycetes pellets by image analysis. *Biotechnol Tech* **11** : 395-400.

Epstein, W. & Schultz, S.G. (1965). Cation transport in *E. coli* V: regulation of cation content. *J Gen Physiol* **63** (6) : 545-553.

Franck, P., Petitpain, N., Cherlet, M., Dardennes, M., Maachi, F., Schutz, B., Poisson, L. & Nabet, P. (1996). Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM. *J Biotechnol* **46** : 187-195.

Futsaether, C.M., Kjelstad, B.& Johnsson, A. (1993). Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes* : comparison between the fluorescent probe BCECF and ^{31}P-NMR spectroscopy. *Can J Microbiol* **39** : 180-186.

Guldfeldt, L.U. & Arneborg, N. (1998). Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* **64** : 530-534.

Heipple, J.M. & Taylor D.L. (1980). Intracellular pH in single motile cells. *J Cell Biol* **86** : 885-890.

Hindle, Z. & Smith, C.P. (1994). Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol Microbiol* **12** (5) : 737-745.

Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. & Oliver, S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **31** : 272-277.

Hockenhull D.J.D., Fantes K.H., Herbert M. & Whitehead B. (1954). Glucose utilization by *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol* **10** : 353-370.

Hostalek Z., Tinterova M., Jechova V., Blumauerova M., Suchy J. & Vanek Z. (1969). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol Bioeng* **9** : 539-548.

Hutter, R. (1986). Overproduction of microbial metabolites. H. PAPE, H. J. REHM, eds. VCH. Weinheim. *Biotechnology* **4** : 3-17.

Ikeda H., Kotaki H., Tanaka H. & Omura S. (1988). Involvement of glucose catabolism in avermictin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **32** : 282-284.

Imai, T. & Ohno T. (1995). Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J Biotechnol* **38** : 165-172.

Inbar L. & Lapidot A. (1991). ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry studies of carbon metabolism in the actinomycin D producer *Streptomyces parvulus* by use of ^{13}C-labeled precursors. *J Bacteriol* **173** (24) : 7790-7801.

James P.D.A. & Edwards C. (1988). The effects of cultural conditions on growth and secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. *FEMS Microbiol Lett* **52** : 1-6.

James P.D.A. & Edwards C. (1991). Effect of carbon source and oxydative metabolism on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. *Curr Microbiol* **23** : 227-232.

Jolles, G., Terlain, B. & Thomas, J.P. (1965). Metabolic investigations on pristinamycin. *Nature* **207** : 199-200.

Kaneko, K., Guth, P.H. & Kaunitzn, J.D. (1991). *In vivo* measurement of rat gastric surface cell intracellular pH. *Am J Physiol* **261** : 548-552.

Kendrick, K.E. & Ensign, J.C. (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged cultures. *J Bacteriol* **155**: 357-366.

Kingston, D.G.I. (1980). Biosynthesis of antibiotics of the virginiamycin M1: determination of the labelling pattern by the use of stable isotope techniques. *J Ann Chem Soc* **102** : 5964-5966.

Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T. & Yamada, Y. (1997). Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptionnal regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **179** (22) : 6986-6993.

Knight, P. (1989). Innovations in image analysis. *Biotechnology* **7** : 954-956.

Lacroix,P., Aumercier, M., Capmau, M.L. & Le Goffic, F. (1986). Studies on pristinamycin synergism in *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot* **39** (9) : 1314-1321.

Lacroix,P., Capmau, M.L. & Le Goffic, F. (1984). Pristinamycin accumulation by *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot* **37** (10) : 1246-1252.

Largeron, M. & Fleury, M.B. (1992). Acid-base properties of pristinamycin I_A and related compounds. *J Pharm Sci* **81** (6) : 565-568.

Larpent, J.P. & Sanglier, J.J (1989). Biotechnologie des antibiotiques. *Edition Masson* : 1-70.

Leclercq, R. & Courvalin, P. (1998). Streptogramins : an answer to antibiotic resistance in gram-positive bacteria. *The Lancet* **352** : 591-592.

Leclercq, R. (1999). Activité *in vitro* de la pristinamycine sur les germes respiratoires. *La Presse Médicale* **28** (suppl) : 6-9.

Lee, C.K., Kamitani, Y., Nihira, T. & Yamada, Y. (1999). Identification and in vivvo functionnal analysis of a virginiamycin S resistance gene (*varS*) from *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **181** (10) : 3293-3297.

Lefèvre, J.W., Glass, T.E., Kolpak, M.X., Kingston, D.G.I. & Chen, P.N. (1983). Biosynthesis of antibiotics of the virginiamycin family. 2. Assignment of the 13C-NMR spectra of virginiamycin M1 and antibiotic A2315A. *J Nat Prod* **46** : 475-480.

Leyval, D., Debay, F., Engasser, J.M. & Goergen, J.L. (1997). Flow cytometry for the intracellular pH measurement of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*. *J Microbiol Meth* **29** : 121-127.

Ling K.H., Paetkau V., Marcus F. & Lardy H.A. (1966). Phosphofructokinase. I. Squeletal muscle. *Methods Enzymol* **9** : 425-429.

Lissac,J. & Avril, J.L. (1977). Synergistines, vancomycine et polymyxines. Antibiotiques antibactériens (II)_*R.P.* **27** (45) : 2959-2964.

Liu, W.C., Seiner, V., Dean, L.D., Trejo, W.H., Principe, P.A., Meyers, E. & Sykes, R.B. (1981). Production of vernamycin by a *Micromonospora*. *J Antibiot* **34** (11) : 1515-1516.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall, L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275.

Lubbe, C., Demain, A.L. & Bergman, K. (1985). Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* **22** : 424-427.

Madden T., Ward J.M.& Ison A.P. (1996). Organic acids excretion by *Streptomyces lividans* TK 24 during growth on defined carbon and nitrogen sources. *Microbiology* **142** : 3181-3185.

Malik, V.S. (1982). Genetics and biochemistry of secondary metabolism. *Adv Appl Microbiol* **28** : 27-115.

Martin, J.F. & Demain, A.L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* **44** : 230-251.

Maung, M. (1987). Contribution à l'étude des dégradations des pristinamycines en cours de culture de *Streptomyces pristinaespiralis* et des procédures minimisant ce processus. Thèse INSA Toulouse, France.

Mauss, P., Drouin, J.F., Pons, M.N., Vivier, H., Germain, P., Louvel, L. & Vanhoutte, B. (1997). Location of respiration activity in filamentous bacteria by image analysis. *Biotechnol Tech* **11** : 813-817.

Mayer M. & Thiericke R. (1993). Biosynthesis of streptazolin. *J Org Chem* **58** : 3486-3489.

Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M. & Hatfield, H.L. (1972). Studies of the ecology of Actinomycetes in soil. IV Observation on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil Biol Biochem* **4** : 79-89.

Melzoch, K., Texeira de Mattos, M.J. & Neijssel, O.M. (1997). Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A(2) grown in chemostat culture. *Biotechnol Bioeng* **54** (6) : 577-582.

Métézeau, P., Ratinaud, M.H. & Carayon, P. (1994 a). Cytométrie par fluorescence. Apports comparatifs des techniques flux, image et confocale. *Editions INSERM* : 9-67.

Métézeau, P., Miglierina, R. & Ratinaud, M.H. (1994 b). La cytométrie en flux. Guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules. *Presses de l'université de Limoge.* 15-31, 140.

Molenaar, D., Abee, T. & Konings, W.N. (1991). Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta* **1115** : 75-83.

Morris, S.J. (1990). Advances in microscopy–Part IV. Real-time multi-wavelength fluorescence imaging of living cells. *BioTechniques* **8** : 296-308.

Musgrove, E., Rugg, C. & Hedley, D. (1986). Flow cytometry measurement of cytoplasmic pH: a critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry* **7** : 347-355.

Neuzil J., Novotna J., Behal V. & Hostalek Z. (1986). Inhibition studies of glucose-6-phosphate dehydrogenase from tetracycline-producing *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol Appl Biochem* **8** : 375-378.

O'Sullivan, E. & Condon, S. (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl Env Microbiol* **63** (11) : 4210-4215.

Obanye A.I.C., Hobbs G., Gardner D.C.J. & Oliver S.G. (1996). Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142** : 133-137.

Ohkuma, S. & Poole, B. (1978). Fluorescent probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **75** : 3327-3331.

Ohne M. (1975). Regulation of the dicarboxylic acid part of the citric acid cycle in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **122** : 224-234.

Okanishi, M. & Hotta, K. (1980). Regulation of antibiotics production in microorganisms. K. Sakaguchi & M. Okanashi eds,, Academic press, NY. *Molec Breed Gen Appl Microorg* : 9-28.

Padan, E., Zilberstein, D. & Schuldiner, S. (1981). pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **650** : 151-166.

Paquet, V. (1990). Mise en evidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.

Paradiso, A.M., Tsien, R.Y. & Machen, T.E. (1987). Digital image processing of intracellular pH in gastric oxyntic and chief cells. *Nature* **325** : 447-450.

Parche, S., Schmid, R. & Titgemeyer, F. (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene pts H. *Eur J Biochem* **265** (1) : 308-317.

Parfait, R. et Cocito, C. (1980). Lasting damage to bacterial ribosome by reversibly bound virginiamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* **77** : 5492-5496.

Paris, J.M., Rolin, O., Corbet, J. P., Cotrel, C. & Bouanchaud, D.H. (1985). Relations structure-activité de dérivés semi-synthétiques du constituant P_{IA} de la pristinamycine. *Path Biol* **33** : 493-496.

Paul, G.C. & Thomas, C.R. (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **60**, 1-59.

Pechère, J.C. (1996). Streptogramins a unique class of antibiotics. *Drugs* **51** : 13-19.
1.
Pons, M.N., Drouin, J.F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H. & Germain, P. (1998). Physiological investigations by image analysis. *J Biotechnol* **65** : 3-14.

Pressman, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* **45** : 501-530.

Preud'homme, J., Belloc, A., Charpentie, Y. & Tarridec, P. (1965). Chimie microbienne et pharmacodynamie. Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action: la pristinamycine. *C R Acad Sc Paris* **260** : 1309-1312.

Preud'homme, J., Tarridec, P. & Belloc, A. (1968). Pristinamycine: isolement, caractérisation et identification des constituants. *Bull Soc Chim Fr* **2** : 585-591.

Purvis , M.B., Lefevre, J.W., Jones, V.L., Kingston, D.G.I., Biot, A.M. & Gossele, F. (1989). Biosynthesis of antibiotics of the virginiamycin family. 8. Formation of the dehydroproline residue. *J Am Chem Soc* **111** : 5931-5935.

Purwantini E., Gillis T.P. & Daniels L. (1997). Presence of F420-dependant glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Mycobacterium* and *Nocardia* species, but absence from *Streptomyces* and *Corynebacterium* species and methanogenic *Archaea*. *FEMS Microb Lett* **146** : 129-134.

Ranade, N. & Vining, L.C. (1993). Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* **39** : 377-383.

Rhone-Poulenc SA (1961). Procédé de préparation d'un antibiotique par une nouvelle souche de *Streptomyces*. Brevet français n° 1-301-857.

Rhone-Poulenc-Rorer SA (1996). Streptogramines and method for preparing same by mutasynthesis. WO 96/01901.

Rollmann, B. & Rondelet, J. (1973). Transformation en milieu acide du facteur M de la virginiamycine. Détermination de paramètres cinétiques. *Ann pharm fr* **31** (6) : 451-456.

Rollmann, B. & Rondelet, J. (1975). Influence du pH sur la vitesse de l'altération du facteur S de la virginiamycine en milieu aqueux. *Pharm Acta Helv* **50** (12) : 455-460.

Rondags, E., Halliday, E. & Marc, I. (1998). Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* spp *lactis* bv *diacetylactis*. Study of α-acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. *Appl Biochem Biotech* **69** : 113-125.

Salas J.S., Quiros L.M. & Hardisson C. (1984). Pathways of glucose catabolism during germination of Streptomyces spores. *FEMS Microbiol Lett* **22** : 229-233.

Sanchez, J. & Hardisson, C. (1980). Glucose inhibition of galactose induced synthesis of β-galactosidase in *Streptomyces violaceus*. *Arch Microbiol* **125** : 111-114.

Sezonov, G., Blanc, V., Bamas-Jacques, N., Friedmann, A., Pernodet, J.L., & Guérineau, M. (1997). Complete conversion of antibiotic precursor to pristinamycin II A by overexpression of *Streptomyces pristinaespiralis* biosynthetic gene. *Nature Biotechnology* **15** : 349-354.

Siegumfeldt, H., Rechinger, K.B. & Jakobsen, M. (1999). Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacteria cells in mixed cultures. *Microbiology* **145** : 1703-1709.

Sieracki, M.E., Reichenbach, S.E. & Webb, K.L. (1989). Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. *Appl Environ Microbiol* **55** : 2762-2772.

Slavik, J. (1982). Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett* **140** : 22-26.

Slavik, J. (1983). Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. *FEBS Lett* **156** : 227-230.

Slavik, J. (1997). Application of fluorescent probes in cellular biology. Measurement of intracellular pH. *J Lumin* **72** : 575-577.

Sontag, W. (1977). A comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells *in vitro*. *Rad and Environm Biophys* **14** : 1-12.

Takebe H., Matsunaga M., Hiruta O., Satoh A. & Tanaka H. (1991). Relationship between sugar consumption and tricarboxylic acid cycle in a high bialaphos-producing strain. *J. Ferment. Bioeng.* **71**(2) : 110-113.

Takebe H., Matsunaga M., Hiruta O., Satoh A. & Tanaka H. (1993). Effect of oxygen partial pressure on bialaphos synthesis, sugar metabolism and the activity of the tricarboxylic acid cycle enzymes in submerged culture of *Streptomyces hygroscopicus*. *J Ferment Bioeng* **75** (4) : 283-287.

Tanasugarn, L., McNeil, P., Reynolds, G.T. & Taylor, D.L. (1984). Microspectrofluorimetry by digital image processing : measurement of cytoplasmic pH. *J Cell Biol* **98** : 717-724.

Thevelein, J.M., Beullens, M., Honshoven, F., Hoebeeck, G., Detremerie, K., Den Hollander, J.A. & Jans, A.W.H. (1987). Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : Intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol* **133** : 2191-2196.

Thibaut, D., Ratet, N., Bisch, D., Faucher, D., Debussche, L. & Blanche, F. (1995). Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin II_B during the last step of pristinamycin II_A biosynthesis. *J Bacteriol* **177** : 5199-5205.

Thibaut, D., Bisch, D., Ratet, N., Maton, L., Couder, M., Debussche, L. & Blanche, F. (1997). Purification of peptide synthetases involved in pristinamycin I biosynthesis. *J Bacteriol* **179** (3) : 697-704.

Thiericke R. & Zeeck A. (1988). Biosynthesis of manumycin: origin of the polyene chains. *J Antibiot* **41** (5) : 694-696.

Thomas, C.R. (1992). Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *Trends Biotechnol* **10** : 343-348.

Thomas, J.A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A. & Racker E. (1979). Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated *in situ*. *Biochemistry* **18** : 2210-2218.

Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M.H., Cui, X. & Saier M.H. Jr (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology* **141** (Pt 1) : 51-58.

Tsujimoto, K., Semadeni, M., Huflejt, M. & Packer L. (1988). Intracellular pH of halobacteria can be determined by the fluorescent dye 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *Biochem Biophys Res Com* **155** (1) : 123-129.

Vasquez, D. (1966). Studies on the mode of action of the streptogramin antibiotics. *J Gen Microbiol* **42** : 93-106.

Videau, D. (1982). Etude de l'activité bactéricide de la pristinamycine. *Path Biol* **30** : 529-534.

Vining L.C., McInnes A.G., McCulloch A.W., Smith D.G. & Walter J.A. (1988). The biosynthesis of caerulomycins in *Streptomyces caeruleus*. Isolation of a new caerulomycin and incorporation of picolinic acid and glycerol into caerulomycin A. *Can J Chem* **66** : 191-194.

Visser J., Kester H., Jeyaseelan K. & Topp R. (1982). Pyruvate dehydrogenase complex from *Bacillus*. *Methods Enzymol* **89** : 399-407.

Visser, J.W.M., Jongeling, A.A.M. & Tanke, H.J. (1979). Intracellular pH determination by fluorescence measurements. *J Histochem Cytochem* **27** : 32-35.

Vorisek J., Powell A.J. & Vanek Z. (1968). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. IV. Purification and properties of PEP carboxylase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* **4** : 398-405.

Whitaker, A. (1992). Actinomycetes in submerged culture. *Appl Biochem Biotechnol* **32** : 23-35.

Yang, K.Y., Morikawa, M., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K.I., Nihira, T. & Yamada, Y. (1996). Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J Ferment Bioeng* **81** : 7-12.

Annexes

Annexe 1 : Algorithme du traitement des images par Visilog :

```
ph(liste, result,direc)
{
/*Calcul de l'histogramme d'une image sans les 0 */
auto nom[20],bildb;
auto fichcom;
auto init;
long nbild;
int length;
iprocess() ;          /* acces aux fonctions de traitement */
 /* fermeture de toutes les images */
IpClearMemory();
IpClearDisplay();
IpCloseAll() ;
/* Display image in full window but constraint mode, (No streching)  */
/*P_image.MIP_VIEWCONSTR();
M_scroll_zoom.GUI_SETVAL(0);*/
/* ouverture du fichier liste */
if ((init=fopen(liste, "r"))==0) {
   RmShowWarning(" Impossible de trouver le fichier liste ") ;
   return(5);
}
nbild=0;
/* ouverture du fichier de resultats */
fichcom=fopen(result,"w");
/* fprintf(fichcom, "Base ; Moyenne ; Sigma \n") ;*/
fprintf(fichcom, "base; mean K; sigma k; mean L; sigma L; mean r; sigma r \n") ;
fclose(fichcom) ;
/* Boucle de lecture des noms des images k dans le fichier liste */
fgets(nom,20,init);
do {
  nbild=nbild+1;
  length=strlen(nom);
  strncpy(bildb,nom,length-1);
  printf("\nbase :%s ",bildb);
  fprintf(fichcom, " %s ;",bildb);
  /* sousprog de traitement */
  fichcom=fopen(result,"a");
  traite(bildb,direc, fichcom);
  fclose(fichcom) ;
  fgets(nom,20,init);
}
while(!feof(init));
printf("completed\n");
/*fclose(fichcom) ;*/
fclose(init) ;
}

traite(bildb,direc, fichcom)
{
IMAGE ngk, ngl, bink, binl, binor, maskl, maskk, floatl, floatk ;
IMAGE finale ;
IFORMAT format ;
```

```
long idkey, idnum, inrange[2], outlevel[2], seuil ;
long nbl, nbc ;
auto bildl, bildk, suite, param[3], parame[3],dirbild ;
format= CRmAllocTab(100) ;
strcpy(bildk, bildb) ;
fprintf(fichcom, " %s ;",bildb);
bildk = strcat(bildk,".tif");
inrange[0] = 0  ; inrange[1] = 255  ;
outlevel[0] = 0 ; outlevel[1] = 1 ;
 /* ouverture de l'image K */
 /* lecture avec load data */
 /*printf("bildk : %s|| ", bildk) ;*/
 strcpy(dirbild,direc);
 strcat(dirbild,bildk);
 IpGetDefaultFormat(format);
 format[1]=768; format[2]=576;
 /* ouverture et lecture image k */
 ngk=IpOpenImage("ngk",V_WRITE,format);
 LoadData(IMAGE_DATA,dirbild,ngk,0);
 IpDspImg(ngk);
 /* création image ng des masques */
 IpSetImageCode(format, I_SHORT, 0) ;
 maskk = IpOpenImage("maskk",V_WRITE, format) ;
 /* Creation des images binaires*/
 IpSetImageCode(format,I_BIN, 0) ;
 binl = IpOpenImage("binl",V_WRITE, format) ;
 bink = IpOpenImage("bink",V_WRITE, format) ;
 binor = IpOpenImage("binor",V_WRITE, format) ;
/* seuillage par entropie  de k*/
 IpEntrop2(ngk, bink, inrange, outlevel, &seuil) ;
 IpDspImg(bink) ;
 printf("seuil k : %d ", seuil) ;
 /* change le k en l */
 bildl = strtok(bildk, "k") ;
 suite =  strtok(NULL, "k") ;
 strcat(bildl, "l") ;
 strcat(bildl, suite) ;
 strcpy(dirbild,direc);
 strcat(dirbild,bildl);
 IpGetDefaultFormat(format);
 format[1]=768; format[2]=576;
 /* ouverture et lecture image l */
 ngl=IpOpenImage("ngl",V_WRITE,format);
 LoadData(IMAGE_DATA,dirbild,ngl,0);
 IpGetImgFormat(ngl, &idkey, &idnum, &format) ;
 IpSetImageCode(format, I_SHORT, 0) ;
 /* traitement image l */
 maskl = IpOpenImage("maskl",V_WRITE, format) ;
 IpDspImg(ngl);
 IpEntrop2(ngl, binl, inrange, outlevel, &seuil) ;
 printf("seuil l : %d \n", seuil) ;
 IpDspImg(binl) ;
 /*RmShowMessage("OR ?") ;*/
 /* addition logique OR */
 IpBoolimg(bink, binl, binor, V_AND) ;
```

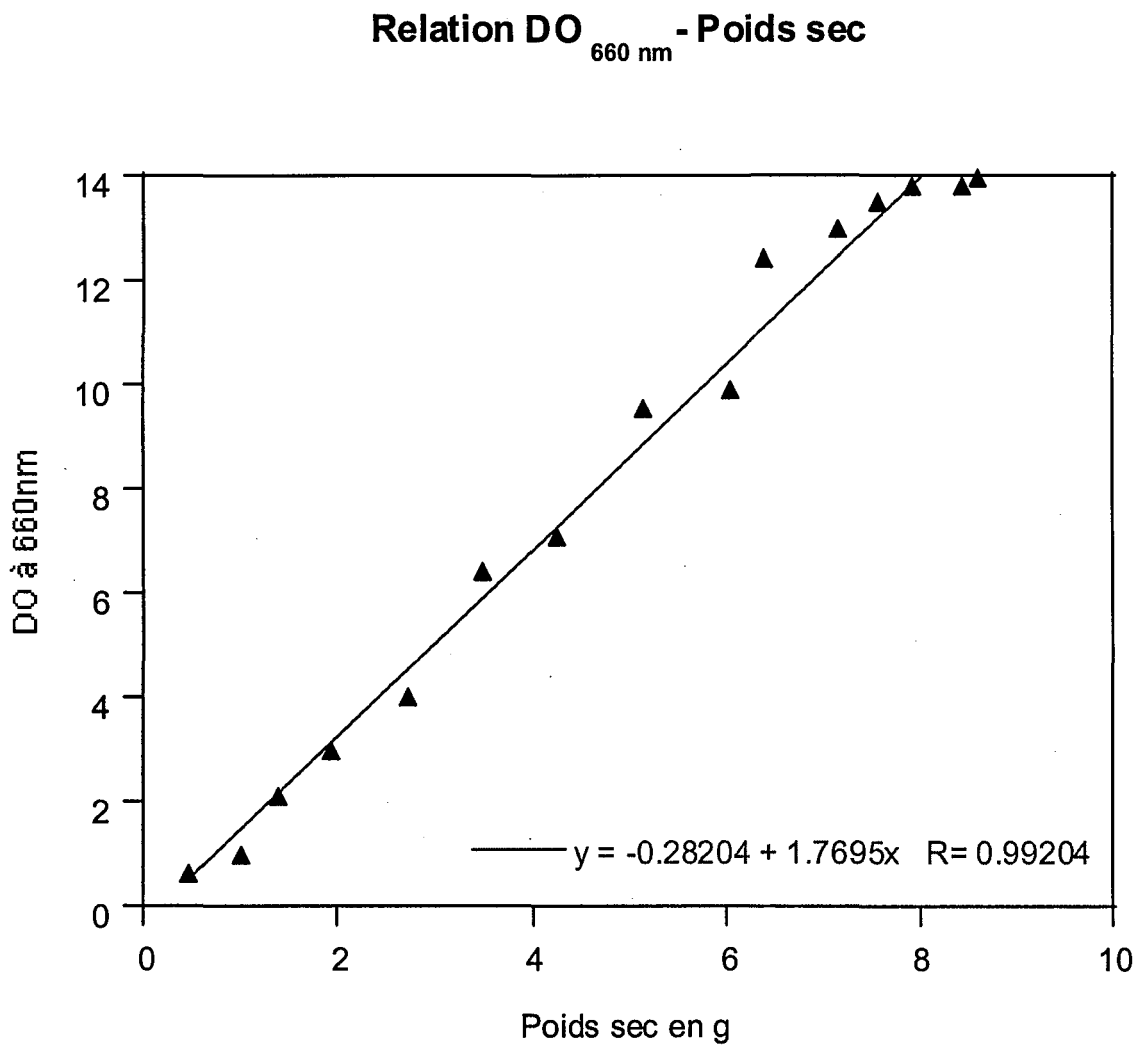
```
 IpDspImg(binor) ;
 IpDilate(binor, binl, 1L) ;
 IpDspImg(binl) ;
 /*RmShowMessage("erode ?") ;*/
 IpErode(binl, bink, 4L) ;
 IpDspImg(bink) ;
 /*RmShowMessage("Recons ?") ;*/
 IpRecon(binor, bink, binl) ;
 IpDspImg(binl) ; /* binl contient l'image binaire finale */
 IpMask(ngk, binl, maskk) ;
 IpDspImg(maskk) ;
 IpMask(ngl, binl, maskl) ;
 IpDspImg(maskl) ;
 /* Fermeture images binaires */
 IpCloseImage(binl) ;
 IpCloseImage(bink) ;
 IpCloseImage(binor) ;
 /* ouverture des images reelles */
 IpSetImageCode(format,I_FLOAT, 0) ;
 finale = IpOpenImage("finale",V_WRITE, format) ;
 floatl = IpOpenImage("floatl",V_WRITE, format) ;
 floatk = IpOpenImage("floatk",V_WRITE, format) ;
 nbl = format[2] ;nbc = format[1] ;
 /* Conversion en reelles pour faire la division */
 IpCnver(maskk, floatk) ;
 IpDspImg(floatk) ;
 /* calcul sur image k */
 Calcul(floatk, nbl, nbc, fichcom) ;
 /* calcul sur l */
 IpCnver(maskl, floatl);
 IpDspImg(floatl) ;
 Calcul(floatl, nbl, nbc, fichcom) ;
 /* division de l /k */
 IpAritimg(floatl, floatk, finale, V_DIV) ;
 /* Sortie des images pH non normalisée format float im5*/
 strcpy(dirbild, direc) ;
 strcat(dirbild,bildb) ;
 strcat(dirbild,"pH.im5" ) ;
 printf("pH : %s \n", dirbild) ;
 SaveData(IMAGE_DATA,finale,dirbild,1) ;
 /* calcul de la moyenne et de sigma sur image finale */
 Calcul(finale, nbl, nbc, fichcom) ;
 fprintf(fichcom, "\n") ;
 IpCloseAll() ;
}

Calcul(finale, nbl,nbc, fichcom)
/* Calcul de la moyenne sur l'image ena rguemnt  et sigma */
{
  long *num, c, l, compteur ;
  float *ligne , som, somcar, mean, sigma ;
  printf("Calculs en cours... ") ;
  IpDspImg(finale) ;
  ligne= CRmAllocTab(nbc) ;
  /* lecture par ligne */
```

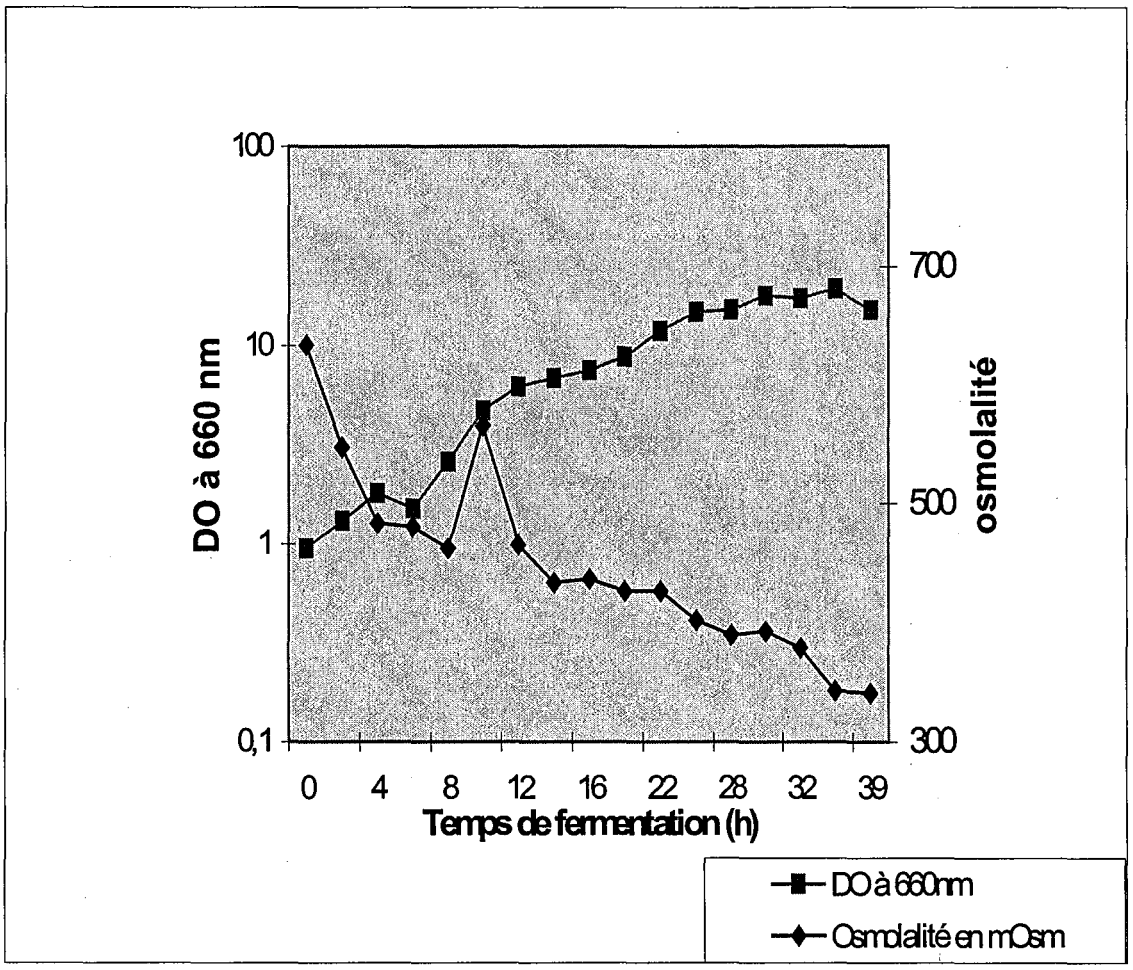
```
  som = 0.0 ; somcar = 0.0 ; compteur = 0 ;
  for (l = 1; l <= nbl; l++) {
    /*printf("%ld \n", l) ;*/
    lpReadRow(finale, l, 1L, &ligne ) ;
    for (c = 0; c < nbc; c++) {
       if (ligne[c] > 0.0 ) {
          som = som + ligne[c] ;
          somcar = somcar + ligne[c]*ligne[c] ;
          compteur++ ;
       }
    }

  }
  if (compteur != 0) {
    mean = som / compteur ;
    sigma = sqrt((somcar - mean*som)/ (compteur-1)) ;
  }
  else {
   mean = 0.0 ;
   sigma = 0.0 ;
  }
  printf(" %f +-  %f\n",  mean, sigma) ;
  fprintf(fichcom, "%f ; %f; ", mean, sigma) ;
}
```

Annexe 2 : Corrélation Densité optique à 660 nm-Poids sec



Annexe 3: Evolution de l'osmolalité du milieu MPS2 au cours de la culture:



A 15335.1 (8 pp)

Microbiology (2000), 146, 000–000 Printed in Great Britain

Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis

P. F. X. Corvini,[1] H. Gautier,[1] E. Rondags,[1] H. Vivier,[2] J. L. Goergen[2] and P. Germain[1]

Author for correspondence: J. L. Goergen. Tél: +33 383 59 58 44. Fax: +33 383 59 57 96.
e-mail: goergen@ensaia.inpl-nancy.fr
Jean-louis.

Laboratoire de Fermentations et de Bioconversions Industrielles[1], and Laboratoire des Sciences du Génie Chimique – CNRS[2], Institut National Polytechnique de Lorraine, 2 Avenue de la Forêt, de Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Intracellular pH (pH_i) is an essential parameter in the regulation of intracellular processes. Thus, its measurement might provide clues regarding the physiological state of cells cultivated *in vitro*. pH_i of the filamentous, pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* was determined by epifluorescence microscopy and image analysis using the pH-sensitive fluorescent probe BCECF-AM [2′,7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester]. Staining cell culture samples (OD_{660} = 1) of *S. pristinaespiralis* with 20 µM BCECF at 28 °C for 30 min yielded a green/red fluorescence ratio ($R_{527/600}$) that correlated with the pH_i of the cells for values ranging from 6·5 to 8·5. When *S. pristinaespiralis* was cultivated in pristinamycin-producing conditions (in batch mode, with a constant external pH of 6·8), the measured pH_i varied between 6·3 and 8·7. In fact, pH_i correlated with the excretion of pristinamycins and glucose consumption during the production process.

Keywords: intracellular pH, *Streptomyces pristinaespiralis*, epifluorescence microscopy, image analysis

INTRODUCTION

Pristinamycins belong to the synergistin family of antibiotics and are composed of two distinct groups of molecules, pristinamycins I (P_I) and pristinamycins II (P_{II}) (Preud'homme *et al.*, 1968), which act synergistically to exert their bactericidal action. For example in therapy against *Staphylococcus aureus* infection, it has been found that the most efficient ratio is 60% P_{II}/40% P_I (Videau, 1982). ① Pristinamycins are produced, in batch process, by a filamentous bacterium of the genus *Streptomyces* (Demain, 1999), namely *Streptomyces pristinaespiralis* (Rhône-Poulenc, 1961).

Because there has been an ever-increasing demand for antibiotics (new molecules and higher doses) over the last decade (Craig, 1996), the optimization of the existing processes and the modification (improvement) of bacterial strains by genetic engineering (Baltz, 1998) are of great interest. Fine optimization of the pristinamycin production process requires good knowledge of cell physiology during the fermentation. In the context of studies on the physiology of actinomycetes, research teams have focused on metabolic changes occurring when antibiotic biosynthesis takes place under the influence of numerous external factors (Paquet, 1990; Demain, 1972). Assuming the existence of a close link between morphology and secondary metabolite production, most reports on image analysis of filamentous micro-organisms, including *Streptomyces*, present their morphology (Paul & Thomas, 1998; Cox *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). Because *Streptomyces* filaments can have different morphologies (filaments, clumps and pellets), depending on culture conditions and the physiological state of cells, separate studies have been required to investigate the relationship between each morphological type and metabolite production by image analysis (Drouin *et al.*, 1997; Durant *et al.*, 1994a, b; Cox & Thomas, 1992). In addition, image analysis has been used to determine the location of respiration activity in *Streptomyces ambofaciens* filaments (Mauss *et al.*, 1997) and the leakage of cellular components through the membrane of *S. ambofaciens* using carbon gentian violet staining (Pons *et al.*, 1998).

Abbreviations: BCECF-AM, 2′,7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester; pH_i, intracellular pH; $R_{527/600}$, green/red fluorescence ratio (527/600 nm).

0002-4114 © 2000 SGM

① As 2/3 of all antibiotics,

Among the parameters controlling metabolic activities, intracellular pH (pH_i) plays a major role in the regulation of enzyme activities and transport kinetics of nutrients and metabolites. Furthermore, the pH gradient across cell membranes (ΔpH) is related to cellular energetic mechanisms such as ATP generation (Leyval *et al.*, 1997; Imai & Ohno, 1995). pH_i assessment in eukaryotic cells is now well documented in the literature; fluorescent probes coupled to spectrofluorometric methods and image analysis techniques have been successfully used to investigate pH_i of several cell lines (Heiple & Taylor, 1980; Slavik, 1983; Paradiso *et al.*, 1987; Dix & Verkman, 1990; Cherlet *et al.*, 1999). On the other hand, pH_i determination in prokaryotic cells by means of flow cytometry (Leyval *et al.*, 1997) or microscopy coupled to image analysis tools (Siegumfeldt *et al.*, 1999) remains sparse and pH_i assessment in filamentous bacteria, such as *S. pristinaespiralis*, has not been reported so far. Due to a limited resolution time for distribution measurement of labelled weak acids or bases and NMR methods, other techniques must to be considered for such studies. However, because most *Streptomyces* species tend to grow as pellet and filamentous forms in submerged culture (Whitaker, 1991), flow cytometry cannot be used. Therefore, epifluorescence microscopy combined to image analysis has emerged as an alternative method.

In this study a protocol was developed for pH_i measurement in the pristinamycin-producing species *S. pristinaespiralis* by epifluorescence microscopy and image analysis using the fluorochrome BCECF-AM [2′,7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester]. A second consideration concerns the methodology applied to monitor the variations of pH_i during pristinamycin-producing batch culture of *S. pristinaespiralis*.

METHODS

Bacterial strain. *Streptomyces pristinaespiralis* mutant strain Pr11 was used for all experiments and was obtained from the Rhône-Poulenc-Rorer research centre, Vitry sur Seine, France.

Media. The following media were used in this study. Complex medium (g l^{-1}): sucrose, 15; corn steep (Roquette), 5; $(NH_4)_2SO_4$, 10; K_2HPO_4, 1; NaCl, 3; $MgSO_4.7H_2O$, 0·2; $CaCO_3$, 1·25; pH 6·8; sterilized for 20 min at 120 °C. Synthetic medium (g l^{-1}): glucose, 30; malonic acid, 7·5; L-arginine, 3; L-glutamate, 1·5; K_2HPO_4, 0·75; $MgSO_4.7H_2O$, 0·3; $FeSO_4.7H_2O$, 15; $ZnSO_4.7H_2O$, 0·55; $CaCl_2.2H_2O$, 0·4; 3-morpholinopropanesulfonic acid, 20; pH 6·8; sterilized for 20 min at 110 °C. K_2HPO_4 and $CaCl_2$ in concentrated solutions were sterilized by filtration on 0·22 μm filters (Millipore) and added separately to avoid precipitation. All chemicals were analytical grade.

Culture conditions. Inocula were prepared by pouring 0·8 ml of a thawed spore solution calibrated at 3×10^8 c.f.u. l^{-1} into 500 ml baffled shake flasks containing 80 ml complex medium. Flasks were shaken at 250 r.p.m. and 28 °C for 44 h using an orbital shaker (Ika).

Bacteria used during the experiments dedicated to method development were grown in 300 ml Erlenmeyer flasks, whereas monitoring of pH_i of pristinamycin-producing *S. pristinaespiralis* was performed on cultures grown in a 2 l bioreactor (CMF 100; Alpha-Laval-Chemap). Inocula (2 ml) were poured in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml synthetic medium. Cells were grown with agitation at 250 r.p.m. and 28 °C. For bioreactor batch cultures, 80 ml preculture was inoculated into 2 l synthetic medium at 28 °C. The oxygen level was maintained at a minimum of 30 % of air saturation and controlled through stirring conditions. Agitation with Rushton impellers ranged between 300 and 1500 r.p.m.

Cell staining. All experiments were carried out at 4 °C in a dark room. Stock solutions (50 μl samples) of 1 mM BCECF-AM (Molecular Probes) in DMSO were stored in the dark at −20 °C. Culture samples were directly diluted in PBS to obtain a final OD_{660} of 1·0. Cells were incubated at 28 °C on a rotary shaker with different concentrations of BCECF-AM (2·5–50 μM) for incubation times ranging from 0 to 40 min.

***In vivo* calibration.** The [H^+-K^+] carboxylic ionophore nigericin and neutral ionophore valinomycin (Sigma) were used for pH_i calibration as described elsewhere (Musgrove *et al.*, 1986; Pressman, 1976). Nigericin was dissolved in absolute ethanol and valinomycin in DMSO at final concentrations of 1 and 10 mM, respectively. Both solutions were stored at −20 °C. The cells used for the establishment of calibration curves were stained as described above. After a 30 s centrifugation at 6000 *g* and the removal of supernatant, cells were resuspended in high [K^+] buffers at different pH values (6·5–8·5). High [K^+] buffers were obtained by mixing appropriate quantities of 135 mM KH_2PO_4/20 mM NaOH and 110 mM K_2HPO_4/20 mM NaOH. Buffer solutions were filtered before use through 0·22 μM filters and stored at 4 °C. When stated, osmolality of each buffered solution (measured with a Roebling osmometer) was adjusted to that of the fermentation broth by adding xylose. Nigericin was added at a final concentration ranging from 5 to 40 μM for 10 min. Valinomycin was added simultaneously to 20 μM nigericin at concentrations varying from 0 to 10 μM for different incubation times (5–30 min). Cells were then centrifuged again as described above, resuspended in the same high [K^+] buffer and kept on ice.

Double emission ratio technique. An epifluorescent microscope (DMRB; Leica Leitz) with ×10 magnification and a 0·30 numerical aperture PL Fluotar objective was used. The final magnification was ×100, because of the camera and the ×10 magnification of the objective. The light source was a 50 W Hg lamp (Osram). Excitation and emission band pass filters were assembled. Whereas the excitation filter was the same for both modules (480/40 nm), two different emission filters were used: 527/30 nm (green) and 600/40 nm (red). Stained cells (20 μl) were carefully spread onto a glass slide. After the 527 nm image (green image) was taken and saved, another image of the same field (same pellet) was acquired at 600 nm (red image). Photobleaching of the stained samples was considered as negligible because only a 5 % decrease in fluorescence intensity was registered after five ratio measurements on the same field (10 successive excitations). Autofluorescence of the cells was shown to have no influence on the calculated ratio, since the mean fluorescence ratio at 527/600 nm ($R_{527/600}$) was 1·00 (SD < 0·01) and pixel level intensity was inferior to image processing threshold values. No correlation could be found between ratio values and pellet size, suggesting that the methodology can be used for pellets of different sizes. For each experiment, 20–30 images were recorded at each emission wavelength. Error bars on the graphs represent the SD of mean $R_{527/600}$ values.

Image processing. An integrated controlled CCD monochrome camera (Cohu) was fitted onto the epifluorescence

microscope. It was controlled via a PC through an acquisition card (Secad Vision) which allowed capture of 768 × 576 pixel TIFF images coded on 256 grey levels. The integration time was set to 25 ms for each image. Image treatment was carried out on a PC using professional image analysis software (Visilog; Noesis).

The aim was to obtain images with pixel values directly connected to the pH_i value (pH image) by using the double ratio technique described. The first part of the treatment deals with the segmentation of these images. This operation was carried out by an automatic thresholding technique based on image entropy. Concerning the image, entropy is maximum for an equally distributed grey level histogram and equal to zero for an image with only one grey level. This technique is used to segment images into two regions by maximizing the total entropy (Coster & Chermant, 1989). It has been shown that such a segmentation best fits images containing pellets (Pons & Vivier, 1999). Consequently, two binary images were obtained, one for each initial grey level image. The binary image only contains the relevant information (object), with pixels set to 1 and background pixels set to 0. Then, a logical operation (intersection) between these images gives a single binary image representing the common part of the initial images. After morphological operations (dilation and reconstruction) to eliminate artefacts due to the thresholding, a final binary image is obtained and used as a mask for further operations. Masking is a point operation between a grey level and a binary image that produces a grey level image. In such an image, only pixel parts of the object (i.e. the pellet) are visible in grey level, the background pixels being set to black (0). Then, both grey level images (527 and 600 nm) were masked and the mean grey levels of the pellets and the SD values were computed. These values are good indicators of the quality of calibration images and they were used as criteria for the final pH calculation. Finally, after transformation in floating point images to allow arithmetic operations, a pixel to pixel division between images was performed to get the pH image. Mean grey level and SD values were also calculated on this final image to give values related to pH_i.

Additional analytical methods. During batch fermentations samples were collected to determine glucose, pristinamycin and dry weight biomass levels.

OD_{660} was measured according to the method of Lubbe *et al.* (1985) by means of a Beckman spectrophotometer, DU 7500.

Dry weight biomass was determined gravimetrically by filtering 10 ml fermentation broth on pre-weighed 0·45 μm cellulose acetate membranes (Sartorius). Membranes were washed twice with 0·85 % NaCl and placed in an oven at 100 °C for 12 h before being weighed again. An OD_{660} vs dry weight correlation curve allowed dry weight biomass determination.

Pristinamycins were extracted and analysed by HPLC as described by Thibaut *et al.* (1995) with a Spectra-Physics HPLC system.

Glucose concentration was determined by HPLC according to the protocol described by Rondags *et al.* (1998).

RESULTS

Method development

Microscopic and morphological parameters. Due to the characteristics of the genus *Streptomyces*, *S. pristinaespiralis* tends to grow as a pellet of several hundred micrometers in submerged culture. Moreover, during the pristinamycin production process, most of the cells are aggregated and form small pellets. Consequently, pH_i was determined only on pellets, the predominant morphological form in this study.

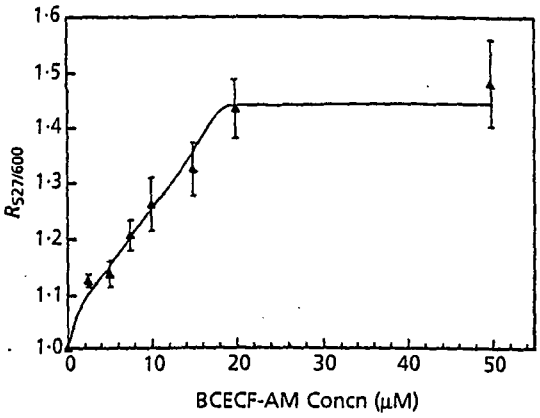


Fig. 1. $R_{527/600}$ of stained pellets (30 min) of *S. pristinaespiralis* as a function of BCECF-AM concentration.

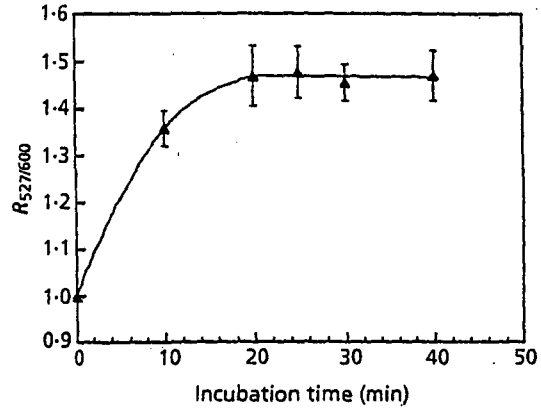


Fig. 2. $R_{527/600}$ of stained pellets of *S. pristinaespiralis* as a function of incubation time with 20 μM BCECF-AM.

Because magnifications of ×1000 and ×400 led to a dramatic photobleaching of the fluorescent probe, a final magnification of ×100 was chosen. Using this magnification, a 25 ms exposure time was used to capture images.

Optimization of the BCECF-AM staining technique. The protocol for pH_i measurement was first optimized by testing the effect of various dye concentrations and staining times on the measured fluorescence of *S. pristinaespiralis*. Cell samples were submitted to increasing concentrations of BCECF-AM, from 1 to 60 μM, for 30 min at 28 °C. The measured mean $R_{527/600}$ values of the samples are reported in Fig. 1.

For fluorochrome titres below 20 μM, the fluorescence ratio varies with the dye concentration, whereas at higher concentrations it remains rather constant. Because titres over 20 μM gave an increasing SD and an

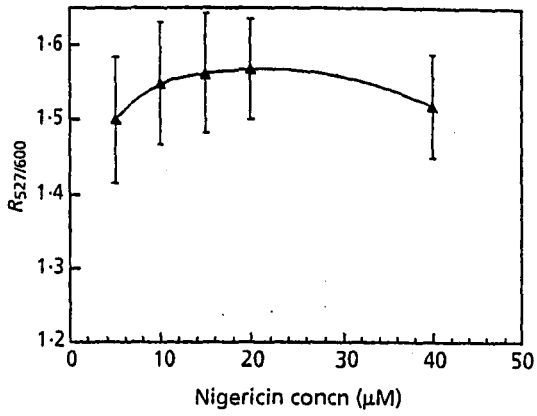


Fig. 3. $R_{527/600}$ of stained pellets (20 μM BCECF-AM, 30 min) of *S. pristinaespiralis* suspended in pH 7·0 high [K⁺] buffer as a function of nigericin concentration. The cells were incubated for 10 min with the ionophore.

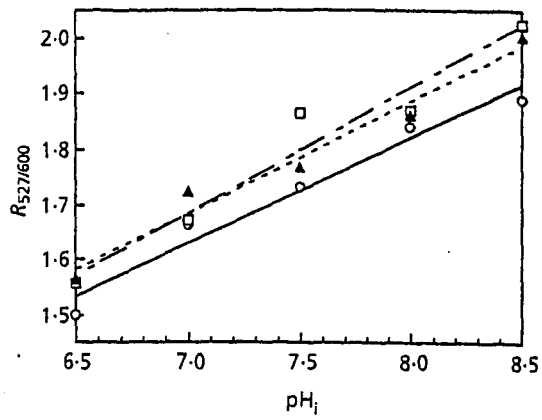


Fig. 4. Calibration curve of *S. pristinaespiralis* ($R_{527/600}$ vs pH_i). The calibration curve was determined in triplicate using three different cultures of growing cells sampled after 24 h.

important stain release, 20 μM BCECF-AM was retained as a compromise concentration for further experiments. The optimized staining time with the fluorescent dye was determined using the same criteria (Fig. 2): 30 min staining was chosen for further experiments.

***In vivo* calibration.** The effect of nigericin concentration was first assessed on stained samples suspended in high [K⁺] buffer (pH 7·0) (Fig. 3). The optimal nigericin concentration was found to be 20–30 μM, since concentrations above or below reduced the $R_{527/600}$ values. Concentrations higher than 40 μM lead to cell lysis. However, the $R_{527/600}$ SD values found for different nigericin titres remained rather high. In addition, cell suspensions in high [K⁺] buffers at different pH values (ranging from 6·5 to 8·5) using only nigericin did not show a linear relationship between $R_{527/600}$ and external pH.

Thus, the effect of simultaneous addition of 20 μM nigericin and valinomycin concentrations ranging from 0 to 10 μM on the $R_{527/600}$ values of the cells was assessed. It appeared that valinomycin at low concentrations had no significant influence on ratio values, but the heterogeneity of pellet $R_{527/600}$ values was diminished considerably, i.e. at 1 μM valinomycin the SD of the mean ratio was reduced fivefold (1·41 ± 0·1) compared to the assay without valinomycin (1·43 ± 0·5). When higher valinomycin concentrations were used, dye was released, which considerably decreased the precision of the measurements. An investigation into the sequence of ionophore addition revealed that the best combination was a simultaneous addition of nigericin and valinomycin (data not shown). Thus, simultaneous addition of 20 μM nigericin and 1 μM valinomycin was chosen for further experiments.

To optimize the ionophore incubation time, suspensions of *S. pristinaespiralis* were stained with BCECF-AM and incubated with 20 μM nigericin/1 μM valinomycin at 28 °C in high [K⁺] buffer (pH 7·0) for times varying from 10 to 30 min. $R_{527/600}$ was constant (1·46 ± 0·05) whatever

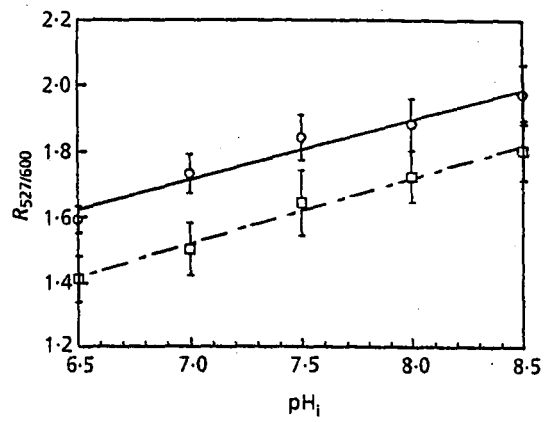


Fig. 5. Calibration curves for pellets having a mean 600 nm grey level ranging between 20 and 25 (□), and 25 and 30 (○).

incubation time was used. On this basis, a 10 min incubation time was chosen for further experiments.

For the calibration of the technique, cells were resuspended in high [K⁺] buffers at different pH values ranging from 6·5 to 8·5. The osmolality of the buffers was adjusted to that of the culture medium by means of xylose to avoid osmotic shock. Nigericin and valinomycin were added to the samples to equilibrate the pH_i of the stained cells to the pH of the surrounding buffer.

Calibration curves – green/red fluorescence ratios vs pH – were established for three samples of growing cells sampled after 24 h culture (Fig. 4). After being captured by the monochrome camera, image analysis showed that the equation of the calibration curve was slightly different for pellets with grey level images between 20 and 25, and between 25 and 30, at 600 nm. Thus, two calibration curves were used. One curve was drawn for pellets having mean grey levels between 20 and 25 at 600 nm and another was determined for mean grey levels between 25 and 30 (Fig. 5). For pellets with grey

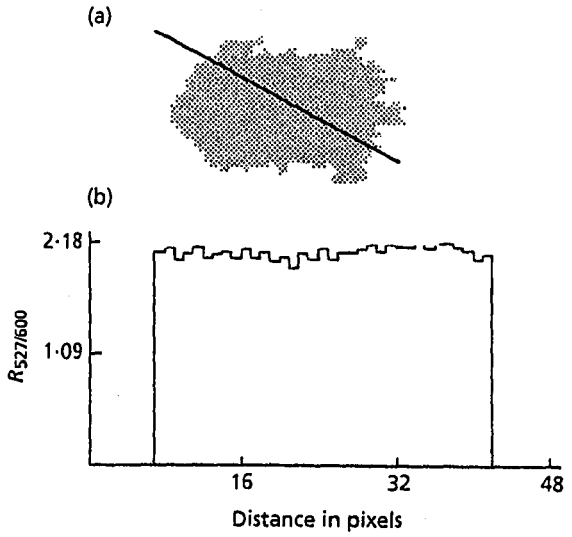


Fig. 6. $R_{527/600}$ profile along the straight line of a calibration pH image. (a) Line drawn on a pellet pH image. (b) $R_{527/600}$ values as a function of the distance in pixels along the straight line.

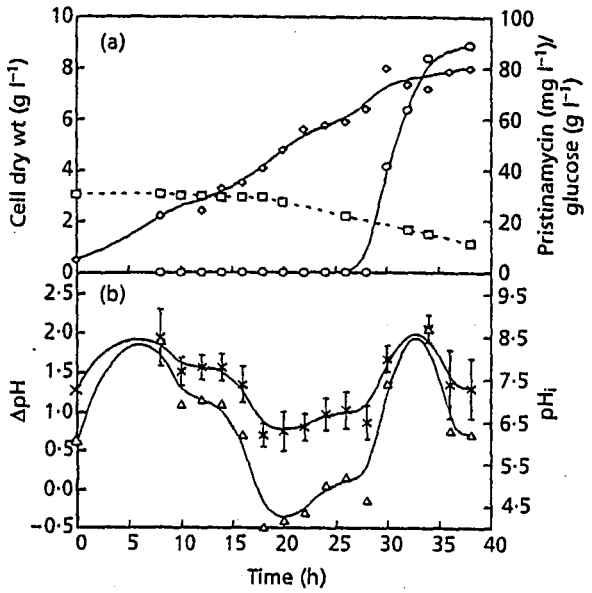


Fig. 7. Properties of *S. pristinaespiralis* cultivated in batch mode in a 2 l bioreactor. (a) Dry weight biomass (◇), glucose concentration (□) and pristinamycin profiles (○). (b) pH_i (×) and ΔpH (△) profiles. Error bars represent the SD of mean pH_i values. Thirty pellet images were recorded at each wavelength.

levels at 25 at 600 nm, pH_i values were calculated using both equations.

Interestingly, calibration curves established for bacteria sampled at different culture times showed the same relationship between $R_{527/600}$ and pH_i, indicating that the age of the *S. pristinaespiralis* culture has no influence on the *in vivo* calibration.

To investigate a possible effect of the three-dimensional size and shape of the pellets on axial resolution (depth of field), topographic sections across pH pellet images were taken (Fig. 6a). If there was an effect, a central pixel displaying a pH_i similar to another at the periphery of the pellet would have a higher $R_{527/600}$. In fact, as shown in Fig. 6(b), the mean $R_{527/600}$ values of the peripheral pixels (at the termini of the straight line) were identical to the values of the pixels from the centre of the pellet (middle of the line), indicating that the surface fluorescence is not affected by the depth of the pellet. Pellets presented a homogeneous pH_i over a large part of their surface and the SD of mean $R_{527/600}$ values for pixels of a given pH_i remained very low over the whole surface of the pellets.

Using these experimental conditions, pH_i was determined with satisfactory precision, since the error did not exceed 0·3 pH units for pH_i values between 6·5 and 8·5.

Bioreactor batch culture of pristinamycin-producing *S. pristinaespiralis*

The protocol presented for pH_i determination was applied to the pristinamycin-producing *S. pristinaespiralis* grown under stable pH conditions (external pH 6·8). To evaluate growth, glucose consumption, pristinamycin production and pH_i of *S. pristinaespiralis*, a bioreactor was operated in batch mode over a 40 h period (Fig. 7a, b). The pH_i of the pellets of each culture sample was calculated with the calibration curve corresponding to the mean grey level at 600 nm. The dry weight biomass level, initially 0·4 g l^{-1}, increased to reach a maximum of 8·0 g l^{-1} within 40 h (Fig. 7a). Growth stopped independently of carbon limitation as the glucose concentration was still around 20 g l^{-1} at that time.

Contrary to the external pH, pH_i showed important variations during the course of fermentation (Fig. 7b). Starting from an initial value of 7·2, pH_i quickly increased to values around 8·2 during the first 10 h. Then it dramatically decreased, to reach 6·2 after 17 h culture. This value remained stable for a 10 h period and finally came back to near its initial value during the last period of the process. Further pH_i determinations during the stationary phase were not possible due to significant probe leakage. Because the extracellular pH was quite constant around 6·8, the pH_i and ΔpH profiles were similar during the batch process. As seen, the cells were capable of maintaining a positive ΔpH throughout the culture period, except during the 10 h period preceding the excretion phase.

This culture was performed in triplicate (data not shown) and identical pH_i profiles were observed, though minor differences regarding the pH_i values were obtained during the three processes (± 0·4 pH units).

DISCUSSION

The first aim of this study was to develop a new method for the measurement of pH_i in filamentous streptomycetes. Because flow cytometry cannot be used for filamentous bacteria, and NMR or radiolabelled weak acid/base distribution analyses are even more difficult and tedious techniques requiring high cell densities and specific materials, an image-analysis-based fluorometric method was developed.

The fluorochrome BCECF-AM, with a pK_a of 7·0, was found to be efficient for pH_i determination of neutrophilic bacteria, such as *S. pristinaespiralis*, grown in a bioreactor: the fluorescence was proportional to the pH_i of the cells between pH values of 6·5 and 8·5, and the fluorescence of the stained cells was stable for at least 30 min.

During this study only pellets of *S. pristinaespiralis* were taken into account because the bacteria mainly grow in this form during the pristinamycin-producing process. Another reason for this choice is that the origin of dispersed filaments present in the culture medium is not always clear. They can be present as a consequence of the alteration of fluffy pellets caused by shearing forces produced by the increased agitation necessary for the regulation of dissolved oxygen. Moreover, simultaneous analysis of all morphologies present in the culture has been reported to be impossible since a ×100 oil immersion objective (×1000 final magnification) generally requires the use of coverslips for filament analysis which can disturb the physiology of the cells in the pellets (Nielsen *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1998).

The pH_i of *S. pristinaespiralis* cells only from the surface of the pellets (projected area) was considered. In fact, surface cells within the pellets can be considered as the most active cells because pellets have been described to have hollows in their centre (Thomas, 1992). These hollows form due to cell necrosis as a result of limitations in oxygen and nutrients.

In vivo calibration is essential to avoid response variability due to differences in microscope focusing between BCECF solutions (*in vitro* calibration) and BCECF-AM-stained pellets.

Satisfactory correlation coefficients and linearity were found with the proposed nigericin-valinomycin protocol over the pH 6·5–8·5 range. Contrary to the results of Boyarsky *et al.* (1996a, b) using eukaryotes, enough K^+ was able enter the pellets to equilibrate extracellular and pH_i, even at basic pH values. Addition of xylose, resulting in increased osmolality of high $[K^+]$ buffers, could be used to avoid K^+ efflux in response to hypotonic shock. Such inward or outward cationic fluxes have been described in response to medium osmolality changes (Guillouet, 1996). One explanation for the efficient combination of valinomycin and nigericin at these concentrations could be their overwhelming action on mechanisms of cell regulation, allowing equal distribution of K^+ at intracellular and extracellular levels, without any residual K^+ gradient, contrary to the results of Boyarsky *et al.* (1996a, b).

Slight differences in 600 nm pixel intensity for images of pellets resuspended in buffer with the same pH could generate slightly different $R_{527/600}$ ratios, as seen during this study. Differences in staining have been reported for cells having different esterase activities in the culture (Franck *et al.*, 1996). However, the difference in 527 nm fluorescence should have been of the same order. One explanation could be a different sensitivity of the camera, which is described as more efficient around 527 nm, at the two wavelengths. Another reason is that 600/40 nm fluorescence is not really an isosbestic point (Franck *et al.*, 1996). Actually, this artefact could be corrected using two different calibration curves, according to the level of fluorescence at 600 nm.

The advantage of the image analysis algorithm developed here is that it does not modify any pixel level. This results in the collection of unmodified data and it gives a more accurate estimation of actual pH_i. Since fluorescence was pellet-area-independent, contrary to other studies dealing with morphology by image analysis (Sieracki *et al.*, 1989; Durant *et al.*, 1994a, b), no delimitation problems were encountered by using an automated entropy threshold. The simplicity and rapidity (less than 1 min for calculation) of this procedure are favourable to on-line routine analysis during fermentation processes.

This paper presents for the first time a method for the determination of pH_i of filamentous bacteria by means of epifluorescence microscopy and image analysis using a pH-sensitive fluorescent probe. Although a positive control was not employed during this study (use of a bacteria with a known pH_i), the different tools and techniques utilized have already been reported to be efficient for the determination of pH_i in bacteria. First, BCECF is a valuable fluorochrome to determine pH_i since it has been shown to perfectly corroborate ^{31}P-NMR spectroscopy data obtained for *Propionibacterium acnes* (Futsaether *et al.*, 1993). Moreover, Slavik (1997) has shown that the BCECF emission ratio technique can be employed for confocal microscopy to determine pH. In addition, pH_i determination of *Listeria innocua* using epifluorescence microscopy and image analysis (Siegumfeldt *et al.*, 1999) confirmed the results obtained by spectrofluorimetry (Breeuwer *et al.*, 1996).

During this study, the pH_i of *S. pristinaespiralis* grown in batch culture was measured by an image analysis-based method using the fluorochrome BCECF-AM at a final concentration of 20 μM at 28 °C and for 30 min. As shown, pH_i could be correlated to pristinamycin excretion and glucose consumption in batch process. In fact, pH_i was found to be a good marker of the physiological state of the cells cultivated under pristinamycin-producing conditions. Furthermore, pH_i assessment can contribute to the understanding of variations in carbon fluxes through the enzymes involved in glucose metabolism, and ΔpH calculation may help in the

establishment of kinetic models for excretion and consumption of metabolites. Finally, the new method presented in this paper for pH_i assessment of *S. pristinaespiralis* could be extended to filamentous bacteria of fungal cells cultivated *in vitro*, provided that the staining protocol was adapted to each cell line.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Dr M. N. Pons for her expert remarks and advice and to the Rhône-Poulenc-Rorer company (Vitry-France) for providing the micro-organism. This research was supported by the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

Baltz, R. H. (1998). Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol* 6, 76–83.

Boyarsky, G., Hanssen, C. & Clyne, L. A. (1996a). Inadequacy of high K^+/nigericin for calibrating BCECF II. Intracellular pH dependence of the correction. *Am J Physiol* 271, 1146–1156.

Boyarsky, G., Hanssen, C. & Clyne, L. A. (1996b). Superiority of *in vitro* over *in vivo* calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 10, 1205–1212.

Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Rombouts, F. M. & Abee, T. (1996). A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl Environ Microbiol* 62, 178–183.

Cherlet, M., Franck, P., Nabet, P. & Marc, A. (1999). Development and validation of a methodology for intracellular pH measurements of hybridoma cells under bioreactor culture conditions. *Biotechnol Prog* 15, 630–639.

Coster, M. & Chermant, J. P. (1989). Traitement des images en niveau de gris. In *Précis d'Analyse d'Images*, pp. 387–395. Paris: Presse du CNRS.

Cox, P. W. & Thomas, C. R. (1992). Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol Bioeng* 39, 945–952.

Cox, P. W., Paul, G. C. & Thomas, C. R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology* 144, 817–827.

Craig, W. A. (1996). Antimicrobial resistance issues of the future. *Diagn Microbiol Infect Dis* 25, 213–217.

Demain, A. L. (1972). Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *J Appl Chem Biotechnol* 22, 345–362.

Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of micro-organisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 455–463.

Dix, A. & Verkman, A. S. (1990). Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by *ratio* imaging. Application to cytoplasmic viscosity. *Biophys J* 57, 231–240.

Drouin, J. F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H., Pons, M. N. & Germain, P. (1997). Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. *Biotechnol Tech* 11, 819–824.

Durant, G., Cox, P. W., Formisyn, P. & Thomas, C. R. (1994a). Improved image analysis algorithm for the characterization of mycelial aggregates after staining. *Biotechnol Tech* 8, 759–764.

Durant, G., Crawley, G. & Formisyn, P. (1994b). A simple staining procedure for the characterization of basidiomycetes pellets by image analysis. *Biotechnol Tech* 11, 395–400.

Franck, P., Petitpain, N., Cherlet, M., Dardenne, M., Maachi, F., Schutz, B., Poisson, L. & Nabet, P. (1996). Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM. *J Biotechnol* 46, 187–195.

Futsaether, C. M., Kjeldstad, B. & Johnson, A. (1993). Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes* : comparison between the fluorescent probe BCECF and ^{31}P-NMR spectroscopy. *Can J Microbiol* 39, 180–186.

Guillouet, S. (1996). *Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum sous stress osmotique*. PhD thesis, INPL-Nancy, France.

Heiple, J. M. & Taylor, D. L. (1980). Intracellular pH in single motile cells. *J Cell Biol* 86, 885–890.

Imai, T. & Ohno, T. (1995). Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J Biotechnol* 38, 165–172.

Leyval, D., Debay, F., Engasser, J. M. & Goergen, J. L. (1997). Flow cytometry for the intracellular pH measurement of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*. *J Microbiol Methods* 29, 121–127.

Lubbe, C., Demain, A. L. & Bergman, K. (1985). Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 22, 424–427.

Mauss, P., Drouin, J. F., Pons, M. N., Vivier, H., Germain, P., Louvel, L. & Vanhoutte, B. (1997). Location of respiration activity in filamentous bacteria by image analysis. *Biotechnol Tech* 11, 813–817.

Musgrove, E., Rugg, C. & Hedley, D. (1986). Flow cytometry measurement of cytoplasmic pH : a critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry* 7, 347–355.

Nielsen, J., Johansen, C. L., Jacobsen, M., Krabben, P. & Villadsen, J. (1995). Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol Prog* 11, 93–98.

Paquet, V. (1990). *Mise en evidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez Streptomyces pristinaespiralis*. PhD thesis, INSA, Toulouse, France.

Paradiso, A. M., Tsien, R. Y. & Machen, T. E. (1987). Digital image processing of intracellular pH in gastric oxyntic and chief cells. *Nature* 325, 447–450.

Paul, G. C. & Thomas, C. R. (1998). Characterization of mycelial morphology using image analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 60, 1–59.

Pons, M. N. & Vivier, H. L. (1999). Biomass quantification by image analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 66, 135–183.

Pons, M. N., Drouin, J. F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H. & Germain, P. (1998). Physiological investigations by image analysis. *J Biotechnol* 65, 3–14.

Pressman, B. C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* 45, 501–530.

Preud'homme, J., Tarridec, P. & Belloc, A. (1968). Pristinamycine: isolement, caractérisation et identification des constituants. *Bull Soc Chim Fr* 2, 585–591.

Rhône-Poulenc (1961). *Procédé de préparation d'un antibiotique par une nouvelle souche de Streptomyces*. French Patent no. 1-301-857.

Rondags, E., Halliday, E. & Marc, I. (1998). Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* spp *lactis* bv.

diacetylactis. Study of α-acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. *Appl Biochem Biotechnol* 69, 113–125.

Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B. & Jakobsen, M. (1999). Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacteria cells in mixed cultures. *Microbiology* 145, 1703–1709.

Sieracki, M. E., Reichenbach, S. E. & Webb, K. L. (1989). Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. *Appl Environ Microbiol* 55, 2762–2772.

Slavik, J. (1983). Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. *FEBS Lett* 156, 227–230.

Slavik, J. (1997). Application of fluorescent probes in cellular biology. Measurement of intracellular pH. *J Lumin* 72, 575–577.

Thibaut, D., Ratet, N., Bisch, D., Faucher, D., Debussche, L. & Blanche, F. (1995). Purification of the two-enzyme system catalysing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin II_B during the last step of pristinamycin II_A biosynthesis. *J Bacteriol* 177, 5199–5205.

Thomas, C. R. (1992). Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *Trends Biotechnol* 10, 343–348.

Videau, D. (1982). Etude de l'activité bactéricide de la pristinamycine. *Pathol Biol* 30, 529–534.

Whitaker, A. (1991). Actinomycetes in submerged culture. *Appl Biochem Biotechnol* 32, 23–35.

Yang, K. Y., Morikawa, M., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K. I., Nihira, T. & Yamada, Y. (1996). Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J Ferment Bioeng* 81, 7–12.

Received 14 March 2000; revised 19 June 2000; accepted 12 July 2000.

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 DUSART Jean, Centre for protein engineering, Institut of Chemistry, Belgique
Monsieur LEBRIHI Ahmed, Professeur, ENSAT, Auzeville-Tolosane

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CORVINI Philippe

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

« Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du PH intracellulaire»

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES »**

Fait à Vandoeuvre, le 19 octobre 2000
Le Président de l'I.N.P.L.,
J. HARDY

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé :

L'amélioration de la production de métabolites d'intérêt industriel fait actuellement l'objet d'une stratégie rationnelle par génie métabolique. Ce domaine ne se restreint pas à quelques manipulations génomiques des cellules productrices. Il fait aussi appel à une approche de la physiologie des micro-organismes. Afin d'orienter les manipulations génétiques nécessaires à l'amélioration des performances des souches, il est nécessaire de connaître le métabolisme. Dans ce contexte, une partie du métabolisme de la source de carbone (glucose) par *Streptomyces pristinaespiralis* (bactérie filamenteuse) a été étudiée en relation avec la production de pristinamycines. Dans un premier temps, des activités enzymatiques du métabolisme central ont été mesurées *in vitro* au cours de cultures discontinues et ont montré une baisse générale du contenu enzymatique précédemment à l'excrétion de l'antibiotique. Un paramètre physiologique fondamental est le pH intracellulaire (pHi) qui est non seulement susceptible de conditionner les activités enzymatiques *in vivo*, mais rend compte également du métabolisme établi à l'intérieur des cellules. Une méthode originale de détermination du pHi par microscopie à épifluorescence et analyse d'image a été développée. Son application durant des cultures en bioréacteur discontinu a révélé d'importantes variations de ce paramètre, notamment en relation avec la production de pristinamycines et l'excrétion massive de succinate et de lactate. Enfin l'ensemble des paramètres a été mesuré pour différents taux de dilutions lors de cultures continues. Les résultats ont mis en évidence un phénomène de production cyclique de pristinamycines lié à la répression qu'elles exercent sur leur propre biosynthèse. Le mode continu a permis de quantifier les niveaux d'enzymes présents et les fluctuations du pHi pour différent taux de croissance de cellules non productrices d'antibiotiques.

Mots clés : *Streptomyces pristinaespiralis*, Pristinamycines, Activités Enzymatiques, Microscopie à Epifluorescence, Analyse d'Image, pH intracellulaire, Glucose, Acides Organiques.

Title :

Physiological study of *Streptomyces pristinaespiralis*, a pristinamycins producing strain : Central metabolism enzymes activities and intracellular pH measurements.

Summary :

In the last decade, a new rational strategy for fine optimization of industrial interest metabolites production has been achieved by means of metabolic engineering. This field does not only limits to ponctual genomic manipulations in the producing cells, but requires a deeper insight of their physiology. In this context, a part of carbohydrate (glucose) metabolism in the pristinamycins producing *Streptomyces pristinaespiralis* has been investigated during trophophase and idiophase. Specific activities for some enzymes belonging to the central metabolism were assayed during batch cultures and showed a general diminution before the antibiotic being excreted. Another basic physiological parameter is the intracellular pH (pHi), which not only affects enzymatic activities but also provides informations about intracellular metabolism. A novel method for its determination has been developped by means of epifluorescence microscopy combined to image analysis. pHi during batch fermentations undergone severe fluctuations correlated to pristinamycins production and to succinate and lactate excretions. Finally all parameters measurements were performed during different dilution rates chemostat. Cyclic productions of pristinamycins were observed due to the pristinamycins repression on their own synthesis. This study allowed quantification of enzymatic contents for different growth rates of non producing cells and revealed pHi changes of a lesser magnitude.

Keywords : *Streptomyces pristinaespiralis*, Pristinamycins, Enzymatic Activities, Epifluorescence Microscopy, Image Analysis, Intracellular pH, Glucose, Organic Acids.

Discipline : Biotechnologies et Industries alimentaires. Spécialisation en microbiologie industrielle.

Laboratoire des Bioprocédés Agroalimentaires (LABIAL), Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), 2 avenue de la Forêt de Haye 54505 Vandoeuvre lès Nancy Cedex.