



HAL
open science

Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis* :

Sophie Saffroy

► **To cite this version:**

Sophie Saffroy. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*:. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL007N . tel-01752551

HAL Id: tel-01752551

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752551>

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.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire Biocatalyse - Bioprocédés

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Présentée et soutenue publiquement

par

Sophie SAFFROY

Sujet :

Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*

Directeur de thèse : Professeur Pierre GERMAIN

Co-directeur de thèse : Stéphane DELAUNAY

Soutenue publiquement le 28 février 2006 devant la commission d'examen formée de :

Rapporteurs : M. Jean-François CAVIN, Professeur
M. Armel GUYONVARCH, Professeur

Examineurs : M. Jean-Marc ENGASSER, Professeur
M. Jean-Louis GOERGEN, Professeur
M. Pierre GERMAIN, Professeur
M. Stéphane DELAUNAY, Maître de conférences

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biocatalyse et Bioprocédés de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie le Professeur Pierre Germain pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que les Professeurs Michel Girardin et Jean-Marc Engasser pour avoir continué à m'accorder leur confiance.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Pierre Germain pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son encadrement, ses conseils, ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document.

Je remercie Monsieur Stéphane Delaunay, Maître de conférence à l'ENSAIA, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour ses conseils et ses corrections.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Professeur Jean-Louis Goergen, pour ses conseils concernant mes travaux et ses corrections.

Mes remerciements s'adressent aussi à Messieurs Jean-François Cavin Professeur à l'ENSBANA (Dijon) et Armel Guyonvarch Professeur à l'université Paris-Sud qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je remercie également Monsieur Jean-Marc Engasser, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir accepté d'examiner ce document.

Je tiens aussi à remercier ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, ainsi que mes collègues du LBB qui ont participé au bon déroulement de cette thèse.

J'attache une importance particulière à remercier mes camarades du LBB et des laboratoires environnants pour l'ambiance amicale et chaleureuse qu'ils ont su créer.

Enfin, je dédie cette thèse à ma famille, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mon travail.

INTRODUCTION	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.1. Le genre <i>Streptomyces</i>	6
I.2. Les pristinamycines	15
I.3. Facteurs de culture pouvant influencer la croissance et la production	25
II MATERIEL ET METHODES	41
II.1. Souche utilisées	42
II.2. Milieux de culture	42
II.3. Conditions de culture	44
II.4. Estimation de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires	46
II.5. Mesure de l'activité réductrice globale	52
II.6. Mesure du pH intracellulaire	53
II.7. Mesure des activités enzymatiques	57
III. INSTABILITE DE LA PRODUCTION DE PRISTINAMYCINES	65
III.1. Culture de référence pour la production des pristinamycines en mode discontinu	66
III.2. Résultats complémentaires concernant les activités enzymatiques lors du procédé de production des pristinamycines	76
III.3. Recherche de la validation des résultats antérieurs avec un réacteur de géométrie différente	83
III.4. Etudes physiologiques sur une culture non productrice menée en réacteur en mode discontinu avec une agitation de départ de 700 rpm	91
IV. INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU DE CULTURE ET DE L'AGE DE LA PRECULTURE SUR LA PRODUCTION DE PRISTINAMYCINES	115
IV.1. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de pristinamycines	116
IV.2. Influence de l'âge de la préculture sur la production de pristinamycines	118
IV.3. Conclusions	130
V. ETUDE DE LA PRODUCTION DE PRISTINAMYCINES EN MODE DISCONTINU A PARTIR D'UNE PRECULTURE AGEE DE 20H	133
V.1. Etudes macrocinétiques réalisées au cours du nouveau procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu	135
V.2. Mesures microcinétiques réalisées au cours du nouveau procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu	152
V.3. Conclusions	161
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	165
REFERENCES	171
ANNEXES	185

ABREVIATIONS

Molécules

3-MPA :	acide 3-mercaptopropionique
ADN :	acide désoxy-ribonucléique
Acétyl-CoA :	acétyl-Coenzyme-A
AMP :	adénosine mono-phosphate
APAD :	3 acétyl-pyridine adénine dinucléotide
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
ARNt :	ARN de transfert
ATP :	adénosine 5' tri-phosphate
BCECF-AM :	2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5(et 6)-carboxyfluorescéine, acétoxyméthylester
BSA :	bovine serum albumin
C :	cytosine
CoA :	Coenzyme-A
DHAP :	dihydroxyacétone phosphate
DMPAPA :	diméthyl-para-amino-phénylalanine
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DTNB :	5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoic acid)
DTT :	1,4-dithio-DL-thréitol
G :	guanine
GA3P :	glycéraldéhyde-3-phosphate
INT :	2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
MMPAPA :	4-monométhyl-para-amino-phénylalanine
MOPS :	acide morpholinopropanesulfonique
NAD ⁺ :	nicotine adénine dinucléotide
NADH :	nicotine adénine dinucléotide sous forme réduite
NADP :	nicotine adénine dinucléotide phosphate
NADPH :	nicotine adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
OPA :	ortho-phthaldialdéhyde
PI :	pristinamycines de classe I
PII :	pristinamycines de classe II
TTC :	acide tris-tri-carballylique

Enzymes

Aco :	aconitase	G6PDH :	glucose-6-phosphate déshydrogénase
ADH :	alanine déshydrogénase	GS :	glutamine synthase
AT :	alanine transaminase	KGDH :	α -céto-glutarate déshydrogénase
CitS :	citrate synthase	MDH :	malate déshydrogénase
IDH :	isocitrate déshydrogénase	PDH :	pyruvate déshydrogénase
GDH :	glutamate déshydrogénase	PEPc :	phospho-énol-pyruvate carboxylase
GOGAT :	glutamate synthase	PFK :	phospho-fructo-kinase
G3PDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase		

Unités

Da :	dalton	min :	minutes
g :	gramme	mM :	millimolaire
h :	heure	mOsm :	milliOsmole
kb :	kilobase	mV :	millivolt
kHz :	kiloHertz	nm :	nanomètres
L :	litre	s :	seconde
M :	molaire	S :	Svedberg

Abréviations

UA :	unité arbitraire	V :	Volt
UE :	unité enzymatique	W :	Watt
mUE :	milli-unité enzymatique. 1 mUE	°C :	degré Celsius
correspond à la quantité d'enzyme catalysant la formation d'une nanomole de produit par minute et par mg de protéine		°K :	degré Kelvin (°C +273)
		ε :	coefficient d'extinction molaire

Potentiel d'oxydoréduction

E° :	potentiel standard
R :	constante des gaz parfaits = 8,314 Joules.moles ⁻¹ .K ⁻¹
T :	température en °K
F :	constante de Faraday
n :	nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction

Autres

AS :	activité spécifique
ATCC :	american type culture collection
CLHP :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
DO :	densité optique
MLS :	macrolides vrais, lincosamines et synergistines
MM :	masse molaire
rpm :	rotation par minute
pH :	potentiel d'hydrogène
pHi :	pH intracellulaire
TCA :	Tricarboxylic acid cycle (= cycle de Krebs)
TSA-YE :	gelose trypticase soja et extrait de levure
TSB-YE :	bouillon trypticase soja et extrait de levure
ppGpp :	guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate
PPP :	voie des pentoses phosphate
PBS :	tampon phosphate
UV :	ultra violet
v/v :	volume par volume
w/v :	masse par volume
VVM :	volume par volume et par minute

INTRODUCTION

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'études physiologiques sur *Streptomyces pristinaespiralis*, une bactérie du groupe des actinomycètes, productrice de pristinamycines. Les pristinamycines sont un groupe de onze molécules complexes appartenant à la famille des antibiotiques appelés synergistines. Leur production industrielle est réalisée sur milieux complexes et a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1961 par la société Rhône-Poulenc, devenue récemment Sanofi-Aventis.

Comme pour la plupart de la production des antibiotiques, métabolites secondaires produits essentiellement pendant la phase de ralentissement et la phase stationnaire de croissance, l'amélioration des productions a fait appel au développement de souche "hyper-productrices", obtenues après identification et amplification des gènes de biosynthèse. Ces améliorations font aussi appel industriellement à des plans d'expérience sur milieux complexes, prenant en compte des paramètres macrocinétiques. Les études physiologiques de type "génie métabolique" sont encore assez rare pour *S. pristinaespiralis*, et les connaissances des relations entre métabolisme primaire et secondaire, très fragmentaires.

Ce travail aborde cette approche de type "génie métabolique" sur milieu synthétique essentiellement et fait suite à des travaux menés au Laboratoire Biocatalyse et Bioprocédés (Corvini 2000). Lors de ces précédents travaux, menés sur milieu synthétique, une méthode de mesure du pH intracellulaire de *S. pristinaespiralis* par microscopie à épifluorescence a été mise au point. Lors des cultures en réacteur en mode discontinu, parallèlement au suivi de paramètres microcinétiques tels l'évolution du pH intracellulaire et l'évolution des activités spécifiques de certaines enzymes du métabolisme central, certains paramètres macrocinétiques, tels que l'évolution des concentrations en substrats et de la biomasse, mais également la production des pristinamycines et d'acides organiques ont été mesurés. Il a ainsi pu être observé qu'une baisse générale des activités enzymatiques du métabolisme central et une baisse du pH intracellulaire ont lieu précédemment à la production des pristinamycines. Cet événement est suivi d'une remontée du pH intracellulaire, qui est corrélée avec une production importante de lactate et de succinate ainsi qu'avec la production des pristinamycines.

Afin d'étudier l'influence de la vitesse spécifique de croissance sur les activités enzymatiques mais également sur le pH intracellulaire, des cultures ont été menées en mode continu, avec différents taux de dilution. Lors de ces cultures, la production des pristinamycines a lieu de manière cyclique et une corrélation a pu être observée entre le déclenchement de la production des pristinamycines et une chute brutale de la valeur du potentiel d'oxydoréduction du milieu.

L'objectif initial de cette thèse était de poursuivre les travaux antérieurs sur milieux synthétiques, afin de compléter les études enzymatiques du métabolisme central, pour préciser l'estimation des flux de matière, notamment par l'emploi des bilans macrocinétiques. De plus une étude des flux de matière prenant en compte l'effet des variations du pH intracellulaire sur les activités enzymatiques devait être réalisée. Enfin, un des objectifs était également de mieux comprendre la corrélation entre la chute du potentiel d'oxydoréduction et le déclenchement de la production des pristinamycines. En effet, si la production de pristinamycines était toujours corrélée à une chute brutale du potentiel d'oxydoréduction, ce dernier permettrait de suivre en ligne et de manière simple le déclenchement de la production des pristinamycines et donc de contrôler la conduite des fermentations.

Lors de la réalisation d'une fermentation standard en mode discontinu, dans un réacteur différent de celui précédemment utilisé lors des expériences menées dans le laboratoire, les résultats obtenus ont différé de ceux obtenus précédemment par Corvini (2000). Cette nouvelle fermentation a conduit à une absence de production. Une étude métabolique d'une culture sans production a donc été réalisée. Certains facteurs (âge de la préculture et composition du milieu) pouvant influencer sur la production ont ensuite été étudiés afin de résoudre les problèmes de reproductibilité de production des pristinamycines.

Les paramètres permettant une production systématique ayant été établis, des cultures ont été menées en mode discontinu. Au cours de ces cultures, des mesures du pH_i, le dosage des pristinamycines ainsi que la mesure des activités spécifiques de certaines enzymes de métabolisme central incluant l'aconitase et la citrate synthase ont été réalisés afin d'établir un schéma métabolique et de préciser les relations éventuelles entre la production des acides organiques, la chute du pH_i précédemment observées et la production des pristinamycines.

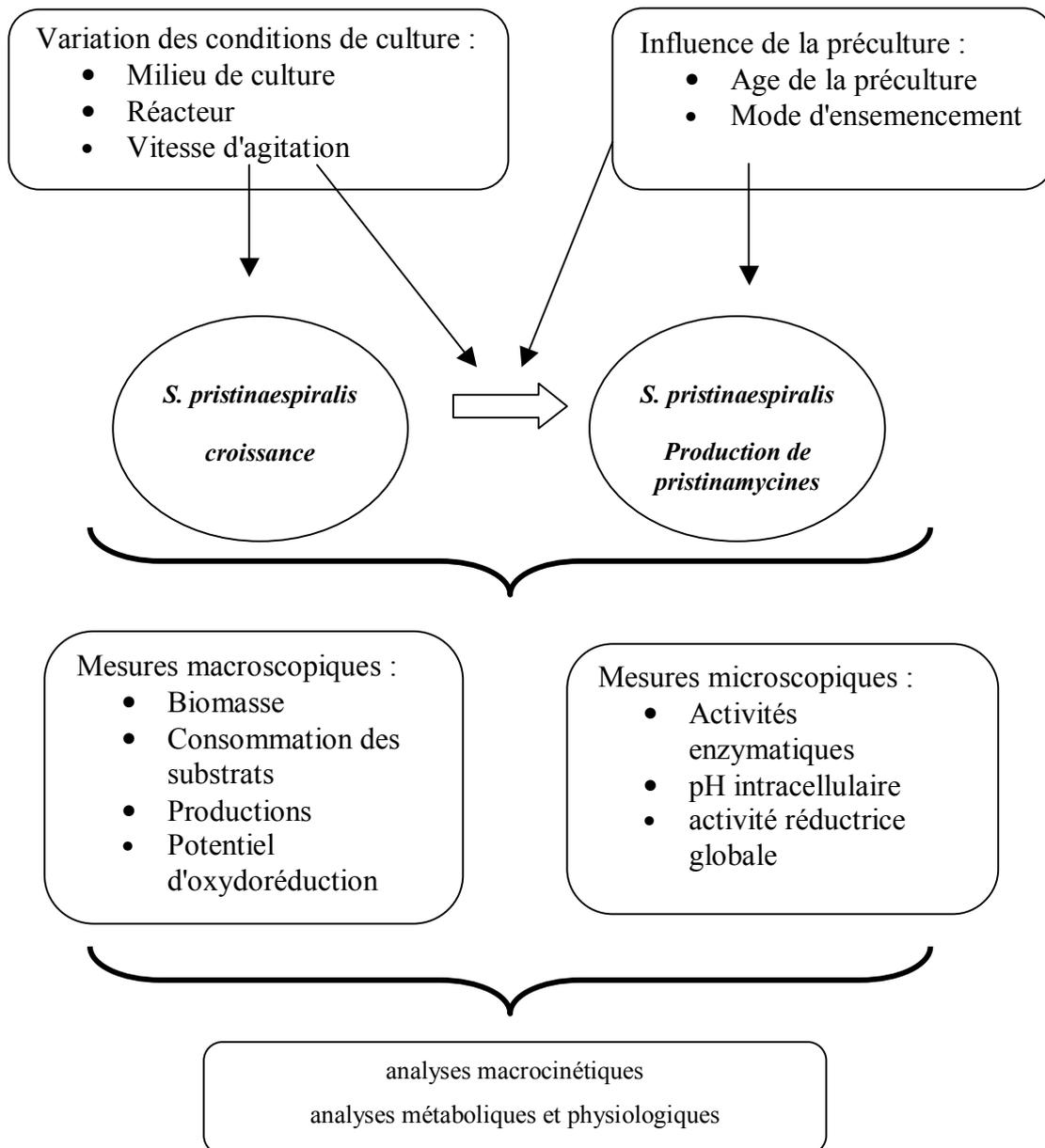


Figure 1 : Les différents niveaux d'investigation utilisés pour l'étude du métabolisme carboné de *Streptomyces pristinaespiralis* lors d'un procédé de production des pristinomycines.

I.1. Le genre <i>Streptomyces</i>.....	6
I.1.1. Généralités sur le genre <i>Streptomyces</i>	6
• Présentation – classification	6
• Instabilité génétique chez le genre <i>Streptomyces</i>	7
I.1.2. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i>	7
• Croissance en milieu solide	8
• Croissance en milieu liquide	9
I.1.3. Vue générale du métabolisme	10
• Métabolisme primaire et métabolisme secondaire	10
• Les différentes voies métaboliques	10
• Rôles de l'aconitase et de la citrate synthase	11
• Etude des flux carbonés	12
• Glycolyse ou voie des pentoses phosphate ?	13
I.1.4. <i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	14
I.2. Les Pristinamycines.....	15
I.2.1. Présentation générale et classification	15
I.2.2. Les synergistines	15
I.2.3. Les pristinamycines	16
• Les pristinamycines I	16
• Les pristinamycines II	17
I.2.4. Cibles et mode d'action	17
• Les micro-organismes cibles	17
• Mécanisme d'entrée dans le micro-organisme cible	18
• Mécanisme d'action	18
I.2.5. Phénomènes de résistances	19
• Résistances	19
• Mécanismes de résistances	19
I.2.6. Applications	21
I.2.7. Biosynthèse des pristinamycines	21
• Les gènes impliqués	21
• Biosynthèse des Pristinamycines II	22
• Biosynthèse des Pristinamycines I	24
I.2.8. Procédés de biosynthèse	25
I.3. Facteurs de culture pouvant influencer la production d'antibiotiques.....	25
I.3.1. Inoculum	25
I.3.2. Composition du milieu, effet des facteurs nutritionnels	26
• Effet de la source de carbone	27
• Effet de la source d'azote	28
• Influence de la source de phosphates	31
• Influence de la teneur en oxygène	33
• Inducteurs de la production d'antibiotiques	34
I.3.3. Influence des conditions de culture sur la croissance et la production de métabolites secondaires	35
• Influence du pH	36
• Influence de l'agitation sur la morphologie, la croissance et la production de métabolites secondaires	36
• Influence du potentiel d'oxydoréduction	37

I.1. Le genre *Streptomyces*

I.1.1. Généralités sur le genre *Streptomyces*.

- **Présentation – classification**

Le genre *Streptomyces* appartient au groupe des Actinomycètes, sous-groupe des Streptomycètes. Les Actinomycètes sont des procaryotes à structure de bactéries à Gram positif. Ils sont essentiellement aérobies. Bien qu'ils aient une structure de procaryote, leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons (breton *et al.*, 1989) et peut conduire à la formation de spores. Ces spores sont isolées, groupées en chaînes ou contenues dans un sporange. De forme variable, elles peuvent être flagellées ou ornementées. Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables. Dans certains cas il n'y a pas de production de spores, mais le mycélium se fragmente et donne naissance à de nouvelles hyphes.

Les Actinomycètes sont divisés en plusieurs genres en fonction d'un ensemble de caractères morphologiques (du mycélium, des conidies, des sporanges et d'autres structures) et biochimiques (la composition en acides aminés de la paroi cellulaire, en glucides, lipides et en acides nucléiques (% G + C)). A partir de ces critères, la classification de Bergey (Locci, 1989) répartit les Actinomycètes en plusieurs groupes parmi lesquels on distingue le groupe 29 des « Streptomycètes et genres apparentés ».

Il s'agit d'un groupe hétérogène mais dont tous les membres possèdent de l'acide diamino-pimélique et de la glycine dans le peptidoglycane. Des hyphes stables sont formées et peuvent produire des mycéliums aériens avec de longues chaînes de spores (c'est le cas de *Streptomyces* et de *Streptoverticillium*) (Locci, 1989).

Les *Streptomyces* représentent le genre majoritaire des *Streptomycètes* (95,34 %). Il s'agit de bactéries du sol filamenteuses, dont les hyphes, de longueur variable, ont un diamètre compris entre 0,5 et 2,0 µm. Ces bactéries sont aérobies strictes et à Gram positif. Quelques espèces sont pathogènes pour les hommes et les animaux, les autres sont phytopathogènes.

Les différentes espèces de *Streptomyces* sont identifiées et classées par taxonomie numérique sur la base de critères phénotypiques car, du fait de leur instabilité génétique, une taxonomie basée sur le génome et sa structure serait difficilement réalisable.

- **Instabilité génétique chez le genre *Streptomyces***

L'ADN chromosomique des *Streptomyces* est linéaire et mesure environ 8000 kilobases. Cette linéarité permet de définir deux bras chromosomiques de taille équivalente dont les extrémités portent des répétitions terminales inversées (Bentley *et al.*, 2002).

Des phénomènes de mutations spontanées ont été observés comme par exemple la production de mutants dépigmentés avec une fréquence de 1 % chez *S. ambofaciens*. Un autre type d'instabilité a été observé : l'hypervariabilité qui se traduit par l'absence de phénotype prépondérant dans la descendance d'une grande majorité (87%) des mutants dépigmentés. Ces phénomènes sont liés à de grandes délétions aux extrémités de l'ADN génomique (Leblond *et al.*, 1989).

Deux mécanismes peuvent être à l'origine des délétions d'une partie de l'ADN : la recombinaison illégitime due à des erreurs de réplication et les recombinaisons homologues provenant de répétitions au sein des séquences amplifiables. Différents facteurs peuvent augmenter la fréquence de l'instabilité génétique. De façon générale, le stress environnemental, tel qu'un choc nutritionnel ou thermique en cours de croissance ou une exposition à des agents mutagènes, va conduire à une augmentation de la fréquence de l'instabilité génétique. Celle-ci permet à la souche de s'adapter rapidement à un milieu défavorable et peut être à l'origine de la production de différents métabolites secondaires. Cependant cette instabilité peut poser un problème pour conserver une souche avec toutes ses caractéristiques intactes, notamment dans l'industrie. Il faudra donc choisir un mode de stockage qui ne permettra pas à la souche d'être modifiée et vérifier régulièrement et systématiquement que la souche n'a pas perdu les critères pour lesquels elle a été sélectionnée.

I.1.2. Cycle de développement des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* peuvent utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 35°C. Ce sont en majorité des souches mésophiles, mais il existe quelques souches psychrophiles ou thermophiles. La gamme de pH optimale est comprise entre 6,5 et 8,0. La croissance peut se conduire en milieu liquide ou solide ; cependant, l'étude d'un cycle complet de différenciation se réalise préférentiellement en milieu solide.

- **Croissance en milieu solide**

Placées dans des conditions favorables, les spores vont produire un tube germinatif qui va croître (1) et donner des hyphes qui vont se ramifier. Il s'agit du mycélium primaire également appelé mycélium végétatif ou de substrat, qui se développe en surface et à l'intérieur du support. Il est visible à l'œil nu au bout de 2 à 3 jours. Un mycélium secondaire, aérien va ensuite se développer sur la colonie (2). Ces hyphes sont peu ramifiées et pourvues d'une enveloppe hydrophobe, elles peuvent être colorées. Ce mycélium aérien va s'enrouler en spirales aux extrémités (3) puis par cloisonnement et épaissement des cloisons, des spores vont être produites (4 à 7). Ce mycélium secondaire va donner un aspect morphologique poudreux typique à ces colonies.

Le développement du mycélium aérien portant des spores peut prendre une à deux semaines. Pour favoriser la production de spores il faut cultiver la souche sur un milieu pauvre puisque les spores sont une forme de résistance aux conditions défavorables (Chater et Merrick, 1979).

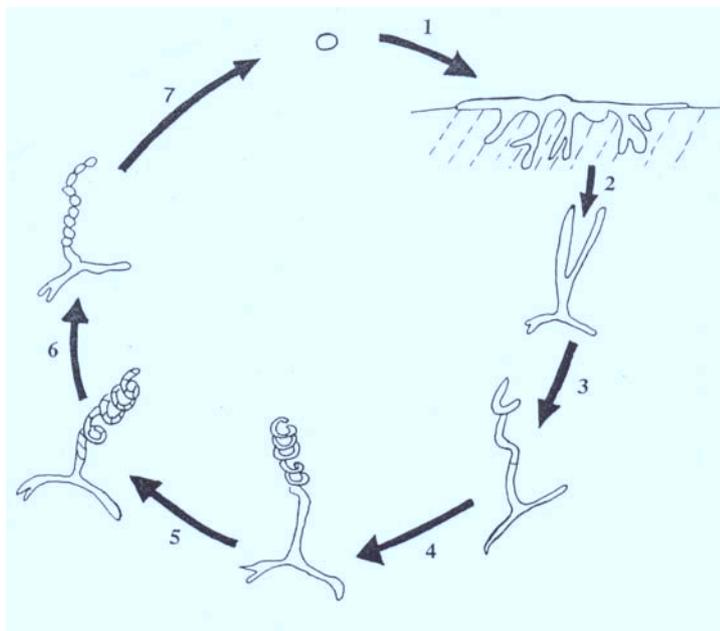


Figure 2 : Cycle de croissance en milieu solide de *Streptomyces*.

(1) : germination de la spore et développement du mycélium primaire ou végétatif. (2) : développement du mycélium secondaire ou aérien. (3 - 4) : enroulement du mycélium aérien. (5-6) : cloisonnement et formation des spores. (7) : libération des spores.

- **Croissance en milieu liquide.**

La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Les *Streptomyces*, dans ces conditions, croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter trois types de morphologie (fig. 3) : les hyphes, branchées ou non, sous forme de mycélium dispersé, un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements ou encore des pelotes denses dont la taille peut varier de 0,1 μm à plusieurs millimètres (Bushell, 1988 ; Hobbs *et al.*, 1989 ; Drouin, 1996 ; Amanullah *et al.*, 2000). Ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelote (Papagianni, 2004).

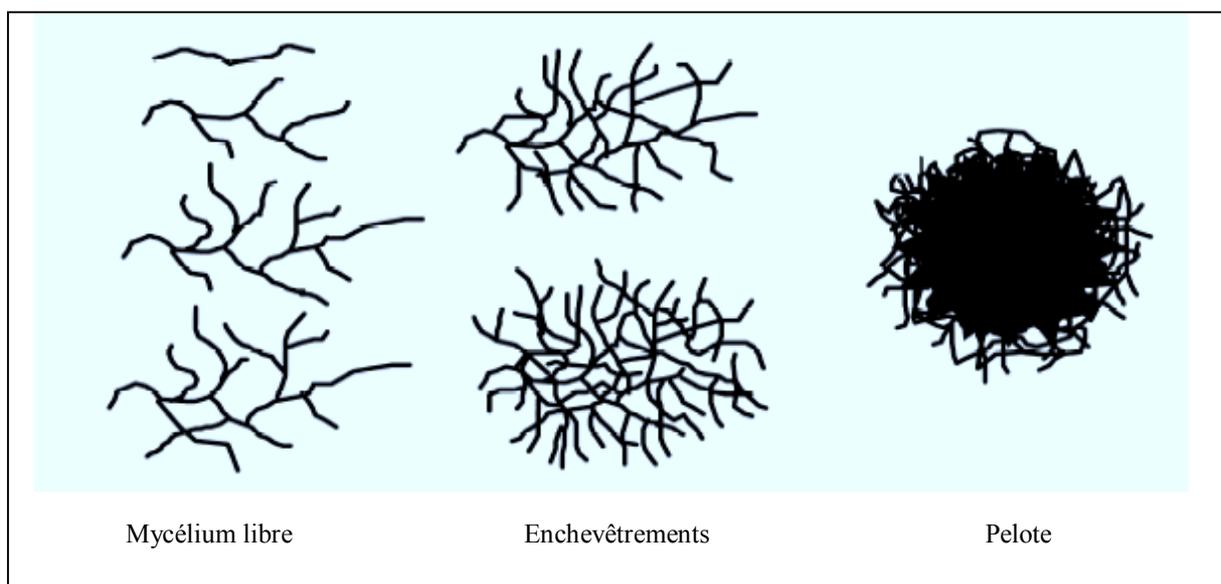


Figure 3 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

Les pelotes se forment soit par agrégation des spores qui, lorsqu'elles vont germer, formeront une pelote, soit par enchevêtrement des hyphes au cours de la croissance et de la ramification.

La sporulation en milieu liquide est rare mais possible. Chez *Streptomyces griseus* la sporulation a pu être induite dans des conditions de carence en azote ou en phosphore (Kendrick et Ensign, 1983 ; Daza *et al.*, 1989). Selon la source d'azote employée, *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 est également capable de produire des spores en milieu liquide (Novella *et al.*, 1992). Les spores produites dans ces conditions sont similaires à celles obtenues en milieu solide, mais dans le cas de *S. antibioticus* ETHZ 7451, elles présentent une moins bonne thermorésistance (Daza *et al.*, 1989 ; Novella *et al.*, 1992).

I.1.3. Vue générale du métabolisme

- **Métabolisme primaire et métabolisme secondaire**

Au cours de leur croissance les *Streptomyces* peuvent passer d'un métabolisme dit primaire (trophophase) à un métabolisme dit secondaire (idiophase). Au cours de ces deux phases, des métabolites sont synthétisés. Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés et sont résumées dans le tableau 1 (Delaunay *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires (Delaunay *et al.*, 2003).

Métabolite primaire	Métabolite secondaire
Synthétisé pendant la trophophase	Synthétisé pendant l'idiophase
Présent tout au long du cycle cellulaire	Apparition à un moment du cycle cellulaire
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
Enzymes à spécificité étroite	Enzymes à spécificité large
Voies de synthèse simple et courte	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

Parmi les nombreux métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* figurent les antibiotiques. Cette production a été observée au départ en milieu solide et se manifeste par la présence d'une zone d'inhibition de croissance des espèces sensibles autour des colonies de *Streptomyces*, due à la diffusion de l'antibiotique dans le milieu gélosé.

- **Les différentes voies métaboliques**

La voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) a été signalée chez différents *Streptomyces* par Salas *et al.* (1984), ainsi que la présence de phosphofructokinase (PFK) et de pyruvate kinase

indiquant l'existence de la voie glycolytique complète (Dekleva et Strohl, 1988 a ; Surowitz et Pfister, 1985).

Dekleva et Strohl (1988 a) ont montré que la voie d'Entner-Doudoroff n'est pas activée chez *S. lividans*, *S. C5* et *S. aurofaciens*. L'absence de cette voie a également été démontrée chez d'autres actinomycètes par Alves *et al.* (1994). Cette voie est donc probablement inexistante chez le genre *Streptomyces*.

La présence de la voie complète des pentoses-phosphate (PPP) a été décrite chez *S. coelicolor*, *S. antibioticus*, *S. scabies*, *S. reticuli*, *S.C5*, *S. aurofaciens* et *S. lividans* (Salas *et al.*, 1984 ; Dekleva et Strohl, 1988 a). Cette voie permettrait la production de cofacteurs réduits, essentiellement NADPH, requis par les autres voies (Salas *et al.*, 1984).

La présence du TCA (Tricarboxylic Acids Cycle) a été montrée chez *S. lividans* et chez *S. C5* (Dekleva et Strohl, 1988 a) avec une forte activité de la citrate synthase, la première enzyme du cycle de Krebs. Certaines souches telles que chez *S. coelicolor* et *S. hygroscopicus* présentent un shunt glyoxylique (Takebe *et al.*, 1991 ; Coggins *et al.*, 1995) alors que chez d'autres souches comme *S. aurofaciens*, *S. C5* et *S. lividans* cette activité n'a pas pu être détectée (Dekleva et Strohl, 1988 a ; Hodgson *et al.*, 2000). Les dosages effectués sur les enzymes du shunt glyoxylique par Corvini (2000) montrent des activités très faibles chez *S. pristinaespiralis*.

Enfin, chez plusieurs espèces de *Streptomyces*, la phospho-enol-pyruvate carboxylase (PEPc) a pu être identifiée comme étant la principale enzyme anaplérotique (Dekleva et Strohl, 1988 a et 1988 b ; Bramwell *et al.*, 1993 ; Coggins *et al.*, 1995).

- **Rôles de l'aconitase et de la citrate synthase**

Viollier *et al.* (2001 a) ont observé qu'un mutant de *S. coelicolor* chez lequel le gène *citA* a été éliminé devient auxotrophe pour le glutamate, indiquant que ce gène code pour la citrate synthase, enzyme majeure du TCA, permettant l'entrée de l'acétyl-CoA. En présence de glucose, ce mutant présente un phénotype "bald" (chauve) résultant de l'incapacité à produire un mycélium aérien, il n'est plus capable de produire d'antibiotiques (undecylprodigiosine et

actinorhodine) et de plus une acidification plus importante du milieu est observée ($\text{pH} < 5$), due à une plus forte accumulation d'acides acétique, pyruvique, malique succinique et fumarique. Cependant, en milieu tamponné à $\text{pH} 7,2$ ce mutant est capable de ré-assimiler les acides organiques excrétés et de développer un mycélium aérien.

Chez *S. coelicolor*, une seule activité aconitase a été détectée dans les extraits protéiques (Viollier *et al.*, 2001 b). Un mutant chez lequel le gène *acoA* a été éliminé est auxotrophe pour le glutamate et présente des problèmes de croissance, de développement du mycélium aérien et de production d'antibiotique, ce qui pourrait être partiellement dû à une acidification du milieu, provoquée par une accumulation extra-cellulaire de citrate. Des dosages de l'aconitase chez cette même espèce, cultivée sur milieu solide R2YE, montrent que celle-ci s'accumule dans le mycélium au cours de la croissance, puis diminue lors de la formation du mycélium aérien tandis que le pyruvate est consommé. A partir de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que, soit le catabolisme du TCA supporte une faible activité de l'aconitase, soit il existe une autre activité aconitase non détectée qui s'exprimerait seulement lors de la phase de croissance du mycélium aérien. Schwartz *et al.* (1999) ont inactivé l'aconitase chez *S. viridochromogenes* Tü494 et ont obtenu un phénotype similaire.

- **Etude des flux carbonés**

Au cours du cycle cellulaire, du fait notamment du passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire, une réorganisation des flux dans les différentes voies métaboliques peut avoir lieu selon les besoins de la cellule. Selon les substrats présents dans le milieu, il peut y avoir une activation différente des voies métaboliques. Daae et Ison (1999) ont étudié les flux métaboliques chez *S. lividans*. Leurs résultats montrent que la consommation en oxygène est le facteur ayant le plus d'impact sur le calcul et les variations des flux et notamment sur le taux de renouvellement de l'ATP, la phosphorylation oxydative du NADH et la voie glycolytique. De plus, leur analyse montre qu'un changement jusqu'à 20% des différents composants de la formule de biomasse n'affecte pas significativement les flux intracellulaires. L'utilisation de la formule chimique de *E. coli*, utilisée pour représenter *S. lividans* dans cette étude, est donc valable et ne devrait donc pas affecter significativement les flux calculés.

Naeimpoor et Mavituna (2000) proposent une analyse des flux métaboliques de *S. coelicolor* sous différentes limitations. Leurs résultats montrent qu'une limitation en azote semble permettre le taux de production d'actinorhodine le plus élevé avec la plus faible énergie de maintenance bien que ce phénomène soit accompagné de taux de production élevés de métabolites primaires.

- **Glycolyse ou voie des pentoses phosphate ?**

Chez *S. lividans*, la distribution des flux carbonés dépend du taux de croissance et de la source d'énergie et de carbone (glucose ou gluconate). Des taux de croissance croissants entraînent une augmentation des flux dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphate, alors que la synthèse d'actinorhodine et d'undécylprodigiosine est inversement proportionnelle au flux de carbone empruntant la voie des pentoses phosphate. (Avignone Rossa *et al.*, 2002).

Chez *S. noursei*, une diminution des flux carbonés dans la voie des pentoses phosphate et une augmentation des flux dans la voie du TCA liée à la consommation de glucose sont observées lorsque la culture entre dans une phase présentant des taux de croissance réduits et une production de nystatine augmentant. De plus, le flux carboné à travers la voie des pentoses-phosphate semble être lié au besoin en NADPH durant les différentes phases de la culture en mode discontinu (Jonsbu *et al.*, 2001).

Chez *S. reticuli* et *S. coelicolor*, Cochrane *et al.*, (1953) ont établi que la voie majoritaire du catabolisme du glucose est la voie des pentoses-phosphate, alors que chez *S. antibioticus* lors de la germination des spores, Salas *et al.* (1984) ont montré l'existence d'un basculement de la voie d'Embden-Meyerhof vers la voie des pentoses-phosphate, jusqu'à ce que cette dernière devienne la voie principale pendant la phase de croissance.

Lors du procédé de production de méthylénomycine par *S. coelicolor*, pendant la phase de croissance, la glycolyse est 5 fois plus active que la voie des pentoses phosphate, puis un pic d'activité de la voie des pentoses phosphate est observée peu de temps avant l'excrétion de méthylénomycine indiquant un équilibrage des flux de carbone. Il semblerait qu'il s'agisse d'une activation de la voie des pentoses phosphate et non d'une diminution des flux de la

glycolyse. Cette augmentation pourrait être due à un besoin plus important en NADPH (Obanye *et al.*, 1996).

Ainsi, l'orientation des flux carbonés vers la voie des pentoses-phosphate ou la voie glycolytique dépend de l'espèce, de l'antibiotique produit ou encore de l'état physiologique des cellules.

I.1.4. *Streptomyces pristinaespiralis*

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

Différentes études ont été menées sur ce micro-organisme. Son utilisation industrielle a orienté la recherche sur la production des pristinamycines : effet de la source d'azote sur la croissance et la production (Voelker et Altaba, 2001), induction de la production (Paquet, 1990 ; Paquet *et al.*, 1992), mais la grande majorité des travaux portent sur les gènes spécifiques du métabolisme secondaire et plus spécialement ceux en relation avec les pristinamycines.

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), différents gènes responsables de la biosynthèse des pristinamycines et de ses précurseurs ont pu être identifiés. Ces gènes de biosynthèse des différentes pristinamycines ainsi que les gènes de résistance spécifique à l'antibiotique produit sont regroupés au sein d'un même cluster. Ce cluster couvre un peu moins de 200 kb soit 6% du génome et il s'agit d'un des plus grands découverts jusqu'à présent parmi les différentes espèces de *Streptomyces* (Bamas-Jacques *et al.*, 1999).

A des fins industrielles, des mutants hyperproducteurs ont été recherchés. Ceci a permis la production en réacteur discontinu de pristinamycines. Ce procédé a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1961 sous le numéro 1-301-857 (Rhône-Poulenc, 1961). La production des pristinamycines 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 commercialisées sous forme de comprimés par les laboratoires SPECIA

(anciennement Rhône-Poulenc-Rorer), appartenant au groupe Sanofi-Aventis, sous le nom de PYOSTACINE® (Paquet, 1990).

I.2. Les Pristinamycines

I.2.1. Présentation générale et classification

Les pristinamycines appartiennent à un groupe d'antibiotiques appelé synergistines, streptogramines ou encore peptolides. Les composés appartenant à cette famille d'inhibiteurs présentent 2 structures de base : A (lactones macrocycliques de nature neutre) et B (molécules cycliques de nature depsipepsidiques à caractère amphotère), sur lesquelles se greffent des groupes fonctionnels qui seront différents en fonction de l'antibiotique considéré (Cocito, 1979). Les synergistines font partie de la familles des MLS qui comprend trois catégories d'antibiotiques de structures et compositions chimiques très différentes :

- les Macrolides vrais (tels que la spiramycine)
- les Lincosamines (tels que la lincomycine)
- et les Synergistines (comme par exemple les virginiamycines et les pristinamycines) (Larpent et Sanglier, 1989).

I.2.2. Les synergistines

Comme de nombreux antibiotiques, les synergistines sont produites par différents genres bactériens, le principal étant *Streptomyces*. Il en découle qu'une même molécule porte un nom différent selon l'organisme qui le produit ; par exemple la Pristinamycines I_A est identique à la virginiamycine S, la mikamycine B et l'ostréogramine B (Preud'homme *et al.*, 1965).

Les antibiotiques appartenant au groupe des synergistines sont constitués de deux composants (A et B) sécrétés par un même micro-organisme, qui renforcent mutuellement leur action. Séparément chaque composant a un effet donné, lorsque les deux composants sont combinés, l'effet obtenu est supérieur à la somme des deux effets. Ainsi les pristinamycines I (appartenant aux streptogramines B) et les pristinamycines II (appartenant aux streptogramines A) ont séparément une activité bactériostatique, alors qu'ensemble elles ont une activité bactéricide (Preud'homme *et al.*, 1965 ; 1968). Ce sont des inhibiteurs de la synthèse protéique, au niveau de la fraction 50 S des ribosomes (Lissac *et al.*, 1977).

I.2.3. Les pristinamycines

La pristinamycine commerciale ou 7.293 RP est un mélange de deux types de molécules : les pristinamycines I (PI) et les pristinamycines II (PII). Leur structure de base bien que différente présente une architecture commune : un peptolide lactone macrocyclique. Les PI représentent 20 à 30 % des pristinamycines totales du mélange produit par la bactérie, le reste étant constitué des PII. Les proportions de ce mélange sont de l'ordre de celle présentant la meilleure activité bactéricide. La pristinamycine commerciale se présente sous la forme d'une poudre micro-cristalline blanchâtre très faiblement soluble dans l'eau ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), inodore et à l'amertume prononcée (Preud'homme *et al.*, 1965). En abaissant le pH à 3, sa solubilité peut-être augmentée à 1 g.L^{-1} , cependant, sa stabilité en milieu aqueux est dépendante du pH (Rollmann et Rondelet, 1973). En revanche, les pristinamycines sont très solubles dans les solvants organiques tels que l'acétone (170 g.L^{-1}) et l'acétate d'éthyle (250 g.L^{-1}) pour les PI et le diméthyle formamide ou le diméthyle sulfoxyde (100 g.L^{-1}) pour les PII.

- Les pristinamycines I

Les pristinamycines I sont des hexadepsipeptides cycliques dont la masse moléculaire est d'environ 850 Da. Ces molécules résultent de la condensation de 7 acides aminés (ou dérivés d'acides aminés) (Cocito, 1979). De plus, les pristinamycines I regroupent 9 molécules ayant une structure similaire, annotées PI_A à PI_I et dont les différences majeures sont des alkylations ou méthylations de groupements hydroxyles (fig.4). Le composé majoritaire de ce mélange (94%) est la PI_A , les 8 autres constituants étant très minoritaires (Rhône-Poulenc-Rorer, 1996).

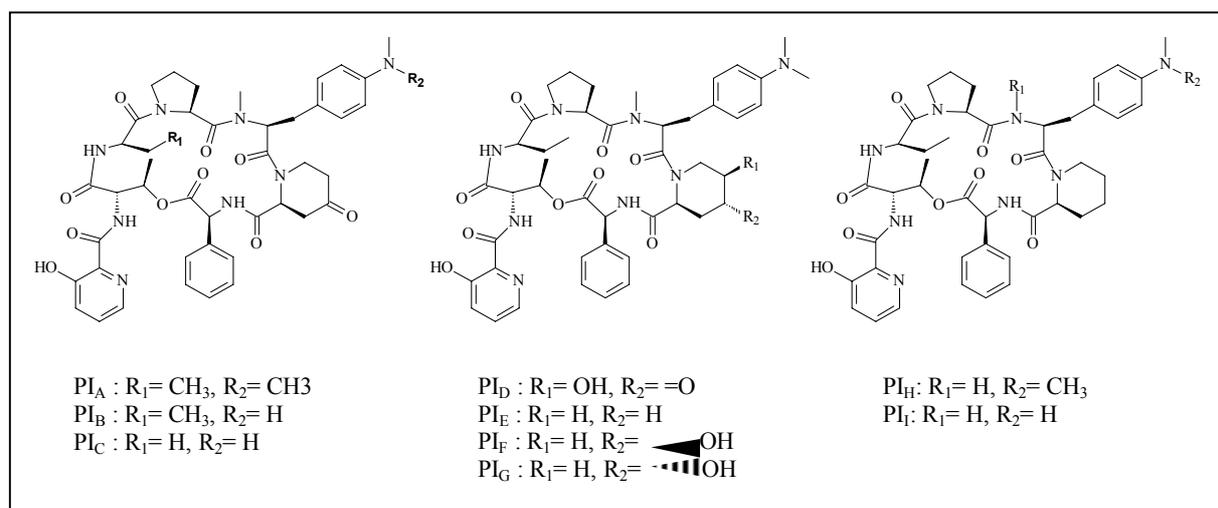


Figure 4 : Les différents constituants du groupe des pristinamycines I.

Suite à une excitation à 342 nm, les PI fluorescent avec un maximum d'émission à 406 nm, cette propriété, inexistante chez les PII, permet d'étudier les interactions des PI avec leur cible (Cocito, 1979). Enfin, la PI_A est un transporteur de protons efficace au pH physiologique, cette spécificité est due à la présence du résidu 3-hydroxypicolinoyle qui possède 2 fonctions acides. La forme responsable serait la forme zwitterion où l'amine tertiaire est protonée et la fonction alcool est ionisée (Largeron et Fleury, 1992).

- **Les pristinamycines II**

Les pristinamycines II, comme tous les composés du groupe A sont des peptolides cycliques polyinsaturés qui peuvent être considérés comme des depsipeptides hautement modifiés (fig. 5). Ces composés ont un poids moléculaire d'environ 500 Da (PII_A : 525 Da) (Cocito, 1979). Ces composés, de caractère neutre, résultent de la condensation de 7 unités acétate et d'analogues d'acides aminés. Deux composés forment ce groupe : les PII_A qui sont majoritaires (45 à 60 %) et les PII_B.

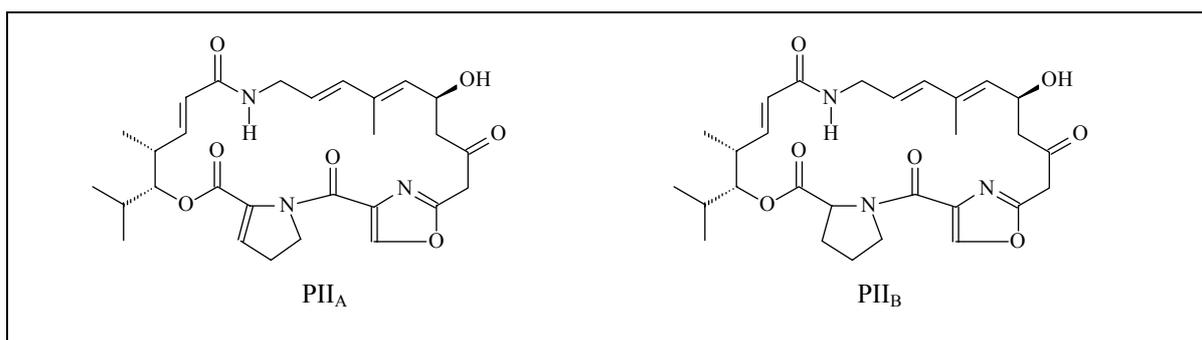


Figure 5 : Les pristinamycines du groupe II.

I.2.4. Cibles et mode d'action

- **Les micro-organismes cibles**

Les synergistines ont un spectre d'action comparable à celui de la pénicilline G pour les coques à Gram positif et négatif et pour les divers bacilles à Gram positif. Elles sont en outre actives contre les bacilles à Gram négatif anaérobies du groupe ristella-bactéroïdes. Elles sont totalement inactives contre les entérobactéries et les *Pseudomonas* (Lissac *et al.*, 1977).

Les pristinamycines peuvent notamment être employées pour traiter des souches devenues résistantes à d'autres antibiotiques, comme par exemple *Staphylococcus aureus* méthicilline-

résistant multirésistant (MRSA) et autre *Staphylococci* (Ng et Gobell, 2005 ; Samra *et al.*, 2005).

- **Mécanisme d'entrée dans le micro-organisme cible**

L'étude du phénomène d'accumulation des pristinamycines chez *S. aureus* a montré que cette dernière se fait par transport passif. Les deux groupes de pristinamycines n'ont pas d'influence l'un sur l'autre quant à leur accumulation intracellulaire, les quantités accumulées dépendent des concentrations extracellulaires pour les faibles concentrations puis une concentration intracellulaire maximale en pristinamycines est atteinte. Cette valeur peut atteindre jusqu'à 50 fois la concentration extracellulaire pour les PI et 30 fois pour les PII. Ce phénomène d'accumulation s'expliquerait par la très forte liaison des pristinamycines au ribosome (Lacroix *et al.*, 1984).

- **Mécanisme d'action**

Les synergistines sont des inhibiteurs de la synthèse protéique au niveau de la fraction 50S du ribosome bactérien (Lissac *et al.*, 1977). Le ribosome bactérien (70S) qui catalyse la synthèse protéique est composé de 2 sous-unités : 30S et 50S. La sous-unité 30S se lie aux ARNm et permet l'initiation de la synthèse protéique tandis que la 50S se lie aux ARNt et permet l'élongation. L'étape clef est la formation de la liaison peptidique par le centre peptidyl-transférase de la sous unité 50S. (Vannuffel et Cocito, 1996). Des expériences de « foot-printing » ont montré que les PI et les PII forment un complexe avec le ribosome impliquant 6 à 8 nucléotides situés dans la boucle peptidyl-transférase de l'ARNr 23S (Porse et Garrett, 1999).

Les streptogramines B (PI) ont un site de liaison à la sous-unité 50S dans le domaine du centre peptidyl-transférase. Elles interfèrent avec la formation de polypeptides longs et vont provoquer un détachement prématuré des chaînes polypeptidiques qui seront incomplètes (Tenson *et al.*, 2003). Elles interviennent lors des 2 premières étapes de l'élongation, lors de la fixation de l'ARNt-AA sur le site A et sur le transfert du résidu peptidyle du site P. *In vitro*, les agents responsables de la formation de la liaison peptidique sont inhibés, empêchant l'élongation et provoquant la libération prématurée du peptide (Cocito *et al.*, 1997).

Les streptogramines A (PII) bloquent le site du substrat du centre peptidyl-transférase et empêchent ainsi l'attachement aux sites donneur et accepteur, empêchant ainsi le début de l'élongation. Cet événement n'est possible que si les sites A et P de liaison du 50S ne sont pas occupés par les ARNt-aminoacyl. La pristinamycine se lie de façon stœchiométrique à la sous-unité 50S du ribosome *in vitro* et *in vivo* (Aumercier *et al.*, 1986).

L'effet synergique entre les streptogramines A et B est dû à une induction par les streptogramines A de l'augmentation de l'affinité entre les streptogramines B et le ribosome. La liaison des streptogramines A (PII) au ribosome entraîne un changement de conformation du ribosome qui va augmenter l'affinité pour les composés de type B. Ainsi la fixation de PII_A au ribosome permet d'augmenter l'affinité de la PI_A pour le ribosome d'un facteur 3 à 6 (Abbé *et al.*, 1982 ; Parfait, 1978). Il en résulte un changement de conformation irréversible du ribosome qui explique que l'effet bactéricide obtenu est persistant au cours du temps (Parfait et Cocito, 1980 ; Aumercier *et al.*, 1986).

L'effet synergique est quantitatif : la streptogramine B est 100 fois plus active en présence de la streptogramine A, et qualitatif : séparément ils ont une activité bactériostatique, ensemble ils deviennent bactéricides (Vannuffel et Cocito, 1996).

I.2.5. Phénomènes de résistances

- **Résistances**

Des phénomènes de résistance chez les souches cibles ont été répertoriés, en dépit du fait que la pristinamycine soit composée de deux types de molécules différentes. Des phénomènes de résistance acquise ont été décrits chez différentes souches : *Staphylococcus* spp, *Enterococcus*, *Lactobacillus* spp, *Campylobacter* spp, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae* et quelques *Enterobacteriaceae* (Barrière *et al.*, 1998).

- **Mécanismes de résistances**

Trois types de mécanismes de résistance existent :

- l'inactivation biochimique de la drogue par hydrolyse ou couplage à une autre molécule
- la modification du récepteur, qui empêchera l'attachement de l'antibiotique à sa cible
- l'altération du transport membranaire, qui provoquera la sortie de l'antibiotique

L'apparition de mutants se fait soit par mutation d'un gène déjà présent dans la souche cible, soit par l'apparition de nouvel ADN *via* un plasmide ou un transposon (Barrière *et al.*, 1998). Les streptogramines A et B étant chimiquement et structurellement différentes et leurs sites de liaison étant différents également, les mécanismes de résistance à ces deux composés diffèrent. De plus, la résistance au mélange des synergistines est en général associée à la résistance aux composés du groupe A et plus rarement à celle du groupe B.

La résistance par modification de la cible ribosomique concerne principalement les composés du groupe B et n'affecte pas l'effet synergique entre A et B, le phénotype qui lui est associé est appelé MLS_B. Le gène responsable de ce phénotype code une enzyme qui catalyse une mono ou une diméthylation de l'ARN_r 23S, ce qui provoque une altération de la conformation du ribosome et donc une diminution de l'affinité de ce dernier pour les MLS_B (Vannuffel et Cocito, 1996). Un autre mécanisme est la substitution dans l'ARN_r 23S de base A en G, qui augmente la tolérance du ribosome aux streptogramines A (Porse et Garrett, 1999).

La résistance par inactivation de l'antibiotique existe pour les deux types de composés. Les streptogramines A sont inactivées par des acétyl-transférases : l'antibiotique est alors inactivé par l'acétylation de groupements hydroxyles. Les composés du groupe B sont inactivés par une lyase, qui, par un mécanisme d'élimination, provoque l'ouverture du cycle hexadepsipeptidique (Mukhtar *et al.*, 2001).

Un mécanisme de résistance par efflux existe chez *Staphylococcus epidermis*, porté par le gène *mrsA*. La séquence de la protéine déduite de ce gène présente de fortes homologies de séquence avec des protéines pompes à ATP. La protéine codée par ce gène *mrsA* serait responsable de l'excrétion de l'antibiotique hors de la cellule (Barrière *et al.*, 1998).

L'étude de ces mécanismes de résistance et des enzymes qui en sont responsables devrait permettre d'augmenter l'efficacité des antibiotiques, soit en les rendant insensibles à ces enzymes, soit en produisant des inhibiteurs de ces enzymes.

I.2.6. Applications

Les pristinamycines sont prescrites en antibiothérapie humaine sous la dénomination « Pyostacine ». Ce médicament présente une faible toxicité lors de traitement prolongé, il est généralement bien supporté par le patient et présente un faible développement de micro-organismes cibles résistants (résistance chez *S. aureus* $\leq 2\%$).

Cependant à cause de leur insolubilité dans l'eau (solubilité $< 0,1 \%$) l'emploi des pristinamycines est limité à la voie orale. Des dérivés de PI_A solubles dans l'eau ont pu être obtenus par hémisynthèse (conservant la macrolactone peptidique intacte) à partir des constituants isolés. Parmi ces dérivés, plusieurs ont une activité comparable à celle du constituant PI_A aussi bien *in vitro* que *in vivo* et leur hydrosolubilité ($\geq 5 \%$) permet une utilisation parentérale (Paris *et al.*, 1985 ; Aumercier *et al.*, 1985). Un mélange synergique dérivant de pristinamycines a été mis au point, commercialisé par Aventis sous le nom de Synercid[®]. Il s'agit d'un mélange de quinupristine (dérivant de la PI_A) et de dalfoprastine (dérivant de la PII_A) dans les proportions 30/70 (Murchison, 2002), qui se présente sous forme d'une poudre pour solution de perfusion.

I.2.7. Biosynthèse des pristinamycines

- **Les gènes impliqués**

Le génome de *Streptomyces pristinaespiralis* se présente sous la forme d'un chromosome linéaire de 7580 kb. Les gènes de biosynthèse des pristinamycines (PI et PII) représentent environ 2,6 % du chromosome total et sont organisés en un cluster lui-même organisé en 4 régions nommées A à D, représenté figure 6 (Bamas-Jacques *et al.*, 1999).

La région A porte le gène de multi-résistance *ptr* qui rend la souche résistante aux PI, aux PII et à la rifampicine. Ce gène code pour une protéine appartenant à une famille de protéines membranaires qui exploitent le gradient de proton transmembranaire pour importer des sucres ou bien exporter des toxines telles que des antiseptiques ou des antibiotiques (Blanc *et al.*, 1995 b).

La région B porte les gènes *snaA* et *snaB* qui codent les 2 sous-unités de la PII-synthase, le gène *snaD* impliqué dans la synthèse du macrocycle PII et les gènes *snbC* et *snbDE* qui codent pour la PI synthase II et III.

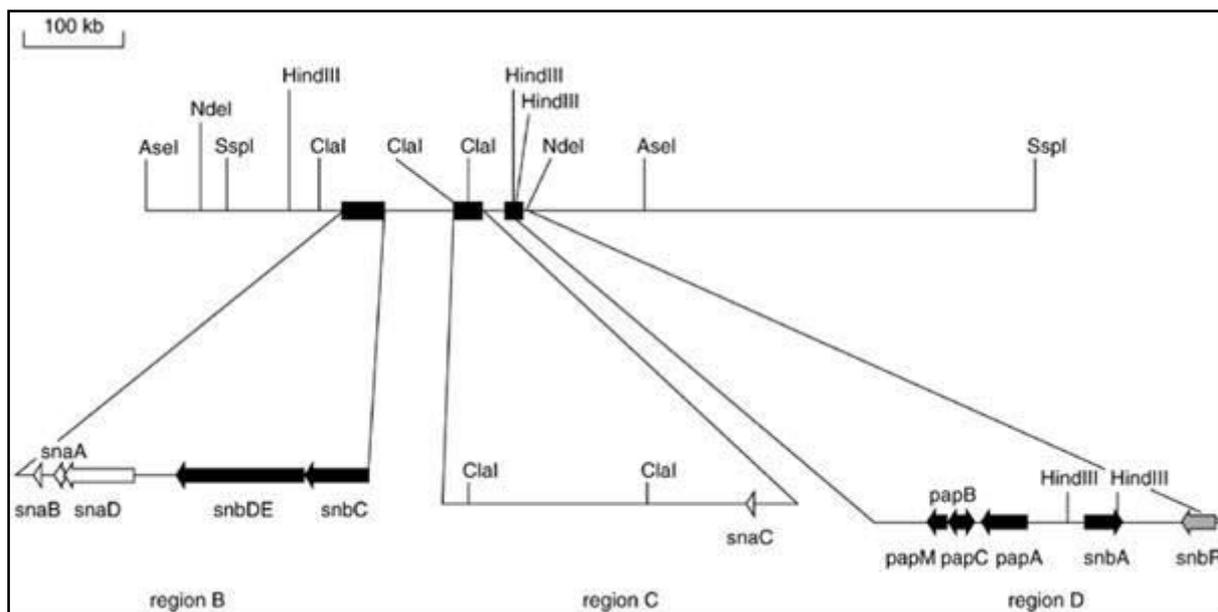


Figure 6 : Organisation génétique du “cluster” de biosynthèse des pristinamycines (Bamas-Jacques *et al.*, 1999). Seuls les gènes de biosynthèse et de résistance des régions B, C et D sont montrés. Le gène de résistance *ptr* de la région A se trouve en dehors de la région représentée. Seuls les sites de restriction remarquables sont indiqués. Les gènes de biosynthèse sont représentés en noir pour les PI et en blanc pour les PII. Les gènes de résistance sont indiqués en gris.

La région C porte le gène *snaC* codant pour une enzyme : une FMN-réductase, produisant des FMNH₂ nécessaires à la transformation des PII_B en PII_A.

La région D porte le gène *snbA* codant pour la PI synthase et les gènes *papA*, *papB*, *papC* et *papM* impliqués dans la biosynthèse de la diméthyl-*para*-amino phénylalanine (DMPAPA), un précurseur des PI. Cette région porte également le gène *snbR* qui pourrait être un second gène de résistance codant pour une protéine intervenant dans le transport des PI hors de la cellule (Blanc *et al.*, 1994).

- **Biosynthèse des Pristinamycines II :**

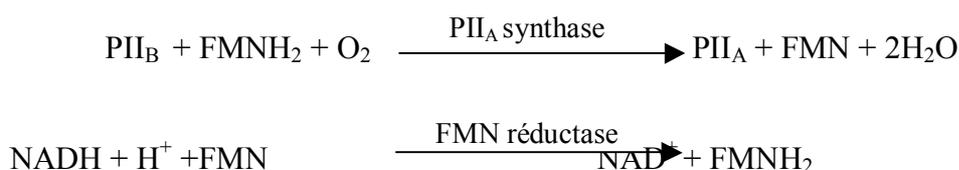
Les PII sont synthétisées à partir de 7 acétates, 4 acides aminés (valine, glycine, serine et proline) et un radical méthyle provenant de la méthionine. Ces précurseurs ont été identifiés par des expériences de marquage à l'aide d'isotopes radioactifs ou stables (Kingston, 1980 ; Lefevre *et al.*, 1983).

Le macrocycle PII serait synthétisé par une peptide synthase codée par le gène *snaD*. En effet, une souche mutante chez laquelle le gène *snaD* a été interrompu ne produit plus de pristinamycines II mais continue à produire des PI (Blanc *et al.*, 1994). Ce mutant est donc

bloqué dans la synthèse des PII, la protéine codée par le gène *snaD* est sans doute une peptide synthase.

Les PII_B sont à l'origine des PII_A. Cette réaction (oxydation de la liaison 2,3 de la D-proline) est réalisée par la PII_A-synthase, composée de 2 sous-unités codées par les gènes *snaA* et *snaB*. L'interruption de l'un ou l'autre de ces deux gènes provoque chez la souche mutée l'absence de production de PII_A avec une production normale de PII_B, tandis que la sur-expression de ces gènes provoque une conversion totale de PII_B en PII_A (Sezonov *et al.*, 1997).

Cette réaction est couplée à l'action d'une FMN-réductase codée par le gène *snaC*. En effet, lorsque le gène *snaC* est interrompu la transformation de PII_B en PII_A n'est plus réalisée, mais l'ajout d'une FMN-réductase permet de restaurer la production de PII_A (Thibaut *et al.*, 1995 ; Blanc *et al.*, 1995 a). On a donc le système de réactions couplées suivant :



Ainsi, 4 gènes, codant 4 enzymes, intervenant dans la biosynthèse des PII ont été identifiés (figure 7) :

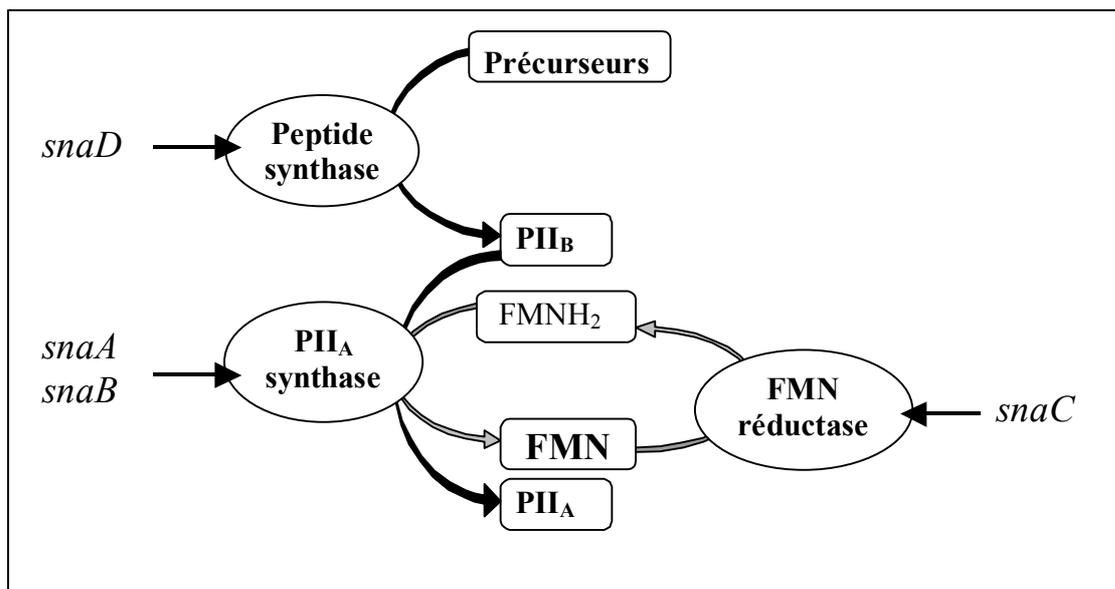


Figure 7 : Gènes et enzymes intervenant dans la biosynthèse des pristinamycines II.

La mutation de ces différents gènes peut permettre la production spécifique de PII_B ou de PII_A. Par exemple, la production spécifique de PII_A est recherchée afin de pouvoir produire des dérivés solubles à des fins pharmaceutiques (Sezonov *et al.*, 1997).

- **Biosynthèse des Pristinamycines I :**

Le macrocycle des PI est issu de la condensation de 7 précurseurs ou dérivés d'acides aminés, catalysée par des peptides synthases multi-fonctionnelles (Blanc *et al.*, 1994). Ces complexes peuvent être composés de plusieurs sous-unités et chaque sous-unité est responsable de l'intégration d'un précurseur. Les précurseurs sont des acides aminés ou des analogues d'acides aminés qui ont pour origine des acides aminés du métabolisme primaire. La détermination de ces constituants a pu être établie par l'hydrolyse acide des différentes molécules (Preud'homme *et al.*, 1965 et 1968). Ces constituants sont : un acide 3-hydroxypicolinique, une thréonine, un acide L-aminobutyrique, une proline, un pipécolate, une phénylglycine et une 4-monométhyl-*para*-amino phénylalanine (MMPAPA) pour la PI_B ou de sa forme diméthylée (DMPAPA) pour la PI_A. La détermination des voies de biosynthèse de ces précurseurs a été guidée par des hypothèses basées sur la similarité avec d'autres précurseurs d'antibiotiques semblables : la voie de biosynthèse de la MMPAPA et de sa forme méthylée la DMPAPA a été inspirée par les travaux sur la biosynthèse du chloramphénicol à partir du chorismate (Blanc *et al.*, 1997). Ainsi, le MMPAPA et le DMPAPA seraient synthétisés à partir du chorismate et leur synthèse ferait intervenir successivement les enzymes codées par les gènes *papA*, *papB*, *papC* et *papM*, (Blanc *et al.*, 1997).

La première étape de biosynthèse des PI serait due au produit du gène *snbA* qui permettrait l'activation par adénylation de l'acide 3-hydroxypicolinique, le premier acide de la chaîne, grâce à une 3-hydroxypicolinique acide : AMP ligase aussi appelée PI synthase 1.

Le gène *snbC* code pour les 2 sous unités d'une enzyme multi-fonctionnelle, la PI synthase 2, qui catalyse l'incorporation de la L-thréonine et l'acide L-aminobutyrique qui va être épimérisé et qui est le troisième résidu du macrocycle PI (Crécy-Lagard *et al.*, 1997 a et 1997 b).

Le gène *snbDE* code pour deux enzymes : la PI synthase 3 (SnbD) qui permet la thioestérification et la N méthylation du cinquième résidu : le DMPAPA, et l'activation de la proline, et la PI synthase 4 (SnbE) qui est une L-phénylglycine : AMP ligase. Ces deux

enzymes vont permettre la condensation de la proline, du pipécolate, de la phenylglycine et de la MMPAPA (pour PI_B) ou du DMPAPA (pour PI_A) (Thibaut *et al.*, 1997).

Les précurseurs étant produits, le cyclohexadepsipeptide branché est synthétisé, puis les modifications finales du macrocycle ont lieu.

I.2.8. Procédés de biosynthèse

Un brevet a été déposé par Rhône-Poulenc en 1961, portant sur la production d'un antibiotique, désigné par le numéro 7293 RP et nommé pristinamycine, par le micro-organisme *Streptomyces pristinaespiralis*. La culture est décrite comme pouvant être réalisée en milieu solide ou liquide, mais avec une préférence pour la culture liquide, aérobie avec un débit d'oxygène de 0,3 à 2,0 litre d'air/litre de milieu/minute, un pH compris entre 6,0 et 7,8 et une température comprise entre 23 et 35°C.

La purification de l'antibiotique est réalisée par une première étape d'extraction à l'aide de solvants organiques. L'antibiotique peut ensuite être purifié par différentes méthodes telles que la chromatographie (Rhône-Poulenc SA, 1965).

I.3. Facteurs de culture pouvant influencer la production d'antibiotiques

De nombreux facteurs peuvent affecter la production des antibiotiques, tels que la nature de l'inoculum, la composition du milieu de culture et les conditions de culture (pH, température, aération).

I.3.1. Inoculum

Selon les souches utilisées, la nature même de l'inoculum peut affecter la croissance et/ou la production des métabolites secondaires. Chez *S. coelicolor* A3(2) des essais menés à partir de spores ou de cellules végétatives ont été réalisés. Bien que les productions de biomasse et d'actinorhodine maximales atteintes soient comparables, le taux de croissance est plus faible lors d'un ensemencement réalisé à partir de cellules végétatives (Doull et Vining, 1990). Dans le cas de *S. natalensis*, un inoculum à partir de spores permet l'obtention d'un titre en

natamycine environ 40 % supérieur à celui obtenu avec des cellules végétatives (el-Enshasy, 2000).

Un autre paramètre important est le taux d'ensemencement. Lors d'un ensemencement à partir de spores, il existe généralement une valeur seuil au-dessus de laquelle la taille de l'inoculum n'a plus d'effet sur la croissance et la production de métabolites secondaires (Doull et Vining, 1990).

L'âge de la préculture peut également affecter la production : ainsi chez *S. pristinaespiralis*, la production industrielle a lieu en milieu complexe, lequel est généralementensemencé à partir d'une préculture âgée d'une quarantaine d'heures. Des travaux portant sur la mise au point d'un milieu de production synthétique afin d'effectuer des études physiologiques ont montré la nécessité de standardiser la pré-culture afin de faire face à des problèmes de reproductibilité (Paquet, 1990). Des expériences menées sur l'effet de l'âge de la préculture ont montré que les inocula âgés de 24 h conduisaient, en milieu synthétique et en réacteur, au meilleur titre en pristinamycines, les précultures plus âgées donnant des titres plus faibles et une moins bonne reproductibilité (Paquet, 1990). Dans le cas de *S. ambofaciens*, l'utilisation d'un inoculum en phase de croissance rapide (24 h) permet une production de spiramycine plus précoce qu'un inoculum en transition entre la phase de croissance rapide et la phase stationnaire (44 h) (Drouin, 1996).

I.3.2. Composition du milieu, effet des facteurs nutritionnels

La composition du milieu peut influencer sur la production des métabolites secondaires. En effet, il est couramment admis que la production des métabolites secondaires intervient lorsque la croissance se trouve limitée par l'un des substrats du milieu (Demain *et al.*, 1983 ; Doull et Vining, 1990 ; Cheng *et al.*, 1995). Les trois principaux facteurs pouvant être à l'origine de cette limitation sont les sources de carbone, d'azote et de phosphate. Généralement lorsque l'un de ces éléments devient limitant, la croissance ralentit puis la production des métabolites secondaires tels que les antibiotiques a lieu au cours de l'idiophase. La production d'antibiotiques peut cependant intervenir alors qu'il ne semble pas y avoir de limitation nutritionnelle. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas de la production d'actinorhodine par *S. coelicolor* A3(2) par Doull et Vining (1990) dans le cas d'un ensemencement à partir de cellules végétatives et a été attribué d'une part au fait que les cellules végétatives étaient déplacées dans un milieu moins riche mais également au fait que dans ces conditions, *S. coelicolor* A3(2) forme des pelotes compactes au sein desquelles il existerait des limitations

nutritionnelles partielles. Dans certaines conditions, cette production peut avoir lieu au cours de la phase de croissance sans limitations nutritionnelles, mais avec des substrats lentement métabolisable. Ainsi, Voelker et Altaba (2001) observent une production des pristinamycines au cours de la phase de croissance lorsque le milieu de culture de *S. pristinaespiralis* contient du nitrate de sodium comme seule source d'azote.

En plus des trois facteurs cités ci-dessus, l'oxygène peut également avoir un effet régulateur de la production des métabolites secondaires (Clark *et al.*, 1995).

- **Effet de la source de carbone**

Les milieux de production contiennent généralement une source de carbone rapidement métabolisable, telle que le glucose. Cette source de carbone peut dans certains cas exercer une répression catabolique soit sur la croissance soit sur la production des métabolites secondaires. Cette répression catabolique est liée à la régulation soit de l'expression du gène de biosynthèse des enzymes impliquées, soit des activités enzymatiques impliquées dans la synthèse des métabolites.

De nombreuses productions d'antibiotiques sont soumises à cette régulation, le plus généralement par le glucose mais d'autres sources de carbone telles que le glycérol ou le citrate peuvent également agir de cette manière (Vu-Trong *et al.*, 1980 ; Martin et Demain, 1980 ; Demain, 1982 ; Bushell, 1989 ; Lounès *et al.*, 1995, 1996 a et 1996 b). Afin de réduire cet effet, le glucose peut être apporté progressivement *via* un procédé semi-continu, ou bien des sources complexes de carbone, plus lentement assimilables peuvent être utilisées. Ainsi, sous de faibles concentrations en phosphate, la production de spiramycine par *S. ambofaciens* est favorisée par la présence de dextrine en plus du glucose, alors que des concentrations initiales croissantes en glucose conduisent à une augmentation des taux de croissance et à une chute de la production (Lounès *et al.*, 1996 a). De même, la nature de la source de carbone va influencer sur la production de spiramycine par *S. ambofaciens*. Cette production semble être favorisée par les glucides plus lentement assimilables tels que les dextrines et l'amidon (Lamsaif, 1992 ; Lounès *et al.*, 1996 a). Ces sources complexes doivent être hydrolysées préalablement à leur assimilation. Cette étape permet une alimentation en carbone lente et continue qui créerait des conditions de limitation en carbone.

Chez *S. clavuligerus*, les sources de carbone permettant une forte croissance (glucose et maltose) entraînent une faible production de céphamycines. Au contraire, les sources de carbone conduisant à de faibles croissance (α -cétoglutarate et succinate) entraînent une forte production de céphamycines (Aharonowitz et Demain, 1978).

En milieu solide, la présence de glucose dans le milieu de culture de *S. lividans* inhibe la production d'actinorhodine en réprimant la synthèse de l'ARNm issu du gène de régulation *afsR2* et responsable de l'activation de la production de l'antibiotique (Kim *et al.*, 2001).

Le glucose peut également inhiber la synthèse d'enzymes intervenant dans la biosynthèse des antibiotiques. C'est le cas par exemple pour *S. fradiae* : le glucose provoque une chute de la biosynthèse de tylosine en réprimant la synthèse de la carboxyl-transférase et de la carboxylase conduisant respectivement à la formation du propionyl-CoA et du méthylmalonyl-CoA, précurseurs du noyau lactonique (Vu-Trong *et al.*, 1980).

- **Effet de la source d'azote**

Les principales sources d'azote présentes dans les milieux de culture utilisés pour la production d'antibiotiques sont les ions ammonium, les acides aminés et dans une moindre mesure les nitrates. Les voies d'intégration de l'azote dans le métabolisme ont déjà été décrites.

Les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ammonium chez les *Streptomyces* sont la glutamine synthase (GS), la glutamate déshydrogénase (GDH) et la glutamate synthase (GOGAT). Ces enzymes ne sont cependant pas présentes chez tous les *Streptomyces* (Aharonowitz et Friedrich, 1980 ; Brana *et al.*, 1986). Une voie alternative faisant intervenir une alanine déshydrogénase (ADH) et qui ferait intervenir une alanine transaminase (AT) existe chez certaines souches (Voelker et Altaba, 2001). La figure 8 représente le métabolisme des différentes sources d'azote *via* ces différentes enzymes (Voelker et Altaba, 2001).

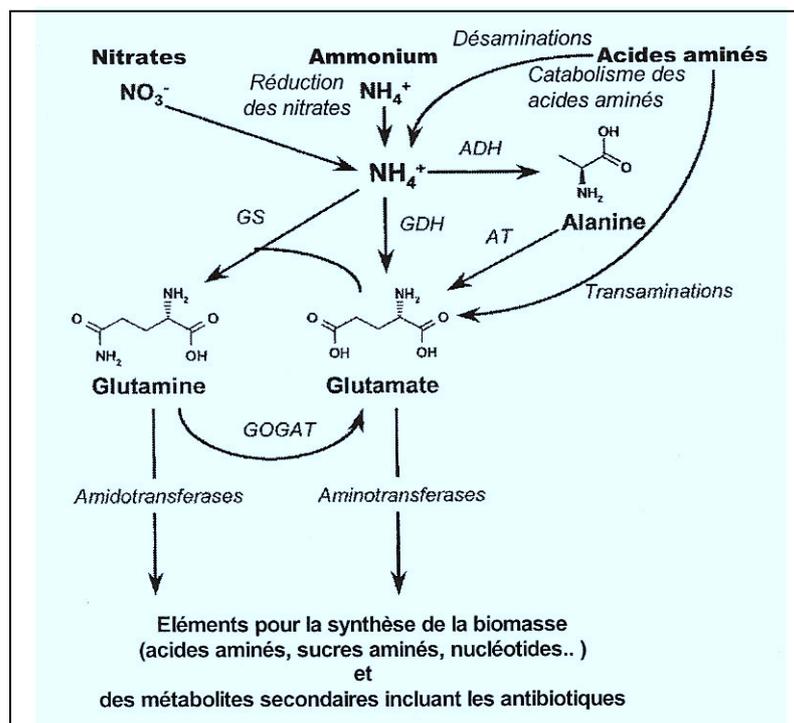


Figure 8 : Interconversion des molécules azotées dans le métabolisme central de l'azote chez *Streptomyces* (Voelker et Altaba, 2001). GDH : glutamate déshydrogénase, GS : glutamine synthase, GOGAT : glutamate synthase, ADH : alanine déshydrogénase, AT : alanine transaminase.

Ces différentes enzymes peuvent être régulées par la concentration en ions ammonium, ainsi que par la nature de la source d'azote. Chez *S. ambofaciens* RP 18110 le taux de biosynthèse de la GDH diminue lorsque la concentration en ions ammonium augmente et la GOGAT est réprimée (Lamsaïf, 1992).

Les sources d'azotes rapidement assimilables et en particulier les sels d'ammonium peuvent réprimer la biosynthèse des métabolites secondaires. Il a été montré qu'une concentration trop importante en ions ammonium pouvait inhiber la production d'antibiotiques (Aharonowitz et Friedrich, 1980 ; Brana et Demain, 1988). C'est le cas par exemple lors de la production de spiramycine par *S. ambofaciens*. Cette production se trouve réduite lorsque les ions ammonium sont à une concentration égale à 100 mM. (Lebrihi *et al.*, 1992). De même, la production de tylosine par *S. fradiae* KA-427 en milieu défini est inhibée par la présence d'ammonium et de phosphate organique (Omura *et al.*, 1984)

Lors de cultures de *S. noursei* en présence d'ammonium et/ou de nitrates, de fortes concentrations en ions ammonium ont un effet négatif sur la production de nystatine lorsque phosphate et glucose sont en excès. Lorsque les conditions deviennent limitantes en ions

ammonium, la production de nystatine augmente. L'utilisation de nitrate de sodium diminue le titre en nystatine de 50 % par rapport au titre final obtenu en présence de source d'azote à base d'ammonium (Jonsbu *et al.*, 2000).

Lors de cultures de *S. flocculus* sur un milieu défini contenant du glucose et de l'ammonium comme seules sources de carbone et d'azote, une concentration initiale croissante en ion ammonium conduit à une augmentation de la croissance et parfois à une baisse de la production en steptonigrine. L'ajout dans le milieu d'un agent capable de piéger l'ammonium permet d'augmenter le titre final en steptonigrine, de même que l'apport en continu de faibles quantités d'ammonium tout au long de la culture. En revanche lorsque l'ammonium est totalement retiré du milieu, la production cesse (Wallace *et al.*, 1990).

La production de spiramycine par *S. ambofaciens* est défavorisée lorsque la concentration dans le milieu de culture en ammonium devient en excès par rapport à la source de carbone. Les ions ammonium sont rapidement assimilés et mènent à des taux de croissance élevés. En revanche, les nitrates qui sont vraisemblablement réduits en ammonium de manière lente permettent une croissance plus lente et une productivité spécifique en spiramycine supérieure à celle obtenue avec l'ammonium (Lamsaif, 1992).

L'effet inhibiteur de l'ammonium est souvent dû à un effet régulateur sur les enzymes de la voie de biosynthèse des antibiotiques, l'ajout dans le milieu d'intermédiaires de la voie de biosynthèse permet de pallier la présence en excès des ions ammonium (Lebrihi *et al.*, 1992 ; Omura *et al.*, 1984 ; Lounès *et al.*, 1995).

En dépit de l'action généralement inhibitrice des ions ammonium sur la biosynthèse des antibiotiques, les sels d'ammonium, en fonction de leur nature, peuvent favoriser dans certains cas la production des antibiotiques. C'est le cas par exemple du sulfate d'ammonium, qui a été décrit comme étant la meilleure source d'azote pour la production de rapamycine par Lee *et al.* (1997), ou encore du succinate d'ammonium qui permet l'obtention de la meilleure productivité par *S. hygroscopus* lors de la production du macrolide AK-111-81 (Geshva *et al.*, 2005). Dans ce dernier cas, il y aurait également un effet du succinate qui pourrait être intégré dans la voie de biosynthèse du macrolide et servir de précurseur.

Les acides aminés grâce à leur lente dégradation permettent d'entretenir une limitation en azote, ce qui fait d'eux une source d'azote de choix pour la composition de milieux ayant

pour but la production des métabolites secondaires. Chez une même souche certains acides aminés seront plus ou moins favorables à la production des métabolites secondaires, en fonction des précurseurs requis et des voies de biosynthèse. Ainsi, chez *S. pristinaespiralis*, l'utilisation de valine comme seule source d'azote ne permet pas l'obtention de pristinamycines à cause de l'excrétion de α -cétio-isovalérate (un des précurseurs) dans le milieu. (Voelker et Altaba, 2001).

Dans le cadre de l'étude de la production de spiramycine par *S. ambofaciens*, quatorze acides aminés ainsi qu'un hydrolysate de caséine ont été testés comme unique source d'azote, comparativement à la concentration optimale en NH_4Cl . Ces acides aminés ont pu être classés en trois catégories en fonction de leur efficacité. Certains acides aminés permettent une bonne production même à des fortes concentrations (100 mM). D'autres permettent une bonne production mais à des concentrations plus faibles (25 et 50 mM). Enfin, certains ne permettent qu'une faible production, la méthionine quant à elle, ne permet pas la production de spiramycine. Lors de ces cultures, certains acides aminés tels que l'arginine et la glutamine, ont été à l'origine d'une accumulation d'ions ammonium dans le milieu. Lorsque ces ions sont excrétés en forte quantité, la production de spiramycine est plus faible. Ce phénomène peut être expliqué par l'effet négatif des ions ammonium sur la production de spiramycine (Lamsaïf, 1992).

- **Influence de la source de phosphates**

La présence de phosphate dans le milieu de culture semble favoriser le métabolisme primaire : de façon générale, l'addition de phosphate dans une culture en cours de production d'antibiotique entraîne l'arrêt de la biosynthèse de l'antibiotique et une reprise de la croissance (Martin et Demain, 1976).

De nombreux antibiotiques produits par les actinomycètes requièrent des concentrations en phosphate qui sont suboptimales pour la croissance. Les concentrations inhibant la production varient en fonction des différentes espèces et les antibiotiques peuvent être classés en trois groupes selon la concentration tolérée en phosphates : ceux dont la production est inhibée par des concentrations inférieures ou égales à 1 mM, ceux tolérant des concentrations comprises entre 1 et 10 mM et pour finir les antibiotiques dont la production est inhibée par des concentrations supérieures à 10 mM (Martin, 1977 ; Curdova *et al.*, 1989).

Ainsi, la production de tylosine par *S. fradiae* KA-427 en milieu défini est inhibée par le phosphate inorganique (Omura *et al.*, 1984). Chez *S. coelicolor* A3(2), la production d'actinorhodine survient lorsque le phosphate devient limitant ; une concentration supérieure à 2,5 mM provoque une chute du taux de production (Doull et Vining, 1990).

A l'inverse, la production d'avermectine par *S. avermitilis* tolère de hautes concentrations en phosphate, des concentrations initiales variant de 1 à 20 mM n'affectant pas significativement la production (Curdova *et al.*, 1989). Pour *S. pristinaespiralis* lorsque le phosphate est épuisé, la croissance continue mais avec un taux de croissance plus faible, grâce aux "réserves" de la cellule (Voelker et Altaba, 2001).

Différents mécanismes ont été proposés pour cette régulation par le phosphate. D'une part, le phosphate pourrait exercer une répression ou une inhibition de phosphatases intervenant dans la voie de biosynthèse de métabolites secondaires ayant des intermédiaires phosphorylés. C'est le cas par exemple de la streptomycine phosphatase (Walker et Walker, 1971) et de la phosphatase alcaline (Majumdar et Majumdar, 1971) qui sont inhibées par le phosphate. Des enzymes autres que les phosphatases peuvent également être régulées par le phosphate comme par exemple les synthétases de la céphamycine et de l'acide clavulanique (Lebrihi *et al.*, 1987). D'autre part, le phosphate pourrait avoir un rôle indirect, *via* des effecteurs dont les activités seraient modulées par le phosphate, comme par exemple l'ATP. Chez différents micro-organismes la concentration en ATP chute lors du passage à l'idiophase (Martin et Demain, 1980 ; Bushell, 1989). Lors de la production de candicine par *S. griseus*, l'addition de phosphate au cours de la phase de production provoque une augmentation de la concentration en ATP intracellulaire suivi d'une diminution de la vitesse de production de l'antibiotique (Martin et Demain, 1976).

Pour finir, le phosphate pourrait également avoir un effet indirect tel que le piégeage des ions ammonium (Omura *et al.*, 1980) ou des ions métalliques (Weinberg, 1978), ce qui pourrait conduire à une limitation de ces éléments dans le milieu.

- **Influence de la teneur en oxygène**

La teneur en oxygène dissous du milieu peut jouer un rôle important : la limitation en oxygène dissous va agir de manière analogue aux limitations en substrat et peut selon les cas stimuler ou inhiber la production de métabolites secondaires (Clark *et al.*, 1995).

Ainsi, durant la phase de croissance de *S. clavuligerus* le niveau d'oxygène dissous atteint une valeur proche de zéro pendant environ 10 h. Lorsque ce niveau est maintenu à une valeur de 50 ou 100 % de la valeur de saturation, la production d'antibiotique est multipliée respectivement par deux ou trois (Rollins *et al.*, 1988). Lors des cultures de *S. virginiae*, l'augmentation de la teneur en oxygène du milieu conduit également à une augmentation de la production de virginiamycine (Shioya *et al.*, 1999).

Chez *S. fradiae*, la concentration en oxygène dissous influe sur la nature de l'antibiotique produit : lors des expériences réalisées avec un taux d'oxygène dissous élevé, la concentration en tylosine produite est augmentée d'environ 10 % et de plus, un second antibiotique, la macrocine, absent lors des fermentations précédentes, est produit dans un ordre de concentration d'un tiers de la quantité de tylosine produite (Chen et Wilde, 1991).

Chez *S. lividans* il a été démontré que l'augmentation de la consommation en oxygène entraîne une augmentation du turn-over en ATP et de la phosphorylation oxydative du NADH. Cette dernière a pour conséquence une augmentation de l'activité du TCA et un léger basculement de la voie des PPP vers la glycolyse (Daae et Ison, 1999).

Chez *Amycolaptosis orientalis* (*Streptomyces orientalis*), Dunstan *et al.* (2000) ont observé que lors de cultures en limitation d'oxygène il y a moins de biomasse produite et pas de vancomycine, alors que ces mêmes cellules, lorsqu'elles sont transférées dans un milieu suffisamment oxygéné, sont capables de produire rapidement l'antibiotique, indiquant que toutes les enzymes requises sont déjà présentes. Dans les cultures avec suffisamment d'oxygène, la production de l'antibiotique coïncide avec une chute du taux de biosynthèse des protéines et de plus l'incapacité à produire l'antibiotique n'est pas liée à une insuffisance en ATP. Il semble que l'oxygène présent soit utilisé pour la production de biomasse et qu'il n'y en ait plus suffisamment pour la production de l'antibiotique. Le manque d'oxygène peut également avoir empêché l'induction des enzymes requises pour l'étape finale de la biosynthèse de la vancomycine (Dunstan *et al.*, 2000).

- **Inducteurs de la production d'antibiotiques**

Le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* A3(2) a révélé non seulement que de nombreux gènes sont dédiés à la biosynthèse des métabolites secondaires, mais également l'existence de nombreux gènes de régulation (Bentley *et al.*, 2002). Parmi ces gènes, certains vont réguler la production des antibiotiques. Il existe notamment une famille de protéines réprimant la biosynthèse, qui permet l'expression sélective de ces gènes. Cette répression peut être levée, et par conséquent entraîne une expression sélective de gènes *via* une liaison spécifique avec des ligands de type γ -butyrolactone. (Yamada et Nihira, 1998). Ainsi, chez *S. virginiae*, la protéine BarA est une protéine se liant à l'ADN sur une région promoteur. Cette protéine est également un récepteur spécifique de l'autorégulateur VB (*virginiae* butanolide). Lorsque VB se lie à BarA, cette dernière se sépare de l'ADN et permet ainsi la transcription du gène en aval du site de fixation de BarA, ce qui conduit à la production de virginiamycine (Kinoshita *et al.*, 1997).

L'interaction entre les molécules de type γ -butyrolactone et leur récepteur influence la sporulation et la biosynthèse des antibiotiques (Wang *et al.*, 2003).

Il a été estimé qu'environ 60 % des Streptomyces utilise ce type de molécule comme molécules signal diffusibles (Horinouchi et Beppu, 1992 ; Yamada, 1999). Ces inducteurs de production, efficaces pour des concentrations de l'ordre de 10^{-9} M (Yamada *et al.*, 1987) sont également appelés autorégulateurs car ils sont produits par la bactérie elle-même et sont considérés comme des "hormones microbiennes" (Kinoshita *et al.*, 1997). Ces molécules ne sont significativement produites que pendant les phases de limitations nutritionnelles constituant donc des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques (Delaunay *et al.*, 2003). Ce type de régulation a été décrit chez différentes souches : *S. virginiae* pour la production de virginiamycine S (Kinoshita *et al.*, 1997 ; Namwat *et al.*, 2002), *S. griseus* pour la production de streptomycine (Khokhlov et Tovarova, 1979).

Chez *S. pristinaespiralis* NRRL2958, les gènes de biosynthèse des pristinamycines sont organisés en cluster. Parmi ce cluster se trouve le gène *papRI* (putative regulator of pristinamycin antibiotic production), un gène codant pour une protéine régulant la biosynthèse des antibiotiques chez les *Streptomyces*. La protéine SpbR (*S. pristinaespiralis* butyrolactone-responsive transcriptional repressor), faisant partie de la famille des protéines récepteurs de γ -butyrolactones, se fixe en aval du promoteur du gène *papRI*. Des composés de structures apparentés aux butenolides sont capables d'inhiber la formation du complexe SpbR-P*papRI*.

Parmi les métabolites synthétisés par *S. pristinaespiralis* NRRL2958, il existe un ligand similaire aux autorégulateurs de butyrolactone avec lequel la protéine SpbR va interagir de façon spécifique. L'inactivation du gène *spbR* provoque la perte de la production des pristinamycines, mais également des troubles de la croissance et de la production du mycélium aérien (Folcher *et al.*, 2001). Cependant, il semblerait que chez la souche *S. pristinaespiralis* Pr11, la production de pristinamycines n'est pas induite par des facteurs de type lactones. Néanmoins, 3h avant le début de la production, elle synthétise un facteur, non identifié à ce jour, capable d'induire la production de pristinamycines chez une souche non productrice, *S. pristinaespiralis* CL6/4 (Paquet *et al.*, 1992).

Des effecteurs nucléotidiques phosphorylés tel que le nucléotide guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) sont également capables de réguler la biosynthèse des antibiotiques. Chez *S. coelicolor* A3(2), les ppGpp jouent un rôle important dans la biosynthèse de l'actinorhodine. Une corrélation a été observée entre l'accumulation intracellulaire de ppGpp et le déclenchement de la production lors de l'épuisement de la source d'azote. L'interruption du gène codant pour la ppGpp synthétase n'a pas d'effet sur le taux de croissance de la souche, mais entraîne la perte de la production d'undecylprodigiosine et d'actinorhodine dans les conditions de limitations en azote permettant habituellement leur production (Chakraborty et Bibb, 1997). Leur présence permet l'activation de la transcription de gènes de régulation spécifiques de la voie de biosynthèse de l'actinorhodine (Hesket *et al.*, 2001).

De plus, il existe des inducteurs dits non spécifiques tels que les acides aminés, précurseurs utilisés pour la biosynthèse des antibiotiques. Ainsi, la production de céphalosporine C chez *Cephalosporium acremonium* est stimulée par la présence de méthionine, un des précurseurs de l'antibiotique qui intervient comme donneur de soufre pour la synthèse de céphalosporine C. En plus de cette fonction, la méthionine pourrait avoir un rôle d'inducteur de la voie de biosynthèse (Demain et Zhang, 1998).

I.3.3. Influence des conditions de culture sur la croissance et la production de métabolites secondaires

En plus des effets de la préculture et de la composition du milieu, les conditions de culture peuvent également influencer sur la croissance et la production d'antibiotiques.

- **Influence du pH**

La gamme de pH optimale pour les *Streptomyces* se situe entre 6,5 et 8,0. Les cultures de *S. pristinaespiralis* sont conduites à un pH de 6,8, ce dernier étant régulé soit par un agent tampon lors des cultures en fioles d'Erlenmeyer, soit par l'ajout d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de potassium lors des cultures en réacteur (Corvini, 2000).

Les conditions de pH peuvent intervenir sur la production des métabolites secondaires (James *et al.*, 1991). Par exemple, des cellules immobilisée de *S. coelicolor* A3(2), sans contrôle du pH, produisent de l'actinorhodine. Dans les mêmes conditions de culture, lorsque le pH est maintenu à une valeur de 7,2, la culture produit un autre métabolite : l'undécylprodigiosine (Elibol, 2002).

- **Influence de l'agitation sur la morphologie, la croissance et la production de métabolites secondaires**

La production des métabolites secondaires peut également être liée à la morphologie de la souche. Ainsi la production de spiramycine par *S. ambofaciens* est plus importante lorsque la souche forme des filaments que lorsqu'elle forme des pelotes (Drouin, 1996).

Chez *S. noursei*, un marquage fluorescent (3,3'-dihexylocarbocyanine) du mycélium a permis d'observer que lorsque les pelotes grossissent au-delà d'une taille "critique", la croissance et la production de nystatine cesse. De plus, ces événements coïncident avec la perte d'activité métabolique au sein de ces pelotes. Ces phénomènes sont probablement dus à une limitation de la diffusion de l'oxygène ou d'autres nutriments au sein de la pelote (Jonsbu *et al.*, 2002).

La vitesse d'agitation est un facteur pouvant influencer sur la morphologie des *Streptomyces* lors des cultures en réacteur. L'augmentation de la vitesse d'agitation provoque un accroissement des forces de cisaillement auxquelles vont être soumis les microorganismes filamenteux. Ces forces vont provoquer une lyse du mycélium et mènent souvent à l'apparition de structures plus compactes (Ohta *et al.*, 1995 ; Tamura *et al.*, 1997). Les effets des forces de cisaillement varient cependant selon la souche, le milieu de culture (Roubos *et al.*, 2001) et les conditions de préculture. L'état physiologique de la souche peut également avoir une influence (Jüsten *et al.*, 1998 a).

Lors de cultures d'*Aspergillus oryzae* ou de *Penicillium chrysogenum* en réacteur, l'augmentation de la vitesse d'agitation, au-delà d'une valeur seuil, entraîne une diminution

de la taille moyenne des pelotes (Amanullah *et al.*, 2000). Cette fragmentation semble atteindre majoritairement les mycéliums sous forme d'agrégats lâches qui perdent des fragments ce qui réduit progressivement leur taille (Jüsten *et al.*, 1998 b).

Lors de cultures en réacteurs en mode discontinu, *S. clavuligerus* est très sensible au forces de cisaillement lors de l'augmentation de la vitesse d'agitation, ce qui se traduit par une augmentation de la lyse cellulaire. De plus, la fragilité de la souche dépend de la composition du milieu (Roubos *et al.*, 2001). Lors de cultures de *S. virginiae*, l'augmentation de la vitesse d'agitation lors de la phase de production conduit à une augmentation de la production de virginiamycine, indépendamment de la teneur en oxygène dissous du milieu (Shioya *et al.*, 1999).

- **Influence du potentiel d'oxydoréduction**

Le potentiel d'oxydo-réduction (E) dépend des concentrations des espèces oxydantes et réductrices présentes dans le milieu selon la formule de Nernst :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{(\text{oxydant})}{(\text{réducteur})} \right]$$

où : E^0 = Potentiel standard

R = constante des gaz parfaits (8,31 J.K⁻¹.mol⁻¹)

T = température en degré Kelvin

n = nombre d'électrons mis en jeux

F = constante de Faraday (9,65.10⁴ J.V⁻¹.mol⁻¹)

Plusieurs études ont mis en évidence une relation entre le potentiel d'oxydoréduction du milieu et l'activité physiologique du micro-organisme étudié. Vekshin et Malkov (1986) ont étudié les variations du potentiel d'oxydation du milieu durant la production d'amphotéricine B par *Streptomyces nodosus*. Chaque étape du développement de la culture était caractérisée par un changement du potentiel dans une direction précise, de même que lors de la production de l'antibiotique. Ainsi, cela a permis, en combinaison avec les autres paramètres, une estimation de l'activité physiologique de la culture à tout instant.

La valeur du potentiel d'oxydoréduction peut également être utilisée comme dans le cas de la production de xylitol par *Candida parapsilosi*, pour suivre l'oxygène dissous dans le milieu. Une augmentation de l'aération permet d'augmenter le potentiel d'oxydoréduction et de

favoriser la croissance au détriment de la production de xylitol. La meilleure production est obtenue pour un potentiel de 100 mV. La culture est divisée en deux phases, tout d'abord une phase de forte croissance (aération suffisante) puis une phase de production en maintenant le potentiel d'oxydoréduction à 100 mV (aération réduite) (Oh *et al.*, 1998).

Dans le cas de la production de xylitol par *Candida tropicalis*, la présence de glucose en faible quantité favorise la bioconversion du D-xylose en xylitol. La valeur du potentiel d'oxydoréduction semble être liée à la consommation du glucose : la valeur du potentiel diminue lorsque le glucose est consommé. Ce phénomène serait lié à la production d'espèces réduites telles que NADH et NADPH issues du métabolisme du glucose. Cette propriété a été utilisée afin de contrôler l'apport en glucose dans le milieu, la quantité de glucose ainsi ajoutée permettant de maintenir le potentiel d'oxydoréduction à une valeur déterminée. La meilleure production de xylitol est obtenue lorsque le potentiel d'oxydoréduction du milieu est maintenue à -180 mV, ce qui conduirait au meilleur ratio NAD(P)H/NAD(P) favorisant la bioconversion du D-xylose en xylitol (Sheu *et al.*, 2003).

Dans le cas de la production de L-leucine par *Brevibacterium lactofermentum*, la meilleure production est obtenue lorsque l'oxygène devient limitant et que la respiration est inhibée. La teneur en oxygène dissous du milieu est proportionnelle à la valeur du potentiel d'oxydoréduction et de plus, cette mesure est plus sensible que celle réalisée par la sonde à oxygène pour les faibles teneurs en oxygène. La valeur du potentiel d'oxydoréduction est donc utilisée afin de contrôler l'apport en oxygène dissous, la meilleure production de L-leucine étant obtenue pour des valeurs du potentiel d'oxydoréduction autour de -200 mV (Akashi *et al.*, 1978).

Lors de la culture en réacteur en mode continu de *S. pristinaespiralis*, la production de pristinamycines a lieu de manière cyclique et une baisse brutale du potentiel d'oxydoréduction du milieu est observée. Celle-ci est corrélée au déclenchement de la production des pristinamycines (Corvini, 2000). Cette chute brutale ne semble cependant pas due à l'excrétion en elle-même des pristinamycines puisque la valeur du potentiel retrouve son état initial alors que les pristinamycines n'ont pas encore atteint leur titre maximal.

Lors de la biosynthèse d'oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*, le potentiel d'oxydoréduction diminuait jusqu'à des valeurs négatives durant les premières heures de culture. Une relation a été établie entre la production d'antibiotique et les valeurs du potentiel d'oxydoréduction : plus ces valeurs étaient basses et moins il y avait d'antibiotique présent en

fin de culture. De plus, les valeurs du potentiel d'oxydoréduction durant le premier jour de culture déterminaient le niveau de production de l'antibiotique (Vlasov, 1996).

La production d'antibiotique peut également être stimulée ou inhibée par la valeur du potentiel d'oxydoréduction du milieu. Le potentiel d'oxydoréduction du milieu peut être modifié soit par une modification de la teneur en oxygène, de l'aération du milieu, soit par l'ajout de molécules oxydantes ou réductrices. Pour certaines cultures, la meilleure production est obtenue pour une teneur en oxygène et une valeur de potentiel d'oxydoréduction bien définies, la quantité d'antibiotique produit pouvant dépendre de la valeur du potentiel d'oxydoréduction. Lors de la production d'imbricine par *S. imbricatus*, les plus forts taux de production sont obtenus pour les plus fortes vitesses d'aération. Sous de fortes aérations, la chute du potentiel d'oxydoréduction, provoquée artificiellement par des agents réducteur tels que l'acide ascorbique, la L-tyrosine ou le potassium hexacyanoferrate(II) ($K_4Fe(CN)_6$) permet de stimuler la production alors que pour les faibles valeurs d'aération il y aurait plutôt une inhibition de la production. En revanche, sous de plus faibles vitesses d'aération, dans des conditions d'aérations insuffisantes, la biosynthèse de l'antibiotique peut être provoquée en augmentant le potentiel d'oxydoréduction du milieu. Ainsi une forte production d'imbricine requiert non seulement une aération efficace mais également des valeurs définies du potentiel d'oxydoréduction du milieu (Sukharevich *et al.*, 1998).

Sukharevitch *et al.* (1978) ont observé que lorsque *Actinomyces levoris* est cultivé dans des conditions provoquant la chute du potentiel d'oxydoréduction, une baisse significative de la croissance et de la production de levorine est observée. La chute de l'activité catalase, accompagnée d'une augmentation de l'activité déshydrogénase est l'une des causes des diminutions observées. L'ajout de KCl (0,2%) dans le milieu stimule l'activité catalase et permet d'augmenter la concentration en biomasse et de restaurer la production de l'antibiotique.

II.1. Souches utilisées.....	42
II.2. Milieux de culture.....	42
II.2.1. Milieu de sporulation et de dénombrement des spores de <i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	42
II.2.2. Composition du milieu complexe insoluble de préculture ICS	42
II.2.3. Milieu de culture synthétique MPS2	43
II.2.4. Milieux de culture de <i>Listeria ivanovii</i>	43
II.3. Conditions de culture.....	44
II.3.1. Préparation et conservation du stock de spores de <i>S. pristinaespiralis</i> pr11	44
II.3.2. Préculture de <i>S. pristinaespiralis</i> sur milieu complexe	44
II.3.3. Culture de <i>S. pristinaespiralis</i> sur milieu synthétique en fiole d'Erlenmeyer	44
II.3.4. Culture de <i>S. pristinaespiralis</i> en bioréacteur sur milieu synthétique en mode discontinu	45
II.4. Estimation de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires.....	46
II.4.1. Estimation de la concentration en biomasse	46
II.4.2. Détection des pristinamycines par test microbiologique	46
II.4.3. Extraction et dosage des pristinamycines	47
II.4.4. Dosage des acides organiques	48
II.4.5. Dosage des acides aminés	49
II.4.6. Dosage du glucose	50
II.4.7. Dosage de l'ammonium	51
II.4.8. Dosage du phosphate	51
II.5. Mesure de l'activité réductrice globale.....	52
II.6. Mesure du pH intracellulaire.....	53
II.6.1. Préparation des solutions	53
II.6.2. Mesure de l'osmolalité du milieu	54
II.6.3. Préparation des échantillons	54
II.6.4. Le dispositif expérimental	55
II.6.5. Observations microscopiques et prises d'images	56
II.6.6. Transfert des images	57
II.6.7. Traitement des images	57
II.7. Mesure des activités enzymatiques.....	57
II.7.1. Préparation des extraits	57
II.7.2. Principe de mesure des activités enzymatiques	58
II.7.3. Dosage de l'aconitase	59
II.7.4. Dosage de la citrate synthase	59
II.7.5. Dosages de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et de la pyruvate déshydrogénase	60
II.7.6. Dosage de la PEP carboxylase	61
II.7.7. Dosage de la PFK	62
II.7.8. Dosage de l'isocitrate déshydrogénase	62
II.7.9. Dosage de la G6PDH	63
II.7.10. Dosage des protéines	63
II.7.11. Méthode de calcul de l'activité enzymatique spécifique	63

II.1. Souches utilisées

II.1.1. *Streptomyces pristinaespiralis*

La souche étudiée est *Streptomyces pristinaespiralis* Pr11, fournie par la société Aventis. Cette souche Pr11 a été isolée après mutation spontanée de la souche *S. pristinaespiralis* ATCC 25486.

II.1.2. *Listeria ivanovii*

La souche sensible utilisée pour détecter la présence de pristinamycines par dosage microbiologique est *Listeria ivanovii* LMA 94. Cette souche fait partie de la collection de l'équipe Microbiologie Alimentaire du Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaire (ENSAIA. INPL. Nancy).

II.2. Milieux de culture

Les différents milieux utilisés pour la croissance de *S. pristinaespiralis* sont ceux décrits par Corvini (2000).

II.2.1. Milieu de sporulation et de dénombrement des spores de *Streptomyces pristinaespiralis*

extrait de levures	1 g.L ⁻¹
extrait de viande	1 g.L ⁻¹
dextrines blanches	10 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹
agar	25 g.L ⁻¹

Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant la stérilisation par autoclavage, 20 minutes à 120°C. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Petri.

II.2.2. Composition du milieu complexe insoluble de préculture ICS

saccharose	15 g.L ⁻¹
corn steep atomisé	5 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g.L ⁻¹

KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
NaCl	3 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹

Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution de NaOH 30 %, puis le CaCO₃ (1,25 g.L⁻¹) est ajouté.

Le milieu est réparti à raison de 40 mL par fiole d'Erlenmeyer chicanée de 250 mL. La stérilisation se fait par autoclavage, 20 minutes à 120 °C.

Le mode de préparation de ce milieu est détaillé en annexe 1.

II.2.3. Milieu de culture synthétique MPS2

Le milieu MPS2 est utilisé pour la croissance de *S. pristinaespiralis* et la production des pristinamycines. La composition de ce milieu est la suivante :

glucose	30 g.L ⁻¹
acide malonique	7,5 g.L ⁻¹
L-arginine	3 g.L ⁻¹
L-glutamate	1,5 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	15 mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,55 g.L ⁻¹
acide 3-morpholinopropanesulfonique (MOPS)	20 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,75 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40 g.L ⁻¹

Le pH est alors ajusté à 6,8 par ajout d'une solution de NaOH 30 %, et stérilisé par autoclavage 20 minutes à 120°C.

Les solutions de glucose ainsi que les sels K₂HPO₄ et CaCl₂.2H₂O sont préparés séparément.

La préparation complète de ce milieu est détaillée en annexe 2.

I.2.4. Milieux de culture de *Listeria ivanovii*

Le milieu TSB-YE utilisé pour la culture sur milieu liquide de *Listeria ivanovii* est composé

de : bouillon-CASO	30 g.L ⁻¹
extrait de levure	6 g.L ⁻¹

La culture en milieu solide est réalisée sur milieu TSA-YE, il s'agit du milieu TSB-YE auquel 12 g.L⁻¹ d'agar sont ajoutés.

II.3. Conditions de culture

La culture de *S. pristinaespiralis* nécessite plusieurs étapes (fig. 9). Tout d'abord la germination des spores sur milieu complexe ICS, puis la croissance et la production des pristinamycines sur milieu synthétique MPS2. Selon le protocole utilisé, une étape supplémentaire de culture sur MPS2 en fiole d'Erlenmeyer peut être ajoutée.

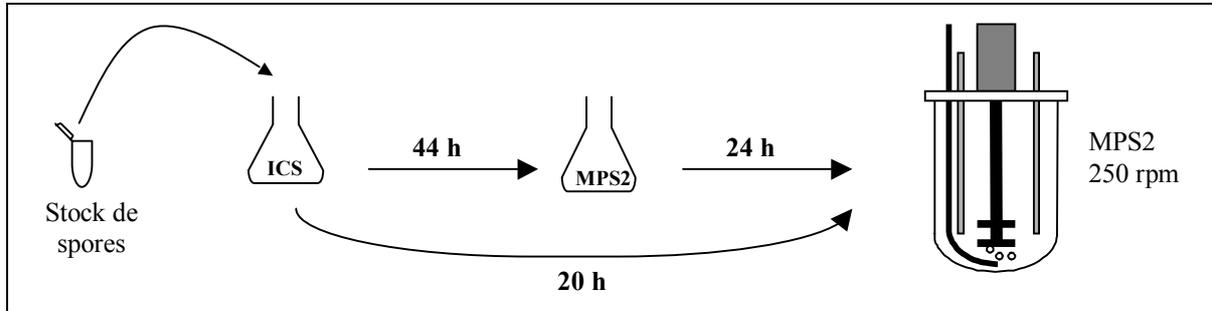


Figure 9 : Mise en culture de *S. pristinaespiralis* Pr11.

II.3.1. Préparation et conservation du stock de spores de *S. pristinaespiralis* pr11

A partir d'un stock de spores conservé à -20°C , des étalements sont réalisés sur des boîtes de Petri contenant le milieu de sporulation et dénombrement. Ces boîtes sont incubées en chambre thermostatée jusqu'à l'apparition d'un tapis de spores grises matures. Généralement, cette étape dure 2 à 3 semaines.

Pour récupérer ces spores, 2 mL d'eau glycérolée à 20 % (v/v) stérile sont ajoutés par boîte et les spores et le mycélium sont décrochés à l'aide d'un fil à boucle. La suspension est collectée puis filtrée stérilement sur du coton cardé qui retiendra le mycélium et ne laissera passer que les spores. La suspension de spores est ensuite répartie en microtubes et conservée à -20°C .

II.3.2. Préculture de *S. pristinaespiralis* sur milieu complexe

Les milieux ICS sont ensemencés à 1,25 % à partir d'un stock de spores de *S. pristinaespiralis* Pr 11, et incubés le temps souhaité, à 28°C , sur table d'agitation à 250 rpm.

II.3.3. Culture de *S. pristinaespiralis* sur milieu synthétique en fiole d'Erlenmeyer

La culture de *S. pristinaespiralis* est conduite dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL chicanées, contenant 80 mL de milieu MPS2. Le milieu est ensemencé avec 4 mL de

préculture puis placé sur table d'agitation à 250 rpm et 28°C durant le temps de culture désiré. Lors de l'étude de l'influence de la vitesse d'agitation en fioles d'Erlenmeyer, les cultures ont été réalisées dans des fioles munies de barreaux aimantés identiques. La vitesse de rotation a été fixée à l'aide d'un stroboscope (Bioblock Scientific Digital Tacho DT 2234).

II.3.4. Culture de *S. pristinaespiralis* en bioréacteur sur milieu synthétique en mode discontinu

La culture est réalisée dans le milieu MPS2 mais sans MOPS. La perte de l'effet tampon, apporté par le MOPS, est compensée par une régulation acido-basique (HCl 3M et NaOH 3M). La culture est réalisée en fermenteur Applikon 7 litres.

Réacteur Applikon :

- cuve 7 L Applikon
- module de contrôle : Bio controller ADI 1030 Applikon
- agitation : Stirrer controller P310 ADI 1032 Applikon
- chauffage : type enveloppe chauffante
- circuit de refroidissement (eau du réseau) commandé par électrovanne
- sonde pH à gel DPAS Mettler Toledo
- sonde de mesure du potentiel rédox : Mettler Toledo
- sonde à O₂ Applikon
- pompes Masterflex pump drive modèle 7016-20 (Cole Parmer)
- débitmètre massique : Bronkhorst Hi-Tech

Paramètres de fermentation :

- température régulée à 28 °C
- pH extracellulaire régulé à 6,8
- aération 1 VVM d'air sous une pression de 0,5 bar.
- consigne de teneur en O₂ dissous : 30 % de la saturation en air du milieu de culture
- maintien de la consigne O₂ : vitesse d'agitation de 300 à 1500 rpm, et augmentation du débit d'aération le cas échéant.

Le réacteur, contenant 5 L de milieu MPS2 et 1 mL de polypropylène glycol 2000, est ensemencé après complémentation minérale (K₂HPO₄ et CaCl₂), à 5% de préculture.

Différents types de prélèvements du milieu sont réalisés au cours de la culture. Le moût constitué du milieu avec les cellules est utilisé pour le dosage de la biomasse, des pristinamycines, de l'activité réductrice globale ainsi que pour la mesure des activités enzymatiques. Une partie du moût prélevé est filtrée sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm, le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour le dosage des concentrations en glucose, acides aminés, acides organiques, phosphate, ammonium et pour la détection microbiologique des pristinamycines.

II.4. Estimation de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires

II.4.1. Estimation de la concentration en biomasse

L'estimation de la concentration en biomasse se fait par une méthode spectrophotométrique (Lubbe *et al.*, 1985). La concentration cellulaire est estimée par mesure de l'absorbance (Abs) à 660 nm. après traitement des échantillons comme suit :

Les prélèvements sont dilués au dixième de façon à mesurer une absorbance inférieure à 1, de la façon suivante : 1 mL de moût est ajouté à 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 40 W pendant 40 s. Ce traitement peut être répété une seconde fois si les pelotes n'ont pas été suffisamment désagrégées. Toutefois, un traitement trop long de l'échantillon peut être néfaste et entraîner une lyse cellulaire. 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.

La quantité de poids sec est déterminée à partir de la formule de corrélation absorbance/poids sec (Corvini, 2000) :

$$MS = (Abs + 0,28204)/1,7695$$

Une vérification de cette corrélation a été réalisée au cours d'une culture en réacteur en mode discontinu pendant la phase de croissance. L'écart entre la biomasse estimée et la biomasse pesée après déshydratation complète est de 3 %.

II.4.2. Détection des pristinamycines par test microbiologique

Le test microbiologique est une méthode qualitative permettant de mettre en évidence la présence de l'antibiotique dans l'échantillon. Pour cela, la souche *Listeria ivanovii*,

naturellement sensible aux pristinamycines, est utilisée. Après croissance de cette souche sur milieu TSB-YE, 100 mL de milieu TSA-YE sontensemencés avec 1 mL de la culture de *L. ivanovii* et répartis en boîte de Petri à raison de 12 mL de milieu par boîte. Après solidification du milieu à 4°C, des puits sont réalisés dans la gélose à l'aide de cloches de Durham stériles. Le surnageant de la culture à tester est filtré sur filtres Millex® de porosité 0,22 µm et 20 µl sont déposés dans chaque puits. Les boîtes sont tout d'abord placées 2 h à 4°C afin de permettre la diffusion du dépôt dans la gélose, puis incubées à 30°C et lues au bout de 24 h. La présence d'antibiotiques dans l'échantillon testé est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition de croissance de la souche cible autour du puits où l'échantillon a été déposé.

II.4.3. Extraction et dosage des pristinamycines

L'extraction et le dosage des pristinamycines sont réalisés selon un protocole précédemment décrit (Paquet *et al.*, 1992).

- **Extraction**

Pour l'extraction des pristinamycines, 1 volume de moût est ajouté à 2 volumes de phase mobile (34 % (v/v) acétonitrile et 66 % (v/v) tampon phosphate 0,1 M pH 2,9). Ce mélange est agité pendant 20 min sur une table d'agitation à 250 rpm, puis centrifugé 10 min à 15000 rpm. Le surnageant est filtré sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm pour le dosage par CLHP.

- **Dosage par CLHP des pristinamycines**

Chaîne CLHP SHIMADZU

- spectrophotomètre à barrette de diodes SPD-M10Avp (Shimadzu)
- logiciel (PC) d'exploitation Class-VP (Shimadzu)
- colonne 5C8 Nucléosil 4,6*150 mm (Interchim)

Conditions expérimentales

La phase mobile utilisée pour l'extraction est dégazée à l'hélium en ligne. Le débit d'élution est de 0,8 mL.min⁻¹. Le dosage est effectué à température ambiante, le volume injecté est de 20 µL et la détection est réalisée à 206 nm (pristinamycines II) et 193 nm (pristinamycines I).

Des solutions mères de pristinamycines I_A (100 mg.L⁻¹) et pristinamycines II_A (200 mg.L⁻¹) sont utilisées pour réaliser les gammes étalons.

II.4.4. Dosage des acides organiques

- **Préparation des échantillons**

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm.

- **Dosage par CLHP des acides organiques**

La méthode de détection des acides organiques est celle précédemment décrite par Rondags *et al.* (1998).

Chaîne CLHP SHIMADZU

- spectrophotomètre à barrette de diodes SPD-M10Avp (Shimadzu)
- logiciel (PC) d'exploitation Class-VP Shimadzu
- colonne polypore H (Brownlee Labs)

Conditions expérimentales

- phase mobile : H₂SO₄ 5 mM.
- débit d'élution de 0,8 mL.min⁻¹.
- température de la colonne 65°C.
- injection de 20 µL.
- détection à 210 nm pour les acides organiques.

Des solutions standards sont préparées et conservées à -20°C pour les acides organiques dosés (acétate, pyruvate et succinate). Les solutions de lactate et d' α-cétoglutarate sont préparées extemporanément.

II.4.5. Dosage des acides aminés

- **Préparation des échantillons**

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm. Des dilutions sont réalisées de façon à se trouver dans la gamme de détection (< 2 mM).

- **Dosage par CLHP des acides aminés**

Les acides aminés sont dosés après dérivatisation en présence d'ortho-phthaldialdéhyde (OPA). Les acides aminés primaires sont placés en présence d'OPA et d'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) pour donner des dérivés iso-indoles hautement fluorescents et absorbant dans le domaine UV (Godel *et al.*, 1992).

Réactifs et phases mobiles :

La solution d'OPA est préparée en ajoutant 10 mg d'OPA et 8 µL de 3-MPA à 1 mL de tampon borate 0,4 N pH 10.

La phase A est composée de 20 mM d'acétate de sodium tri-hydraté, de 0,024 % (v/v) de triéthylamine, et de 0,5 % (v/v) de tétrahydrofurane. Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'acide acétique dilué (1-2 % maximum).

La phase B est composée de 100 mM d'acétate de sodium tri-hydraté, 40 % (v/v) d'acétonitrile et 40 % (v/v) de méthanol. Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'acide acétique dilué comme précédemment.

Les solutions A et B sont filtrées sur un filtre de porosité 0,22 µm Durapore (Millipore®).

Les échantillons sont dérivatisés automatiquement à l'aide d'un système HP 1090 Liquid Chromatograph (Hewlett Packard) et injectés au niveau de la colonne de séparation (Hypersil, Interchim Ref : H5C18#20R). Le solvant d'élution est composé de 100 % de solution A au départ, puis un gradient de concentration est réalisé : en 17 minutes l'éluant passe à une composition de 40 % de solution A et 60 % de solution B, puis en 7 minutes le solvant d'élution n'est plus composé que de 100 % de solution B. Les acides aminés sont séparés selon

leur polarité, du plus polaire au moins polaire. Les acides aminés primaires sont détectés en sortie de colonne par un détecteur UV à 338 nm.

Avant l'analyse des échantillons de culture, trois standards de concentrations 0,5 mM, 1,0 mM et 2,0 mM des acides aminés recherchés sont passés de façon à établir une gamme étalon après intégration des pics (Système Hewlett-Packard).

II.4.6. Dosage du glucose

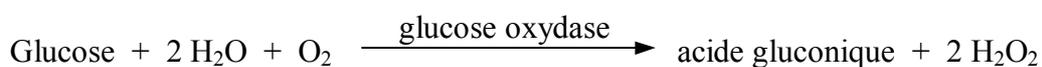
Le glucose est dosé selon la méthode précédemment employée par Uy (2003).

- **Préparation des échantillons**

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm.

- **Dosage du glucose par kit enzymatique**

Le glucose est dosé à l'aide d'un kit enzymatique Sigma (réf. 510). Le procédé de dosage est basé sur le couplage des réactions enzymatiques suivantes :



L'intensité de la couleur marron est mesurée à 450 nm, elle est proportionnelle à la concentration en glucose. Une gamme étalon est réalisée de 0 à 0,4 g.L⁻¹ de glucose. Le dosage est réalisé dans des plaques de 96 puits. Dans chaque puits 20 µL de la solution à doser sont déposés, auxquels sont ajoutés 200 µL de solution réactionnelle. La plaque est incubée 30 min. à 37°C. puis lue à l'aide d'un Multiskan MCC/340 Titertek.

II.4.7. Dosage de l'ammonium

- **Préparation des échantillons**

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm.

- **Dosage de l'ammonium**

Le dosage de l'ammonium se fait au moyen d'une électrode à diffusion gazeuse. Une gamme étalon de 10^{-4} à 10^{-1} mol.L⁻¹ de NH₃ est réalisée. 10 mL de la solution à doser sont placés dans un récipient maintenu à 37°C avec agitation, auxquels 100 µL de NaOH 10 M sont ajoutés. Après équilibre, la valeur affichée qui correspond au potentiel d'électrode est proportionnelle à la concentration en ammonium. Afin que la courbe étalon soit linéaire elle doit être tracée en échelle semi-logarithmique.

II.4.8. Dosage du phosphate

- **Préparation des échantillons**

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® de porosité 0,22 µm.

- **Dosage du phosphate**

En milieu acide et réducteur, les phosphates forment avec l'acide molybdique un complexe phosphomolybdique-molybdeux coloré en bleu.

Une gamme étalon est réalisée avec du Na₂HPO₄ (1 mM). Le mélange réactionnel est composé d'acide ascorbique 10 % (1/6 v/v) et d'une solution de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (molybdate d'ammonium tétrahydrate) à 0,42 % dans H₂SO₄ 1N (5/6, v/v). 50 µL de l'échantillon à doser sont ajoutés à 250 µL d'HCl 0,5 N. 700 µL du mélange réactionnel sont ensuite ajoutés et le tout est incubé 20 min à 45°C.

L'absorbance des échantillons est mesurée à 820 nm.

II.5. Mesure de l'activité réductrice globale

La quantification de l'activité reductrice globale se fait par un dosage à l'INT [2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride]. L'INT est transformé par réduction en cristaux rouges, le formazan. La détection se fait par lecture de l'absorbance à 490 nm, (Mauss *et al.*, 1997 ; Pons *et al.*, 1998).

Les différentes solutions utilisées sont les suivantes :

A : tampon phosphate 0,05 M, pH 7

B : glucose à 5 g.L⁻¹

C : INT à 0,2 % (w/v)

D : formaldéhyde 35 % (v/v)

La mesure est réalisée à partir de 3 dosages différents (tableau.2).

Tableau 2 : réalisation des différents dosages pour la mesure de l'activité réductrice globale

Solutions	Blanc	Référence	Essai
A : (μL)	1275	1275	1275
B : (μL)	100	100	100
C : (μL)	125	125	125
D : (μL)	400	400	0
Surnageant de culture (μL)	100	0	0
Moût à 1 g.L ⁻¹ de biomasse (μL)	0	100	100
Incubation 15 min à 37°C			
D : (μL)	0	0	400

Une fois la solution D ajoutée, les échantillons sont soniqués 30 secondes à 20 kHz puis les absorbances à 490 nm de la référence et de l'essai sont mesurées par rapport au blanc. Le blanc sert à régler le zéro. La mesure appelée référence donne l'absorption due aux cellules et l'essai donne l'absorption dues aux cellules et à la coloration du dosage. Pour chaque prélèvement, le rapport [essai/référence] est calculé et exprimé en unités arbitraires (UA).

II.6. Mesure du pH intracellulaire

Au cours des cultures en bioréacteur en mode discontinu, le pH intracellulaire de *Streptomyces pristinaespiralis* est mesuré par microscopie à épifluorescence couplée à une analyse d'image (Corvini *et al.*, 2000).

II.6.1. Préparation des solutions

- **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 ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,2 g.L ⁻¹
NaCl :	8 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O :	2,16 g.L ⁻¹
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 (cf chap.II.6.2.). La quantité de xylose nécessaire pour fixer l'osmolalité à celle régnant dans le milieu à ce stade de développement de la culture est ajoutée.

- **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 fractions aliquotes de 10 µL dans des microtubes (Eppendorf) qui sont stockés à -20 °C.

- **Préparation des tampons phosphate à haute concentration en potassium pour le calibrage in vivo du pHi :**

Solution A :	Solution B :
KH ₂ PO ₄ : 18,37 g.L ⁻¹	K ₂ HPO ₄ : 19,16 g.L ⁻¹
NaCl : 1,17 g.L ⁻¹	NaCl : 1,17 g.L ⁻¹

Les solutions tampon de pH désiré sont confectionnées 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 mesurée pour chaque tampon et ajustée à celle régnant dans le milieu de culture au moment du prélèvement par addition de xylose.

- **Préparation des ionophores pour le calibrage in vivo :**

La calibration du pH intracellulaire est réalisée à l'aide de nigéricine et valinomycine, deux ionophores permettant d'équilibrer le pH extracellulaire et intracellulaire.

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

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

Ces deux solutions constituent des solutions mères dix fois plus concentrées que celles utilisées lors du traitement des échantillons. Les dilutions de ces ionophores sont préparées extemporanément.

II.6.2. Mesure de l'osmolalité du milieu

Cette mesure est réalisée dans le cadre de la mesure du pH intracellulaire, afin d'ajuster l'osmolalité du tampon PBS et des tampons phosphate à haute teneur en potassium à celle du milieu au moment du prélèvement.

L'osmolalité du milieu de culture est mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre Roebling. L'appareil est étalonné avant chaque utilisation avec de l'eau (0 mOsm.kg⁻¹) et du milieu commercial de culture de cellules animales α -MEM complété avec 5 % SVF dont l'osmolalité est de 300 mOsm.kg⁻¹.

II.6.3. Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués dans du PBS afin d'obtenir une absorbance à 660 nm égale à 1.

A 490 μ L de cette dilution sont alors ajoutés 10 μ L de BCECF-AM (de concentration finale 20 μ M). L'ensemble est alors incubé 30 min. à 28°C et à l'obscurité. L'échantillon est ensuite centrifugé 30 s à 15000 rpm, puis suspendu dans du PBS et stocké à 4°C.

- **Calibration *in vivo***

Les échantillons précédemment préparés sont centrifugés 30 s à 15000 rpm puis suspendus dans 485 μL de tampon phosphate à haute concentration en K^+ , de pH déterminé, et 10 μL de nigéricine ($C_f = 20 \mu\text{M}$) et 5 μL de valinomycine ($C_f = 1 \mu\text{M}$) sont ajoutés. Le mélange est incubé 10 min. à 28°C sur table d'agitation à 250 rpm et à l'obscurité puis centrifugé 30 s à 15000 rpm et à nouveau suspendu dans 500 μL du même tampon. La préparation est conservée à 4°C jusqu'à l'observation et la prise d'image.

II.6.4. Le dispositif expérimental (fig. 10)

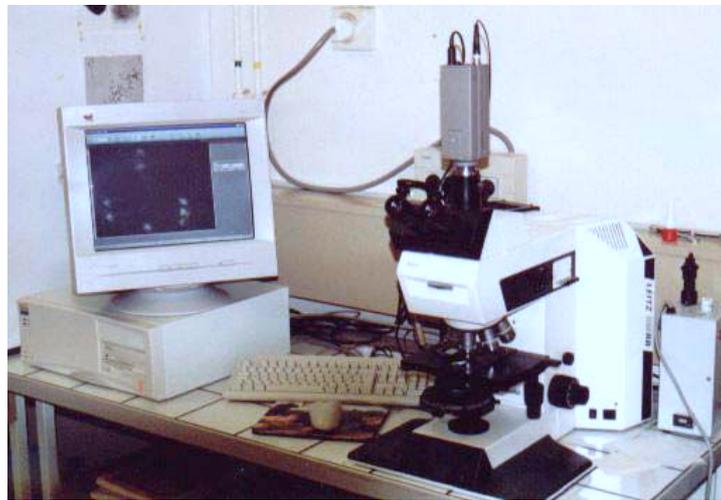


Figure 10: Photographie du dispositif de prise d'images (microscope, caméra et PC).

- **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.

- **Système d'acquisition d'images**

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.

Cartes d'acquisition des images

La numérisation des images se fait grâce à une carte 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.

Les images sont enregistrées dans le format TIFF sur le disque dur de l'ordinateur. Ce dernier est connecté sur réseau Ethernet, ce qui permet le transfert rapide des images vers les stations de calcul.

II.6.5. Observations microscopiques et prises d'images

Une fois les cellules traitées au BCECF-AM suivant le protocole de coloration, 20 μ L de la préparation sont déposés délicatement au fil à boucle sur une lame de verre préalablement dégraissée.

La prise d'image repose sur le principe du «rapport de double émission». La source lumineuse est une lampe à mercure de 50 W (Osram).

La longueur d'onde d'excitation est de 480 nm, cependant les deux filtres d'émission sont différents : le premier émet à 527 nm et le second à 600 nm.

Une première photographie est réalisée à 527 nm (vert) puis après changement du filtre, une seconde photographie du même champ est réalisée à 600 nm (rouge). Ces deux images

constituent un couple. La lame est ensuite déplacée et d'autres couples d'image sont ainsi enregistrés.

II.6.6. 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 des Sciences du Génie Chimique (LSGC) par une équipe localisée à l'ENSIC (INPL). Les images au format TIFF sont transférées *via* le réseau local Ethernet. 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.6.7. Traitement des 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.

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.7. Mesure des activités enzymatiques

II.7.1. Préparation des extraits

Les extraits pour le dosage des activités enzymatiques sont préparés de la façon précédemment décrite par Corvini (2000).

Un volume de cellules en rapport avec la quantité de biomasse (75 à 200 mL, en fonction de l'absorbance) est prélevé aux temps voulus puis centrifugé à 12000 rpm 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

12000 tpm pendant 10 min. Les bactéries sont suspendues dans 12 mL de tampon tris-HCl 40 mM à pH 7,4 glycérolée 20%, puis lysées aux ultrasons : 40 W sur la glace. L'opération est effectuée 4 fois pendant 75 s avec un arrêt de 15 s entre chaque cycle. Le lysat est ensuite centrifugé dans des microtubes à 13000 rpm pendant 20 min. à 4 °C puis les surnageants sont réunis et conservés dans de la glace pour les essais enzymatiques immédiats, ou répartis en fractions aliquotes et conservés à -80°C.

II.7.2. Principe de mesure des activités enzymatiques

La mesure des activités enzymatiques se fait soit par mesure directe, en mesurant l'apparition ou de la disparition de l'un des produits ou substrats de la réaction, soit en réalisant un couplage enzymatique de la réaction à suivre avec une autre activité enzymatique.

Afin de ne mesurer que l'activité due à l'enzyme que l'on souhaite étudier, dans un premier temps, tous les éléments du dosage à l'exception du facteur déclenchant la réaction sont ajoutés et l'absorbance est suivie. La pente obtenue est représentative de l'activité parasite. Le substrat permettant de déclencher la réaction enzymatique est ensuite ajouté. La pente d'absorption alors obtenue représente la somme de l'activité parasite précédemment observée et de l'activité due à l'enzyme (fig. 11).

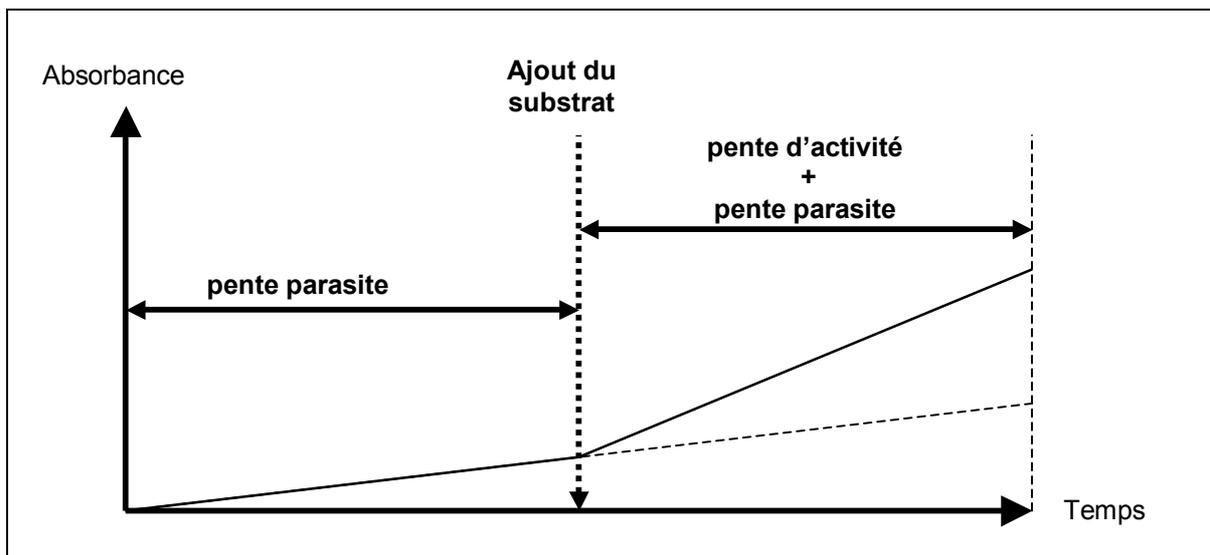


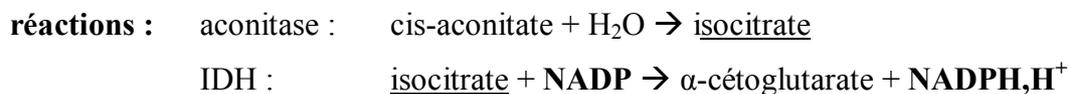
Figure 11 : suivi de l'apparition d'un produit au cours du dosage d'une activité enzymatique.

Tous les dosages, excepté celui de la citrate synthase, sont effectués avec un spectrophotomètre UV-visible Beckman DU 7500 en condition tempérées à 30°C, sous

agitation avec des cuvettes en quartz de marque Hellmā de trajet optique 1 cm et de volume 1 mL contenant un petit barreau aimanté. Le dosage de la citrate synthase est effectué dans les mêmes conditions mais avec des cuvettes en plastique de trajet optique 1 cm et de volume 3 mL contenant un petit barreau aimanté.

II.7.3. Dosage de l'aconitase

L'aconitase est dosée par couplage enzymatique avec l'isocitrate déshydrogénase (IDH) (Delaunay, communication personnelle). Le cis-aconitate est transformé en isocitrate par l'aconitase. L'isocitrate est ensuite transformé en présence de NADP en α -cétoglutarate. Le suivi de l'apparition du NADPH permet de mesurer l'activité de l'aconitase.



L'isocitrate déshydrogénase se trouve en excès dans le milieu réactionnel, de cette façon c'est l'activité de l'aconitase qui est limitante et qui détermine la vitesse d'apparition du NADPH. On mesure l'apparition du NADPH à 340 nm. ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le dosage de l'aconitase est réalisé au spectrophotomètre dans une cuve en quartz munie d'un agitateur. Le mélange réactionnel est le suivant : tampon tris-tricarballylique (TTC) 15 mM pH 7,8 qsp 1 mL, NaCl 0,125 M, isocitrate déshydrogénase 10 UE.mL⁻¹, extrait, NADP 0,2 mM. Le zéro est réalisé puis l'absorbance à 340 nm est suivie pendant 5 min (pente parasite). Ensuite le substrat, cis-aconitate à 2 mM final, est ajouté et l'absorbance est encore suivie pendant 5 min. Cette seconde pente correspond à la somme de la pente parasite et de la pente due à l'activité enzymatique.

Les solutions de cis-aconitate et de NADP sont préparées extemporanément.

II.7.4. Dosage de la citrate synthase

Ce dosage est réalisé selon la méthode décrite par Srere (1969).



Le dosage est basé sur le couplage chimique du CoASH (libéré à partir de l'acétyl-CoA durant la synthèse enzymatique du citrate) avec le réactif d'Ellman's, le DTNB (5,5'-

dithiobis-(2 acide nitrobenzoïque)). L'apparition de l'ion mercaptide est suivie à 412 nm ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (fig. 12).

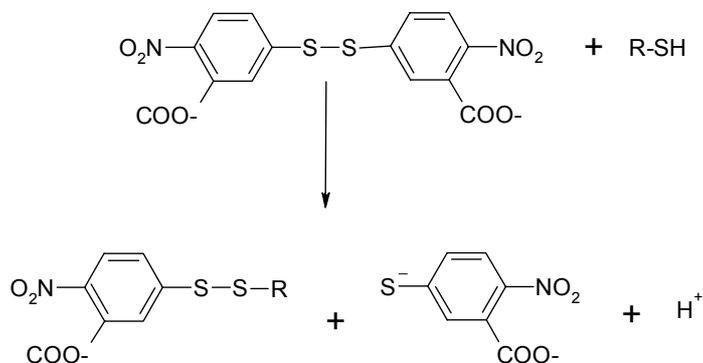


Figure 12 : Formation de l'ion mercaptide à partir du DTNB.

Le dosage de la citrate synthase est réalisé dans une cuve en plastique de 3,5 mL munie d'un agitateur. Le mélange réactionnel est le suivant : tampon TTC 15 mM pH 7,8 qsp 2 mL, DTNB 0,1 mM, acétyl CoA 0,4 mM, extrait. Le zéro est réalisé, puis l'absorbance à 412 nm est suivie pendant 5 min (pente parasite). Ensuite le substrat, oxalo-acétate à 1 mM final, est ajouté et l'absorbance est encore suivie pendant 5 min.

Les solutions de DTNB, oxaloacétate et acétyl-CoA sont préparées extemporanément.

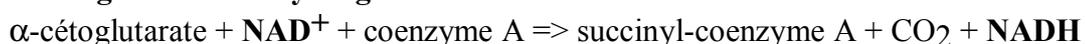
II.7.5. Dosages de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et de la pyruvate déshydrogénase

Ce dosage est réalisé selon la méthode décrite par Visser *et al.* (1982).

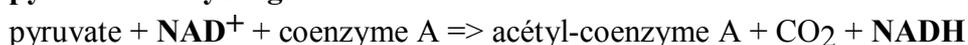
Ces deux enzymes sont dosées selon la même méthode. L'unique différence est le substrat de l'enzyme : α -cétoglutarate dans le cas de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et pyruvate dans le cas de la pyruvate déshydrogénase.

Réactions :

α -cétoglutarate déshydrogénase :



pyruvate déshydrogénase :



Avant la réalisation de ces dosages, un mélange réactionnel appelé "solution stock" est préparé. Celle-ci est composée de 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 μ L), tampon phosphate 1 M pH 7,0 (2,4 mL) et le volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée.

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

Le dosage est réalisé à 30°C en additionnant 250 μ L de solution stock et 250 μ L d' α -céto-glutarate de sodium ou de pyruvate de sodium à 20 mM. Après une incubation 5 min à 30 °C sous agitation, 500 μ L d'extrait acellulaire et de tampon d'extraction sont ajoutés (la réaction est déclenchée par apport de l'extrait acellulaire) et le suivi de la variation de l'absorbance à 366 nm est réalisé.

Etant donnée une relativement forte activité NADH oxydase, la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (APAD⁺) a été préférée au NAD⁺ car sa forme réduite n'est pas utilisée comme substrat par les NADH oxydases. Le coefficient d'extinction pour les calculs a été considéré comme identique à celui du NADH (Visser *et al.*, 1982).

II.7.6. Dosage de la PEP carboxylase

Ce dosage est réalisé selon la méthode précédemment décrite par Corvini (2000). La PEP_C est dosée par couplage enzymatique avec la malate déshydrogénase (MDH).

Réactions : PEP_C : phospho-énol-pyruvate + CO₂ => oxaloacétate + Pi
 MDH : oxaloacétate + **NADH** => malate + **NAD**

Le dosage de la PEP_C est effectué en additionnant 250 μ L de tampon tris-HCl (400 mM, pH 7,8), 100 μ L de MnSO₄ (50 mM), 100 μ L de K₂CO₃ (100 mM), 50 μ L de MDH (1 U/ μ l), 50 μ L d'acétyl-coenzymeA (2 mM) et 300 μ L d'extrait acellulaire. La lecture du blanc est alors effectuée à 340 nm., puis 50 μ L de NADH (3 mM) sont ajoutés et le suivi de l'absorbance est déclenché. Lorsque la pente de variation de l'absorbance est stable (pente parasite), 50 μ L de PEP (20 mM) sont alors ajoutés et la variation de l'absorbance est suivie.

II.7.7. Dosage de la PFK

Cette mesure est effectuée selon le protocole précédemment décrit par Ling *et al.* (1966), et repose sur le couplage de la PFK avec 3 autres activités enzymatiques.

Réactions :

PFK : fructose-6-phosphate + ATP => fructose-1,6-diphosphate + ADP

aldolase : fructose-1,6-diphosphate => DHAP + GA3P

triose phosphate isomérase GA3P <=> DHAP

G3PDH : 2 DHAP + 2 NADH => 2 acide L- α - glycérophosphorique + 2 NAD⁺

DHAP : dihydroxyacétone phosphate

GA3P : glyceraldéhyde 3 phosphate

G3PDH : glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase

Dans un premier temps, une solution enzymatique auxiliaire est préparée. Cette solution contient 10 mg de BSA, 250 μ L d'aldolase à 10 mg.mL⁻¹, 250 μ L d' α -glycérophosphate déshydrogénase à 2 mg.mL⁻¹ et du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0 qsp 5 mL.

Le mélange réactionnel est effectué en additionnant : 167 μ L de tampon tris-HCl 200 mM pH 8,0, 100 μ L d'ATP 20 mM, 25 μ L de MgSO₄ 200 mM, 250 μ L de KCl 200 mM, 100 μ L de DTT 100 mM, 67 μ L de solution enzymatique auxiliaire et 225 μ L d'extrait acellulaire. La lecture du blanc à 340 nm est effectuée avant l'ajout de 67 μ L de NADH 2,5 mM et l'absorbance à 340 nm est alors suivie (pente parasite). La réaction enzymatique est alors déclenchée par l'ajout de 67 μ L de fructose-6-phosphate lorsque la pente de variation de l'absorbance est stable.

II.7.8. Dosage de l'isocitrate déshydrogénase

Ce dosage est réalisé selon le protocole précédemment décrit par Hostalek *et al.* (1969).

Réaction : isocitrate + NADP⁺ => α -céto-glutarate + NADPH + CO₂

Le mélange réactionnel est constitué de 100 μ L de MgCl₂ 30 mM et 700 μ L d'extrait acellulaire et de tampon d'extraction. La lecture du blanc à 340 nm est réalisée avant l'ajout

de 100 μL de NADP^+ 1,7 mM. La variation de l'absorbance à 340 nm est alors suivie avant d'ajouter le substrat : 100 μL d'isocitrate 50 mM, lorsque la pente de variation de l'absorbance est stable.

II.7.9. Dosage de la G6PDH

Ce dosage est réalisé selon le protocole précédemment décrit par Neuzil *et al.* (1986).

Réaction : glucose-6-phosphate + NADP^+ \Rightarrow 6-phosphogluconate + **NADPH**

Le mélange réactionnel est composé de tris-HCl 40 mM pH 7,4 qsp 1 mL, 100 μL de MgSO_4 100 mM et l'extrait acellulaire. Une fois la lecture du blanc à 340 nm effectuée, 100 μL de NADP^+ 10 mM sont ajoutés puis l'activité parasite est suivie à 340 nm. La réaction est déclenchée par l'ajout de 100 μL de glucose-6-phosphate 50 mM.

II.7.10. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (kit Biorad) (Bradford, 1976). Le bleu de coomassie présent dans le réactif de Bradford réagit avec les protéines en solution en formant un complexe protéique de couleur bleue qui absorbe la lumière visible à 595 nm.

Le réactif de Bradford est dilué dans 4 fois son volume d'eau distillée, puis filtré en cas de présence de précipité. Une gamme est réalisée à partir de concentrations croissantes (de 0 à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de sérum albumine bovine (BSA). Des dilutions de l'échantillon à doser sont réalisées afin de rester dans la zone de concentration de la gamme. 20 μL de chaque échantillon à doser (incluant les extraits, la gamme étalon et le blanc) sont distribués dans des cuves pour spectrophotomètre de 1,5 mL auxquelles 1 mL de réactif dilué est rajouté. Après homogénéisation et 30 min de temps de réaction à l'obscurité, l'absorbance des échantillons est lue à 595 nm. La teneur en protéine des échantillons à tester est obtenue à partir de la courbe étalon.

II.7.11. Méthode de calcul de l'activité enzymatique spécifique

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques (UE) sachant que 1 UE 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 (AS) est donnée par la formule suivante :

$$AS = \frac{\left(\frac{\Delta DO}{\epsilon * l} * V_c * 10^6 \right)}{V_e * C_p}$$

- avec :
- 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 dans la cuve (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 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$.
 - V_c est le volume réactionnel dans la cuve en μL
 - V_e est le volume de prise d'essai de l'extrait enzymatique en μL
 - C_p est la teneur protéique de l'échantillon en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.
 - 10^6 est le facteur de conversion en μmole .

III.1. Culture de référence pour la production des pristinamycines en mode discontinu	66
III.1.1. Mesures macrocinétiques	66
III.1.2. Bilans de matière globaux sur cette fermentation	68
III.1.3. Caractérisation physiologique de <i>S. pristinaespiralis</i> au cours du procédé discontinu de production des pristinamycines	71
III.2. Résultats complémentaires concernant les mesures d'activités enzymatiques lors du procédé de production des pristinamycines.....	76
III.2.1. Effet du pH sur les activités enzymatiques	76
III.2.2. Vers une estimation des activités spécifiques in vivo	77
III.2.3. Discussion	81
III.3. Recherche de la validation des résultats antérieurs avec un réacteur de géométrie différente.....	83
III.3.1. Culture de <i>S. pristinaespiralis</i> en réacteur de géométrie différente en mode discontinu	83
III.3.2. Influence de la vitesse d'agitation sur la concentration en biomasse lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer	85
III.3.3. Effet de la vitesse d'agitation sur la biomasse lors de cultures en réacteur en mode discontinu	88
III.3.4. Conclusion	90
III.4. Etudes physiologiques sur une culture non productrice de pristinamycines menée en réacteur en mode discontinu avec une agitation de départ de 700 rpm.....	91
III.4.1. Etudes macrocinétiques de <i>S. pristinaespiralis</i> au cours d'une culture en réacteur en mode discontinu	92
III.4.2. Quantification des activités enzymatiques au cours des cultures de <i>S. pristinaespiralis</i> en réacteur en mode discontinu	98

III.1. Culture de référence pour la production des pristinamycines en mode discontinu

III.1.1. Mesures macrocinétiques

Lors des précédents travaux sur *S. pristinaespiralis* menés au laboratoire, les cultures en réacteur en mode discontinu ont été réalisées dans un réacteur Chemap de 2,5 L à double enveloppe contenant 2 L de milieu MPS2, avec une aération de 2 VVM d'air sous une pression de 1 bar ; la teneur en O₂ dissous du milieu de culture (fixée à 30 % de la saturation en air) était régulée par l'augmentation de la vitesse d'agitation (de 300 rpm à 1500 rpm) puis par l'augmentation du débit gazeux (Corvini, 2000). Des résultats représentatifs de ces cultures sont présentés ci-dessous.

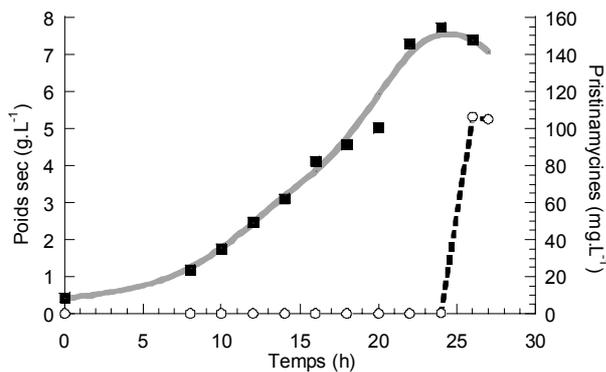


Figure 13 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en pristinamycines (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*.

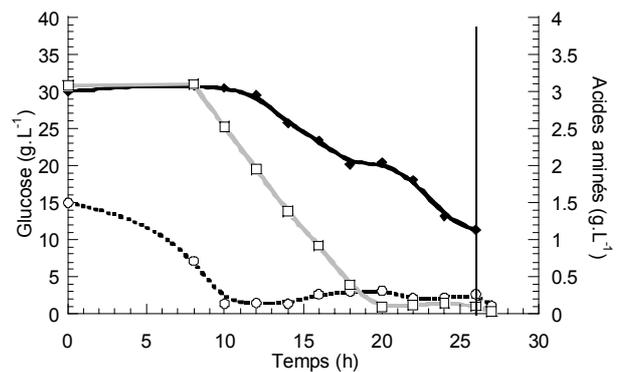


Figure 14 : Evolution des concentrations en glucose (◆), arginine (□) et glutamate (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. Le trait vertical indique le moment où les pristinamycines commencent à s'accumuler dans le milieu de culture.

Lors de ces cultures, la production des pristinamycines intervient systématiquement au cours de la phase stationnaire de croissance (fig.13).

La consommation des substrats se fait de façon séquentielle : tout d'abord consommation du glutamate qui va servir de source de carbone, d'azote et d'énergie, puis utilisation concomitante du glucose et de l'arginine (fig.14). Le glucose serait employé comme source de carbone et d'énergie et l'arginine pour sa part servirait de source d'azote uniquement. La production des pristinamycines intervient après épuisement de la source d'azote (arginine) (fig.14).

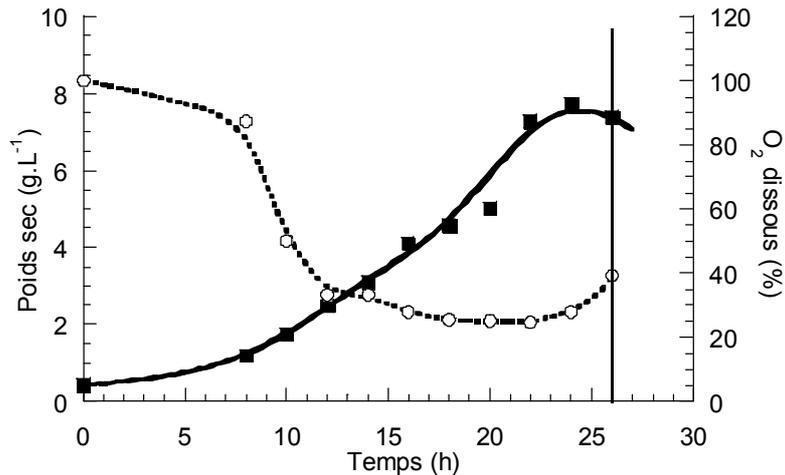


Figure 15 : Evolution des concentrations en biomasse (■) et en oxygène dissous (○) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. Le trait vertical indique le moment où les pristinamycines commencent à s'accumuler dans le milieu de culture.

La teneur en oxygène dissous diminue rapidement au début de la fermentation mais ne descend jamais en dessous de la valeur du point de consigne, l'augmentation de l'agitation permettant de réguler cette valeur en la maintenant au-dessus de 30 %. A aucun moment la vitesse d'agitation ni le débit d'air n'ont dû être augmentés.

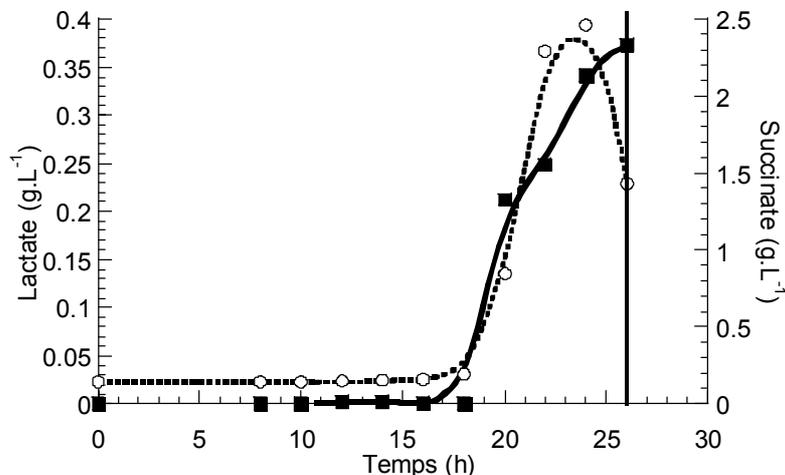


Figure 16 : Evolution des concentrations en succinate (○) et lactate (■) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. Le trait vertical indique le moment où les pristinamycines commencent à s'accumuler dans le milieu de culture.

Une excrétion massive de lactate (0,4 g.L⁻¹) et de succinate (2,5 g.L⁻¹) est observée peu de temps avant la production des antibiotiques (fig.14). D'autres acides organiques ont été détectés en quantités très faibles dans le milieu de culture : du malate à 17 mg.L⁻¹ maximum, de l'acétate (90 mg.L⁻¹), provenant certainement de l'inoculum et consommé durant les dix premières heures de la culture et enfin, de l' α -cétoglutarate (de l'ordre de 85 mg.L⁻¹

maximum) et dont la concentration maximale se situe entre 10 et 14 h de culture pour ensuite diminuer lentement au cours du temps, suite à une dégradation ou à une ré-assimilation.

III.1.2. Bilans de matière globaux sur cette fermentation

Des bilans de matières globaux sur le carbone et l'azote peuvent être réalisés sur cette fermentation (tableaux 3, 4 et 5). Ceux-ci n'avaient pas été calculés lors du travail de Corvini (2000). Pour la réalisation de ces bilans, le glutamate et l'arginine sont considérés comme source de carbone et d'azote.

La formule utilisée pour la biomasse est celle employée par Roubos *et al.* (2001) pour *S. clavuligerus* (MM = 28,5 g.mol⁻¹). Concernant les pristinamycines, les proportions massiques des différentes molécules habituellement excrétées à savoir PII_A (60%) PII_B (10%) (MM moyenne : 525 g.mol⁻¹), PI_A (22%) et PI_B (8%) (MM moyenne : 850 g.mol⁻¹) sont employées, en négligeant les formes minoritaires (Corvini, 2000).

Nous avons donc procédé à l'établissement des bilans carbonés et azotés au cours des différentes phases de consommation des substrats : de 0 à 10 h lors de la consommation du glutamate, de 10 à 24 h lors de la consommation de l'arginine et du glucose et alors que la biomasse atteint son titre maximal, et de 24 à 26 h lors de la production des pristinamycines.

Tableau 3 : Bilans carboné et azoté globaux entre 0 et 10 h, lors de la consommation du glutamate.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formule	Carbone mmol.L ⁻¹	Bilan C %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	0	0	C ₆ H ₁₂ O ₆	0		0	
	arginine	0,56	3,2	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	20		13	
	glutamate	1,36	9,3	C ₅ H ₈ NO ₄	46		9	
	Total				66	100	22	100
produits	biomasse	1,34	47	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	47	72	10	
	Total				47	72	10	45

Tableau 4 : Bilans carboné et azoté globaux entre 10 et 24 h, lors de la consommation du glucose et de l'arginine.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formule	Carbone mmol.L ⁻¹	Bilan C %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	16,8	93	C ₆ H ₁₂ O ₆	560		0	
	arginine	2,37	13,6	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	82		54	
	glutamate	0	0	C ₅ H ₈ NO ₄	0		0	
	Total				642	100	54	100
produits	biomasse	5,93	208	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	208	32	44	
	lactate	0,342	3,8	C ₃ H ₆ O ₃	11	2	0	
	succinate	2,32	19,6	C ₄ H ₆ O ₄	79	12	0	
	Total				298	46	44	80

Tableau 5 : Bilans carboné et azoté globaux entre 24 et 26 h, lors de la production des pristinamycines.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formule	Carbone mmol.L ⁻¹	Bilan C %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	1,8	10	C ₆ H ₁₂ O ₆	60		0	
	arginine	0,05	0,3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	2		12	
	glutamate	0	0	C ₅ H ₈ NO ₄	0		0	
	succinate	1,026	8,7	C ₄ H ₆ O ₃	35	6,7	0	
	Total				97	100	12	100
produits	biomasse	0	0	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	0		0	
	lactate	0,031	0,34	C ₃ H ₆ O ₃	1	1,7	0	
	PII _A 60%	0,064	0,12	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₇	3	3,53	0,4	
	PII _B 10%	0,011	0,02	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₇	10	0,59	0,1	
	PI _A 22%	0,023	0,03	C ₄₃ H ₅₃ N ₈ O ₁₀	10	1,23	0,2	
	PI _B 8%	0,009	0,01	C ₄₂ H ₅₁ N ₈ O ₁₀	4	0,44	0,1	
	Total				6,6	6,85	0,8	66

Afin d'avoir une meilleure vision de l'utilisation du carbone consommé, sa répartition parmi les produits de la culture pour les trois périodes définies est représentée figure 17.

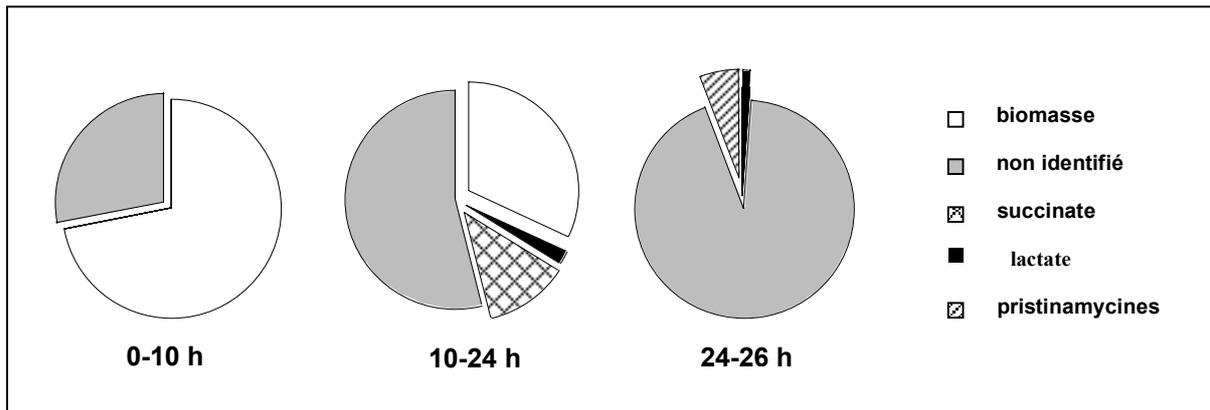


Figure 17 : Répartition du carbone provenant des différentes sources au cours des différentes phases de la culture. 0–10 h : croissance sur glutamate ; 10–24 h : croissance sur arginine et glucose ; 24–26 h production des pristinamycines.

Pour le bilan sur la première période, le recouvrement carboné est de 72 %. Voelker et Altaba (2001) ont comparé la quantité de carbone consommé provenant des sources de carbone (glucose, acides aminés) par rapport à la quantité de carbone utilisée pour la biomasse. De manière générale, la biomasse utilise la moitié du carbone consommé. La différence est considérée comme convertie en CO₂ pour générer de l'énergie pour la biosynthèse.

Si on considère qu'il y a autant de moles de carbone de CO₂ produites qu'il y a de moles de carbone utilisées pour la biomasse, la quantité de carbone consommée est insuffisante pour justifier les 72 % de carbone contenus dans la biomasse produite. Il est possible que lorsque la souche est placée sur le milieu MPS2 elle utilise des réserves intracellulaires constituées sur le

milieu de préculture. Il est également envisageable que la quantité de carbone produite soit surestimée soit par une surestimation de la biomasse lors des dosages, soit par une surestimation de la teneur en carbone de la biomasse lors de cette phase de croissance.

Lors de l'utilisation de l'arginine et du glucose, 32 % du carbone consommé est utilisé pour la formation de biomasse. En tenant compte des acides organiques produits cette valeur atteint 46 %. Si on considère qu'il y a autant de moles de CO₂ produites qu'il y a de moles de carbone utilisées pour la biomasse (Voelker et Altaba 2001) le recouvrement final est de 78 %, la proportion de carbone manquant est de 22 %.

Il n'est pas à exclure la production de métabolites non détectés, tels que le glycérol, qui a pu être mesuré dès que le phosphate devient limitant lors des cultures de *S. pristinaespiralis*, par Voelker et Altaba (2001), dans des concentrations allant de 0,08 à 1,2 g.L⁻¹. Si on considère qu'en moyenne 1 g.L⁻¹ de glycérol est produit pendant cette phase, cela correspond à 5 % du carbone consommé, ce qui est insuffisant pour compléter le manque en carbone.

Roubos *et al.* (2001) ont réalisé des bilans de matière, pour la souche *S. clavuligerus*, sur les différents réacteurs réalisés. Des déficits en carbone (10 % à 25 %) et azote (jusqu'à 40 %) entre les quantités initialement présentes et les bilans au cours des fermentations, incluant la production de CO₂, ont été mesurés. Un second bilan carbone effectué en mesurant le carbone inorganique du surnageant leur a permis d'obtenir un bilan équilibré. Ainsi, le carbone manquant se trouve dans le surnageant. Le ratio entre le carbone manquant et l'azote manquant se situe entre 5/1 et 4/1, ce qui est similaire à la composition de la biomasse. Des mesures réalisées sur le surnageant ont montré que plus de 40 % du carbone manquant est constitué de protéines similaires au contenu de la biomasse. Ces protéines proviendraient de la lyse cellulaire.

Lors de la production des pristinamycines, la concentration en biomasse reste constante. Le recouvrement carboné est très faible, puisque seulement 6,85 % du carbone consommé pendant cette période est retrouvé dans les produits excrétés (pristinamycines et acides organiques). Il semblerait que la souche utilise une grande partie du carbone pour faire de la maintenance. De plus la souche étant en phase stationnaire de croissance, il est possible qu'il y ait une lyse importante des cellules, compensée par la croissance, ce qui pourrait expliquer ce faible recouvrement en carbone.

III.1.3. Caractérisation physiologique de *S. pristinae spiralis* au cours du procédé discontinu de production des pristinamycines

Le pH intracellulaire (pH_i) 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 . 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.

- Evolution du pH intracellulaire

Des mesures du pH intracellulaire (pH_i) de *S. pristinae spiralis* par microscopie à épifluorescence couplée à une analyse d'image ont été effectuées au cours des fermentations réalisées (fig.18) (Corvini *et al.*, 2000).

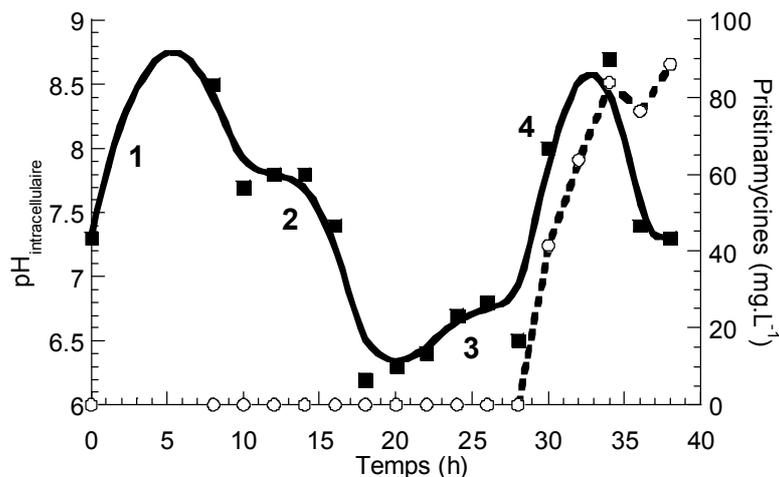


Figure 18 : Evolution de la concentration en pristinamycines (o) et du pH intracellulaire (■) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinae spiralis*.

Le pH_i subit des variations allant jusqu'à 2 unités de pH. Ces variations s'effectuent en 4 phases (fig.18). En tout début de culture, le pH_i augmente de plus d'une unité (1), suivi lors de la consommation du glucose et de l'arginine d'une forte diminution (2) à l'issue de laquelle le pH_i atteint sa valeur minimale (6,5) (3). Cette valeur se maintient jusqu'au début de la production des pristinamycines, et ensuite remonte brusquement, simultanément à la production des antibiotiques (4).

Les plus faibles valeurs de pH_i mesurées coïncident avec l'excrétion massive de lactate et de succinate. L'accumulation intracellulaire de ces composés précède leur excrétion

pourrait expliquer la chute intracellulaire du pH d'autant plus que la remontée (3) du pH_i correspond avec leur excrétion. Cet effet pourrait ensuite être accentué (4) par l'excrétion des pristinamycines, les pristinamycines I étant connues pour être des protonophores (Corvini *et al.*, 2004).

- **Mesure d'activités enzymatiques au cours du procédé discontinu de production des pristinamycines**

Afin d'avoir une meilleure idée du fonctionnement du métabolisme central, différentes activités enzymatiques clés situées dans les différentes branches du métabolisme central ont été mesurées lors du procédé de production en réacteur discontinu des pristinamycines (fig. 19). Ces mesures ont été réalisées sur des cultures différentes mais présentant des profils macrocinétiques identiques.

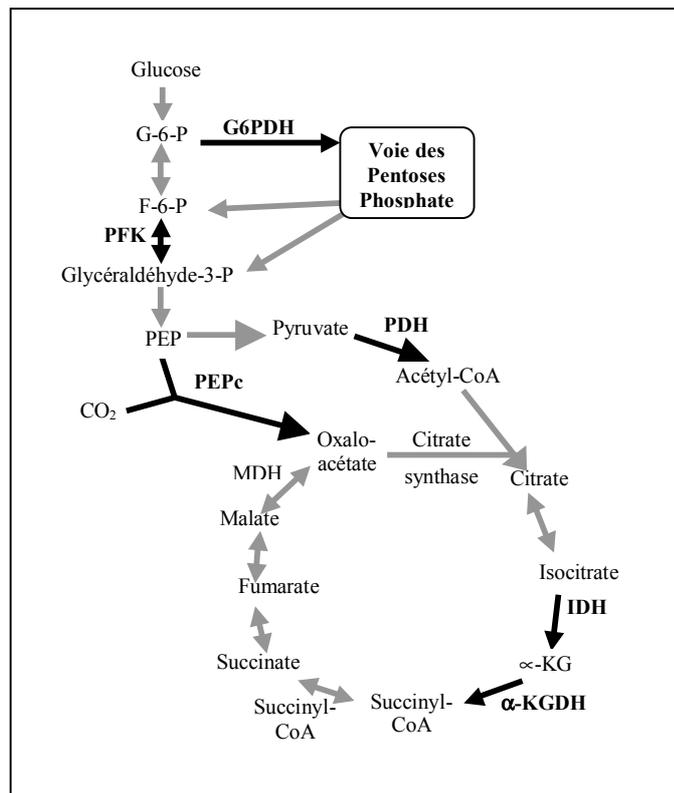


Figure 19 : Représentation du métabolisme central. Les flèches noires représentent les enzymes dont les activités ont été mesurées.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est la première enzyme de la voie des pentoses phosphate, la principale voie permettant de synthétiser le NADPH, nécessaire à la croissance et à la biosynthèse des pristinamycines, à partir de la dégradation du glucose. La phospho-fructo-kinase (PFK) est située dans la glycolyse, de plus, son activité a déjà été

décrite comme étant une étape clé pour le catabolisme se trouvant en aval de cette enzyme (Dekleva et Strohl, 1988 a). La pyruvate déshydrogénase (PDH) est l'une des dernières enzymes permettant l'alimentation du cycle de Krebs. De plus l'acétate étant le précurseur majoritaire des pristinamycines II, son niveau d'activité pourrait être crucial pour leur formation. La phospho-énol-pyruvate carboxylase (PEPc) est la voie anaplérotique majoritaire chez différents *Streptomyces*. L'isocitrate déshydrogénase (IDH) est responsable de la synthèse d' α -cétoglutarate (α -KG), le précurseur de la proline, nécessaire à la synthèse des pristinamycines de classe II. L' α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH) est l'une des seules enzymes dont l'activité est réellement spécifique du cycle de Krebs, et les productions d' α -cétoglutarate observées chez le genre *Streptomyces*, pourraient s'expliquer par une faiblesse de son activité (Dekleva et Strohl, 1987). L'activité de l'isocitrate lyase, située dans le shunt glyoxylique, n'est pas présentée car les activités mesurées sur *S. pristinaespiralis* sont très faibles (de 0 à 4 mUE) et compte tenu des erreurs expérimentales et des faibles variations observées, son étude apporte peu d'informations (Corvini, 2000).

Les résultats des mesures d'activités enzymatiques sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Activités enzymatiques spécifiques (mUE) dosées au cours du procédé de production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Enzyme	Temps pHi		Temps pHi		Temps pHi		Temps pHi	
	11h	8,0	23h	6,4	29h	6,5	35h	8,2
	18 h avant la production des pristinamycines		6 h avant la production des pristinamycines		Production des pristinamycines		6 h après la production des pristinamycines	
G6PDH	13,7 +/- 1,5		18,6 +/- 1,8		19,2 +/- 1,3		8,6 +/- 1,3	
PFK	24,3 +/- 0,4		44,0 +/- 2,8		21,7 +/- 2,7		18,8 +/- 0,6	
PDH	11,0 +/- 0,5		9,6 +/- 0,4		3,0 +/- 0,05		1,4 +/- 0,1	
PEPc	157 +/- 15		94,7 +/- 9		74,8 +/- 0,4		72,0 +/- 1	
IDH	271 +/- 21		297 +/- 32		405 +/- 14		196 +/- 35	
α -KGDH	4,8 +/- 0,05		5,6 +/- 0,6		2,7 +/- 0,5		5,7 +/- 1	
Pristinamycines totales (mg.l ⁻¹)	0,0		0,0		5,6		136,2	
	Déclenchement de la production de succinate et lactate							

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α -KGDH) α -cétoglutarate déshydrogénase. (+/- : écart type).

Un schéma des activités enzymatiques peut être établi avec les valeurs d'activités spécifiques mesurées au cours de la fermentation (fig.20 a-d).

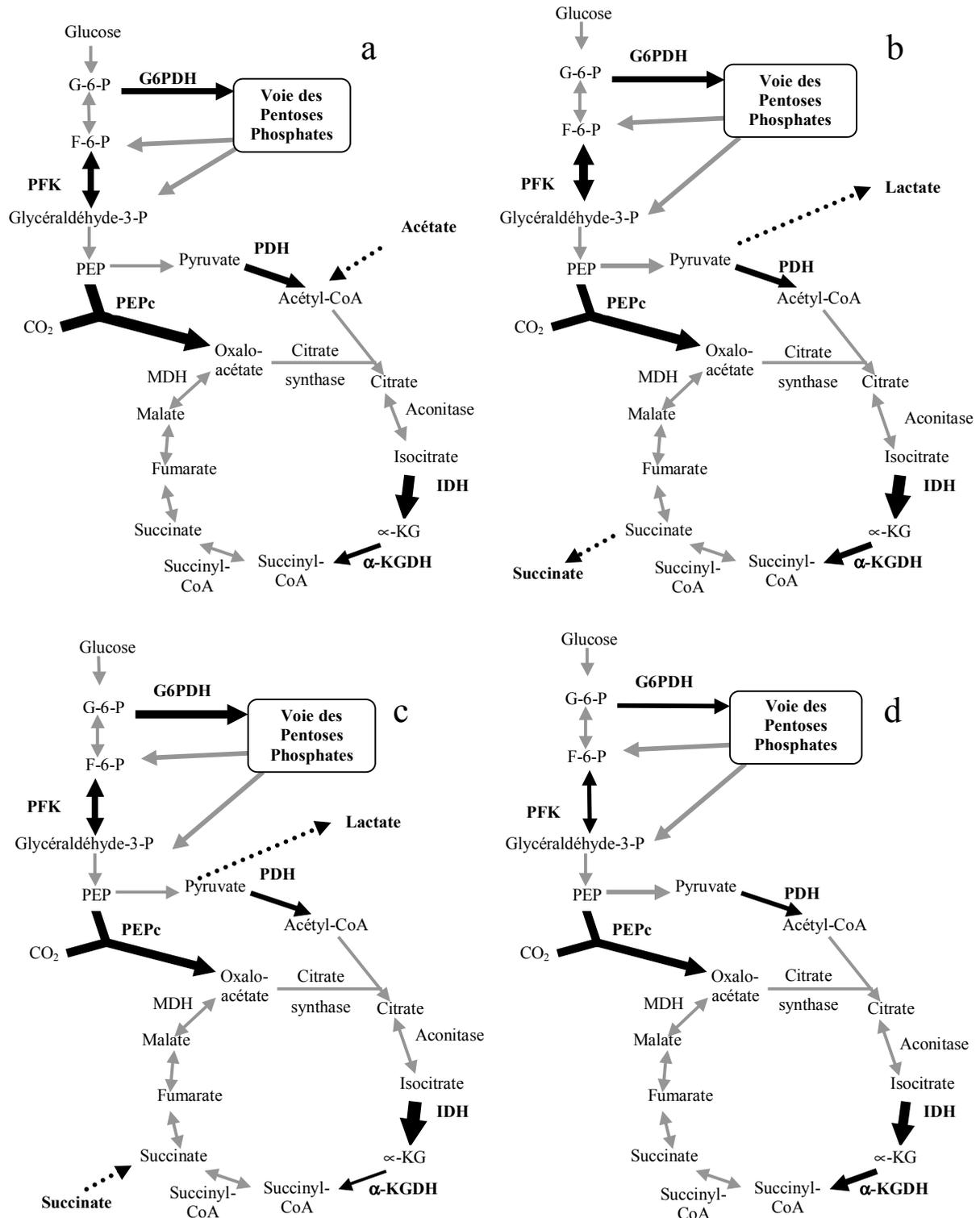


Figure 20 : Evolution des activités spécifiques dosées au cours du temps lors du procédé de production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

a : 18 h avant la production des pristinamycines, b : 6 h avant la production des pristinamycines, c : production des pristinamycines, d : 6 h après le déclenchement de la production des pristinamycines.

Les flèches correspondant aux réactions catalysées par des enzymes dont les activités ont été mesurées sont représentées en noir. La grosseur des flèches rend compte du niveau des activités enzymatiques. Les flèches en pointillé indiquent les entrées et sorties des flux de carbone correspondant aux acides organiques dosés.

Les activités de la PEPc et de l'IDH sont les plus élevées. Les activités de la G6PDH et de l'IDH augmentent jusqu'à 29h, lorsque le pHi est minimal et que les antibiotiques commencent à être produits, pour ensuite diminuer alors que le pHi remonte. L'augmentation de l'activité spécifique de la G6PDH correspond au déclenchement de la consommation du glucose, après 12 h de culture.

Les activités de la PDH et de la PEPc décroissent tout au long de la culture, alors que l'activité de la PFK (qui les alimente) atteint un maximum à 23h (moment où le succinate et le lactate sont excrétés) puis diminue. L'activité de l' α -KGDH reste à un faible niveau pendant toute la culture. Elle est minimale lorsque les antibiotiques commencent à être excrétés.

Les hypothèses émises par Corvini (2000) étaient que les activités de la PDH et de l' α -KGDH pouvaient être limitantes pour la dégradation du glucose. La chute d'activité de la PDH, alors que l'activité de la PFK augmente, pourrait donc constituer un goulot d'étranglement et conduire à la production de lactate observée 6 h avant le début de la production des pristinamycines (fig.16).

En ce qui concerne l'excrétion de succinate, en raison de leurs hauts niveaux d'activités, la PEPc et de l'IDH ne semblent pas constituer un goulot d'étranglement pouvant expliquer l'excrétion d'acides organiques. Il est possible que les activités de la citrate synthase et/ou de l'aconitase qui n'ont pas été dosées puissent également être à l'origine d'une limitation du flux carboné au sein du cycle de Krebs, la citrate synthase ayant été rapportée comme limitante comparativement à la cis-aconitase et l'IDH chez certains *Streptomyces* (Takebe *et al.*, 1991 ; Hostalek *et al.*, 1969). Une plus faible activité de la citrate synthase comparativement à la PEPc pourrait expliquer la production de succinate mesurée, qui proviendrait alors de l'oxalo-acétate formé par la PEPc *via* un fonctionnement "inverse" du cycle de Krebs, suivant le bras réducteur.

III.2. Résultats complémentaires concernant les mesures d'activités enzymatiques lors du procédé de production des pristinamycines

Les activités enzymatiques intracellulaires mesurées *in vitro* ne rendent compte que des niveaux relatifs des enzymes pour les différentes conditions de cultures. Afin d'améliorer nos connaissances sur le fonctionnement de ces enzymes dans la cellule à chaque instant du procédé, il est nécessaire de corriger ces activités par l'effet des différents inhibiteurs ou activateurs de l'activité enzymatique, ainsi que par l'effet du pH. Etant données que d'importantes variations du pH_i ont été mesurées au cours du procédé de production des pristinamycines, nous avons fait le choix de nous intéresser à ce paramètre en particulier. Le pH_i va permettre de recalculer les activités enzymatiques considérées afin de mieux rendre compte de leurs activités *in vivo*.

III.2.1. Effet du pH sur les activités enzymatiques

Afin de compléter les travaux de Corvini (2000), des tests *in vitro* permettant d'estimer l'influence du pH sur toutes les activités enzymatiques étudiées ont été réalisés. Les résultats obtenus sont présentés figure 21.

Les enzymes dont les variations d'activités ont été mesurées au cours du procédé de production des pristinamycines présentent des pH optimums (activité > 90% de la valeur maximale) différents : 6,0 à 6,5 pour la PDH et l' α -KGDH, 7,3 à 7,9 pour la G6PDH, 7,9 à 8,2 pour l'IDH, 7,1 à 7,6 pour la CitS, 6,5 à 7,1 pour la PFK et 6,5 à 7,6 pour la PEPC. Au cours de la fermentation, le pH intracellulaire varie entre 6,4 et 8,5, variations pouvant affecter l'activité de ces différentes enzymes.

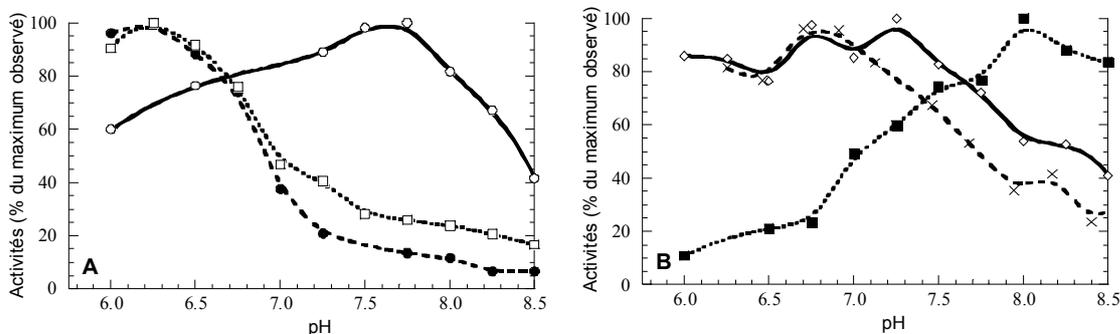


Figure 21 : Effet du pH sur les activités enzymatiques étudiées.

A : (o) glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), (□) pyruvate déshydrogénase (PDH). (●) α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH).

B : (◇) phospho-énol pyruvate carboxylase (PEPC), (x) phospho-fructo-kinase (PFK), (■) isocitrate déshydrogénase (IDH).

III.2.2. Vers une estimation des activités spécifiques *in vivo*

Les mesures d'activités spécifiques (AS) effectuées au cours du procédé de production des pristinamycines ont été réalisées dans des tampons de pH défini (voir matériels et méthodes). Ces pH ne correspondent pas à la valeur du pHi au moment du prélèvement. Les activités spécifiques mesurées *in vitro* des enzymes peuvent donc être corrigées selon l'équation 1 si l'on souhaite s'approcher davantage des activités enzymatiques *in vivo*.

$$\text{AS corrigée} = \frac{(\text{AS mesurée}) \cdot (\% \text{ ApHi})}{(\% \text{ AT})} \quad (\text{équation 1})$$

AS mesurée est l'activité spécifique de l'enzyme déterminée à partir d'un échantillon de culture (tableau 6). Cette activité est mesurée au pH du tampon préconisé par le protocole de dosage utilisé. Le pourcentage d'activité relative est l'activité enzymatique rapportée au maximum d'activité mesurée (fig.21).

% AT est le pourcentage d'activité relative à la valeur du pH du tampon de dosage.

% ApHi est le pourcentage d'activité relative de l'enzyme à la valeur du pHi au moment du prélèvement.

Les valeurs d'activités spécifiques du tableau 6 mais cette fois corrigées selon l'équation 1 sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Activités enzymatiques spécifiques (mUE) corrigées au cours du procédé de production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Enzyme	Temps pHi		Temps pHi		Temps pHi		Temps pHi	
	11h	8,0	23h	6,4	29h	6,5	35h	8,2
	18 h avant la production des pristinamycines		6 h avant la production des pristinamycines		Production des pristinamycines		6 h après la production des pristinamycines	
G6PDH	12		14		15		6	
PFK	21		97		50		16	
PDH	6		19		6		1	
PEPc	133		117		90		60	
IDH	399		87		131		259	
α -KGDH	2		14		6		1	
Pristinamycines totales (mg.l ⁻¹)	0,0		0,0		5,6		136,2	

Déclenchement de la production de succinate et de lactate

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α -KGDH) α -cétoglutarate déshydrogénase.

Un schéma des activités enzymatiques peut alors être établi, avec les valeurs des activités spécifiques corrigées (fig. 22).

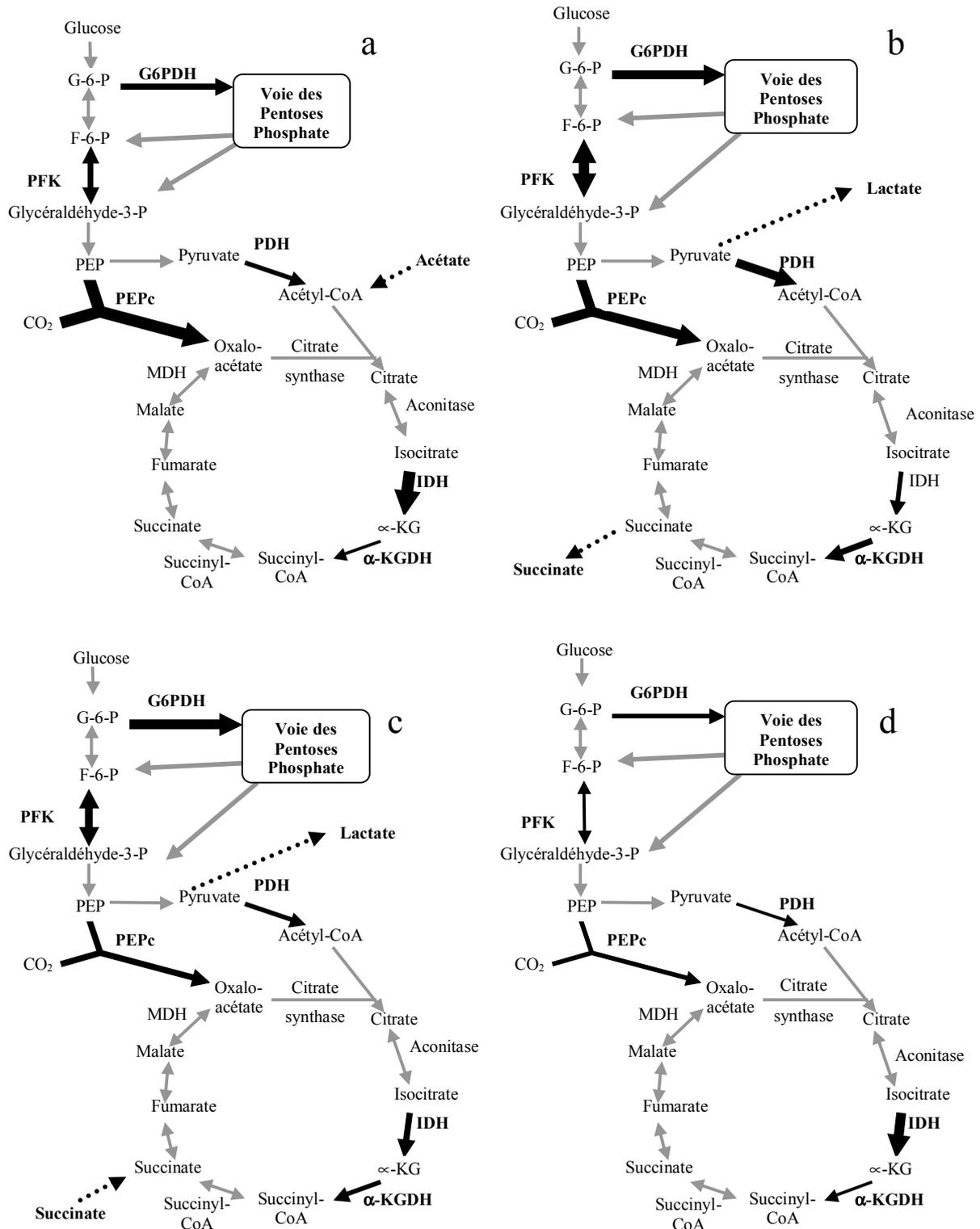


Figure 22 : Evolution des activités spécifiques corrigées par le pH intracellulaire.

a : 18 h avant la production des pristinamycines. b : 6 h avant la production des pristinamycines.

c : production des pristinamycines. d : 6 h après le déclenchement de la production des pristinamycines.

Les flèches correspondant aux réactions catalysées par des enzymes dont les activités ont été mesurées sont représentées en noir. La grosseur des flèches rend compte des niveaux des activités enzymatiques. Les flèches en pointillé indiquent les entrées et sorties des flux de carbone correspondant aux acides organiques dosés.

Par rapport aux activités spécifiques des résultats antérieurs, la variation des activités spécifiques corrigées en tenant compte de la valeur du pHi peut rester inchangée, se faire à la hausse, comme c'est le cas pour la PEPc, ou à la baisse. Après correction, la G6PDH présente des niveaux d'activité plus faibles. Pour la PEPc, les activités spécifiques corrigées sont plus élevées excepté à 11h. Pour l'IDH les valeurs corrigées sont plus élevées en début et fin de fermentation et plus faibles au milieu, et pour l' α -KGDH c'est l'inverse. Pour la PDH et la PFK, les activités spécifiques sont plus élevées après correction par le pHi lors du déclenchement de la production des acides organiques et des pristinamycines.

Le pHi a donc un effet très net sur les activités enzymatiques au moment de la production de succinate, de lactate et lors du déclenchement de la production des pristinamycines, lorsque le pHi présente ses valeurs les plus faibles. L'enzyme la plus sensible à l'intégration du pH intracellulaire dans le calcul des activités enzymatiques est l'IDH.

Pour avoir une meilleure vision de la répartition des flux de matière entre les différentes voies métaboliques du métabolisme central, les rapports d'activités spécifiques des différentes enzymes ont été calculés. Cette analyse a été effectuée à partir des valeurs des activités enzymatiques corrigées selon l'équation 1 uniquement (tableau 8).

Tableau 8 : Rapport des activités spécifiques corrigées par le pH intracellulaire aux différents temps de la fermentation.

Temps	11 h	23 h	29 h	35 h
Rapport	18 h avant le déclenchement de la production des pristinamycines	6 h avant le déclenchement de la production des pristinamycines	déclenchement de la production des pristinamycines	6 h après le déclenchement de la production des pristinamycines
PFK / G6PDH	1,8	6,7	3,2	2,5
PFK / PDH	3,8	5,1	8,6	22,1
PEPc / PDH	24	6	16	82
PDH / IDH	0,01	0,22	0,04	0,003
IDH / α -KGDH	263	6	21	247

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α -KGDH) α -cétoglutarate déshydrogénase.

Le rapport (PFK/G6PDH) représente la répartition des flux de matière entre la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Il augmente de 1,8 à 11h jusqu'à 6,7 à 23h, suggérant une augmentation du flux de matière dans la glycolyse. Par la suite, un ré-équilibre s'effectue avec une augmentation de la proportion du flux passant par la voie des pentoses phosphate.

Ceci pourrait être attribué à la demande en co-facteurs réduits (NADPH) requis pour la production des pristinamycines.

Le rapport (PFK/PDH) permettra de déterminer si les variations d'activités sont susceptibles de provoquer une limitation des flux en amont du cycle de Krebs pouvant mener à une accumulation de pyruvate. Ce rapport augmente de 3,8 à 11 h, jusqu'à 22,1 à 35 h. Cette augmentation pourrait traduire une limitation croissante du flux de matière par la PDH. Dans le même temps, l'activité de la PEPc diminue. Une limitation par la PDH ainsi qu'une baisse simultanée de l'activité PEPc pourrait conduire à une accumulation de pyruvate et donc de lactate, précédemment observée, *via* la lactate déshydrogénase (LDH).

Le rapport (PEPc/PDH) indiquerait la voie préférentielle entre ces deux enzymes pour l'entrée du flux de matière dans le cycle de Krebs. Celui-ci chute de 24 (11 h) à 6 (23 h), permettant un flux plus important vers l'acétyl-CoA, précurseur des pristinamycines, peu avant le début de la production des antibiotiques, pour ensuite augmenter à 16 (29 h) puis 82 (35 h), indiquant une ré-orientation dès 29h des flux de matière à travers la voie anaplérotique.

L'IDH présente une activité spécifique calculée très élevée (>87 mUE) tout au long de la culture, avec un maximum à 11h. Le rapport PDH/IDH est inférieur à 1 tout au long de la culture semblant indiquer que le flux pouvant passer par l'IDH est supérieur à la capacité de la PDH, la consommation d'acétate observée durant les premières heures de culture pourrait permettre de compenser cette plus faible activité de la PDH comparativement à l'IDH.

En ce qui concerne l' α -KGDH, l'activité calculée reste très faible (entre 1 et 14 mUE) tout au long de la fermentation. Par conséquent, le rapport IDH/ α -KGDH reste à des niveaux élevés tout au long de la fermentation : de 200 (11h) à 6 (23h) puis augmentation jusqu'à 22 (29h) et enfin 259 (35h). L'évolution de ce rapport présagerait d'une accumulation d' α -cétoglutarate en tout début et en fin de fermentation. Corvini *et al.* (2001) ont précédemment mis en évidence l'excrétion d'une faible quantité d' α -cétoglutarate au début du procédé de production des pristinamycines. Mais cette accumulation a été attribuée à l'utilisation du glutamate comme seule source de carbone et d'azote à ce moment de la culture et à une utilisation plus rapide de l'azote issu de cet acide organique par rapport au squelette carboné. En fin de fermentation aucune trace d' α -cétoglutarate n'est détectée dans le milieu de culture. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de l' α -cétoglutarate comme précurseur des pristinamycines de classe II.

III.2.3. Discussion

La mesure de l'effet du pH *in vitro* sur les activités enzymatiques a permis d'établir des pourcentages d'activité des différentes enzymes aux différentes valeurs de pH. Le pHi varie au cours de la fermentation et les activités spécifiques sont mesurées dans des solutions présentant des pH différents de celui du pHi au moment du prélèvement. La prise en compte du pourcentage d'activité de l'enzyme à la valeur du pHi au moment du prélèvement a permis d'intégrer l'influence du pHi sur les flux de matière dans les différentes voies métaboliques. Un nouveau schéma des activités enzymatiques a pu être établi, l'évolution des niveaux d'activité des différentes enzymes ainsi déterminées différant parfois de celles mesurées directement. Cependant, de manière générale, à l'exception de l'IDH, l'introduction de l'influence du pHi sur les activités enzymatiques mesurées engendre peu de variations par rapport aux mesures brutes effectuées. Toutefois, ces valeurs doivent être considérées avec une certaine réserve dans la mesure où le calcul de ces activités *in vivo* ne tient pas compte de la présence ou l'absence d'inducteurs, d'inhibiteurs, de co-facteurs ainsi que de la concentration en substrats, et de la température.

Cependant, les résultats obtenus peuvent nous permettre l'émission d'hypothèses expliquant la production d'acides organiques observée au cours du procédé de production des pristinamycines. Ainsi, en prenant en compte l'influence du pH intracellulaire sur les activités enzymatiques mesurées, l'activité de l'isocitrate déshydrogénase est diminuée par quatre au moment de la production du lactate et du succinate. Son activité est cependant élevée comparée à celles de la PDH et de l' α -KGDH. L'IDH ne semble donc pas être à l'origine d'un goulot d'étranglement pouvant expliquer la production de succinate observée.

La consommation simultanée du glucose et de l'arginine laisse penser que le glucose est utilisé comme source de carbone et l'arginine comme source d'azote. Néanmoins, une hypothèse pouvant expliquer l'accumulation de succinate (3 g.L^{-1}) dans le milieu de culture pourrait être le catabolisme de l'arginine. En effet, celui-ci peut conduire à la production de succinate, selon la voie détaillée fig. 23. Cette voie a été mise en évidence chez d'autres micro-organismes que les *Streptomyces*.

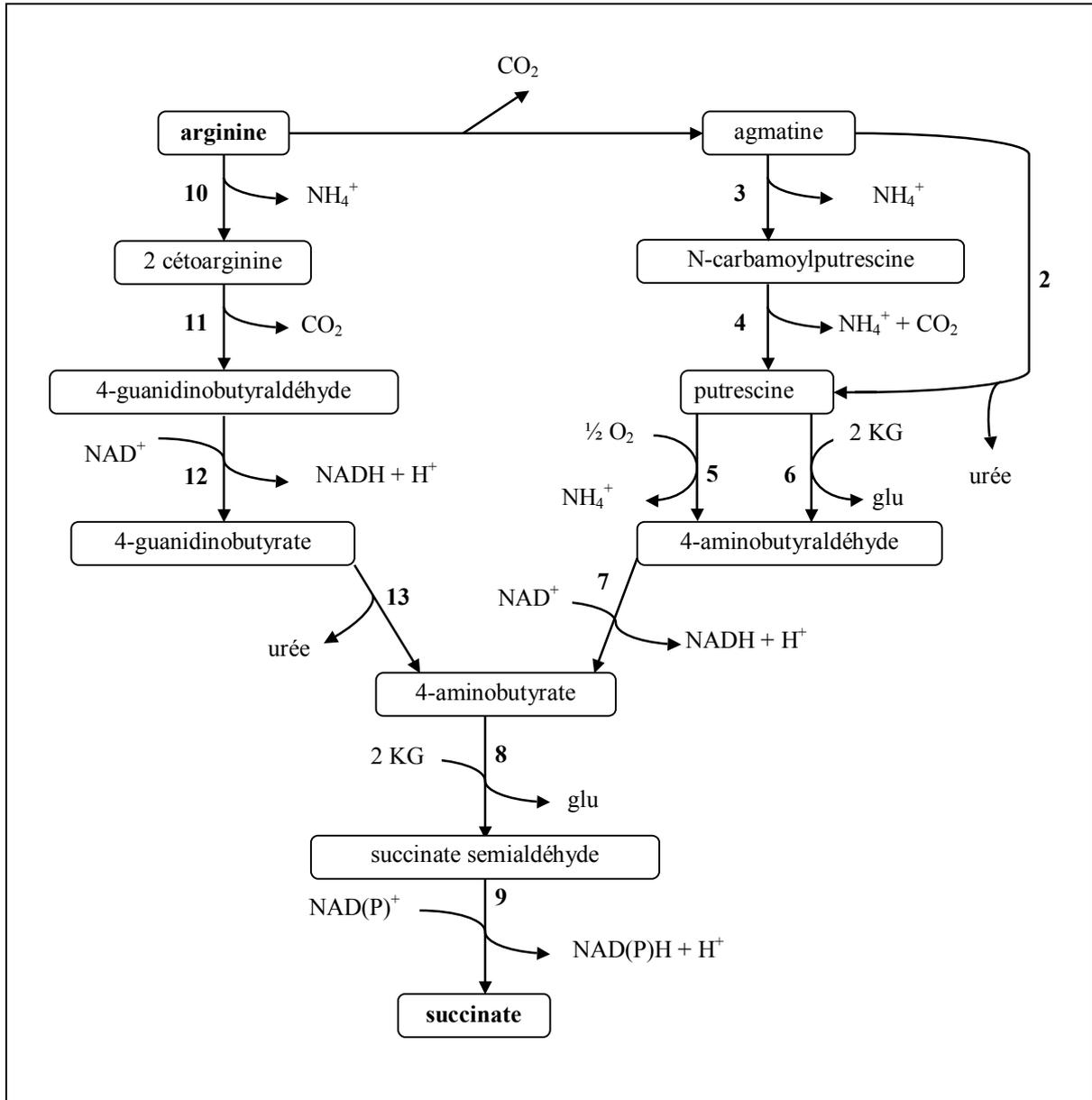


Figure 23. Voies de l'arginine decarboxylase et de l'arginine oxydase (Cunin *et al.*, 1986).

Les étapes enzymatiques sont les suivantes : (1) arginine décarboxylase, (2) agmatine ureohydrolase, (3) agmatine deiminase, (4) N-carbamoylputrescine hydrolase, (5) putrescine oxidase, (6) putrescine transaminase, (7) 4-aminobutyraldéhyde déshydrogénase, (8) 4-aminobutyrate transaminase, (9) succinate semialdehydedéshydrogénase, (10) arginine oxydase, (11) 2-céto-arginine décarboxylase, (12) 4-guanidinobutyraldéhyde oxydoréductase, (13) 4-guanidinobutyrase.

Afin d'affiner notre vision du métabolisme de *S. pristinaespiralis* au cours du procédé de production des pristinamycines, des mesures complémentaires peuvent être envisagées. Ainsi, un dosage de l'activité respiratoire au cours de la fermentation permettrait d'établir s'il existe un basculement métabolique d'un métabolisme respiratoire à fermentaire au cours du procédé de production des pristinamycines. Une telle modification métabolique pourrait en effet avoir

un rôle dans la synthèse et l'excrétion de succinate et de lactate, produits de fin de fermentation chez de nombreux microorganismes.

La citrate synthase et l'aconitase sont les deux premières enzymes du cycles de Krebs, la citrate synthase ayant déjà été décrite comme limitante comparativement à l'IDH et à l'aconitase chez *S. hygroscopus* et *S. aureofaciens*, la mesure des activités spécifiques de ces deux enzymes pourrait être intéressante afin de compléter l'étude métabolique et de vérifier les hypothèses émises à ce jour.

III.3 Recherche de la validation des résultats antérieurs avec un réacteur de géométrie différente

III.3.1. Culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur de géométrie différente en mode discontinu

Une culture en réacteur en mode discontinu a été réalisée selon le protocole utilisé précédemment au laboratoire et dont les principaux résultats ont été présentés dans la partie III.1., afin de vérifier la reproductibilité des résultats. La seule différence lors de cette expérience provenait du réacteur utilisé : un Applikon de 7 L, au lieu d'un réacteur CHEMAP de 2,5 L. La vitesse d'agitation initiale est la même.

Ces réacteurs possèdent des caractéristiques différentes rassemblées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Différences entre les fermentations réalisées dans les réacteurs Chemap et Applikon.

	CHEMAP	APPLIKON
Géométrie	Cuve à fond sphérique	Cuve à fond plat
Pales	2 turbines Rushton droites à 6 pales et une hélice marine	2 turbines Rushton droites à 6 pales
Volume total	2,5 L	7 L
Volume utile	2 L	5 L
Régulation de température	Double enveloppe à circulation d'eau reliée à un bain-marie	Collier chauffant et boucle interne de refroidissement
Contrôle	Numérique CBC 5	Bio controller ADI 1030 Applikon
Sonde O ₂	Ingold	Applikon
Aération	Fritté	Tuyau métallique percé

Une fiole d'Erlenmeyer chicanée contenant le milieu MPS2 estensemencée à partir d'une préculture en milieu complexe ICS âgée de 44 h. Cette culture est conduite 24 h à 28°C puis utilisée pour inoculer le réacteur contenant 5 litres de milieu MPS2 (fig. 24). Pour cette

culture en réacteur le pH est contrôlé à 6,8 et la température à 28°C dès le départ. La vitesse d'agitation est de 250 rpm en début de fermentation.

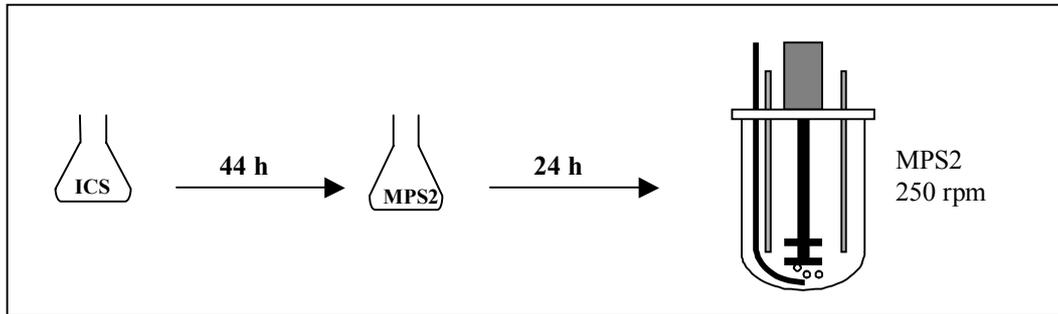


Figure 24 : Les différentes étapes du procédé de production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Un suivi macrocinétique de la biomasse, de la teneur en oxygène dissous et de la production de pristinamycines est réalisé sur cette culture (fig. 25).

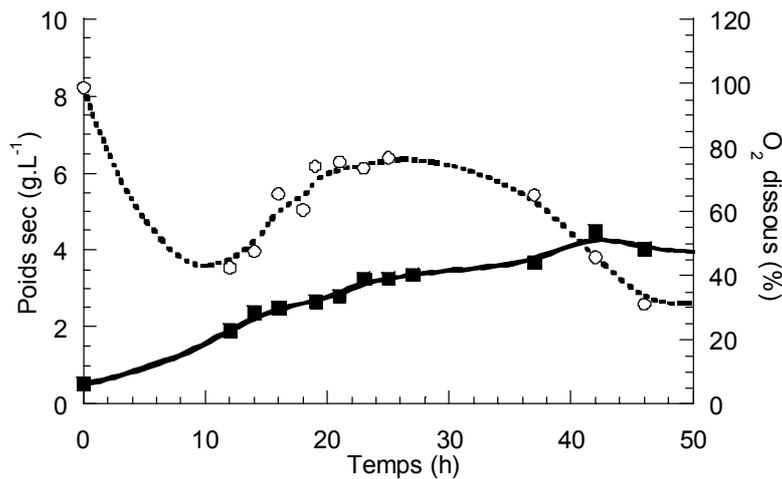


Figure 25 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en oxygène dissous (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 250 rpm.

Au cours des fermentations réalisées selon ce protocole, la biomasse maximale atteinte est faible et peu satisfaisante (de l'ordre de 4 g.L⁻¹ contre en moyenne 9 g.L⁻¹ précédemment). De plus, il n'y a aucune production de pristinamycines, alors que précédemment entre 80 et 130 mg.L⁻¹ étaient obtenus (chap.III.1.1.). Lors de cette culture, la teneur en O₂ dissous n'est pas descendue en dessous de 30 % de la saturation en air et la vitesse d'agitation est restée constante à 250 rpm tout au long de la culture, alors que pour les expériences précédemment réalisées la teneur en O₂ diminuait jusqu'à 30 % dès 15 h de culture (fig.15), entraînant une augmentation de la vitesse d'agitation afin de maintenir la teneur en O₂ au-dessus de cette valeur.

La faible concentration en biomasse pourrait donc être due à une plus faible agitation et être la cause de l'absence de production de pristinamycines. Ce phénomène pourrait être lié aux forces de cisaillement exercées par les pales : une moins forte agitation produirait moins de forces de cisaillement, ce qui pourrait engendrer des pelotes plus grosses au sein desquelles pourrait exister une moins bonne diffusion des substrats, créant ainsi des limitations nutritionnelles défavorables à la croissance cellulaire.

III.3.2. Influence de la vitesse d'agitation sur la concentration en biomasse lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer

Afin de déterminer l'influence de la vitesse d'agitation sur la croissance et la production de pristinamycines, des essais sont conduits en fioles d'Erlenmeyer. Afin de mieux reproduire les conditions hydrodynamiques de l'agitation en réacteur, celle-ci est assurée non pas à l'aide d'une table orbitale mais au moyen de barreaux aimantés identiques, les fioles d'Erlenmeyer étant ensuite placées sur des agitateurs magnétiques.

Deux séries de 4 cultures sont réalisées (fig. 26) :

première série : 2 fioles à 400 rpm et 2 fioles à 700 rpm

deuxième série : 2 fioles à 400 rpm et 2 fioles à 1000 rpm

Dans chaque série les quatre fioles sontensemencées à partir de la même préculture de 44 h réalisée sur ICS.

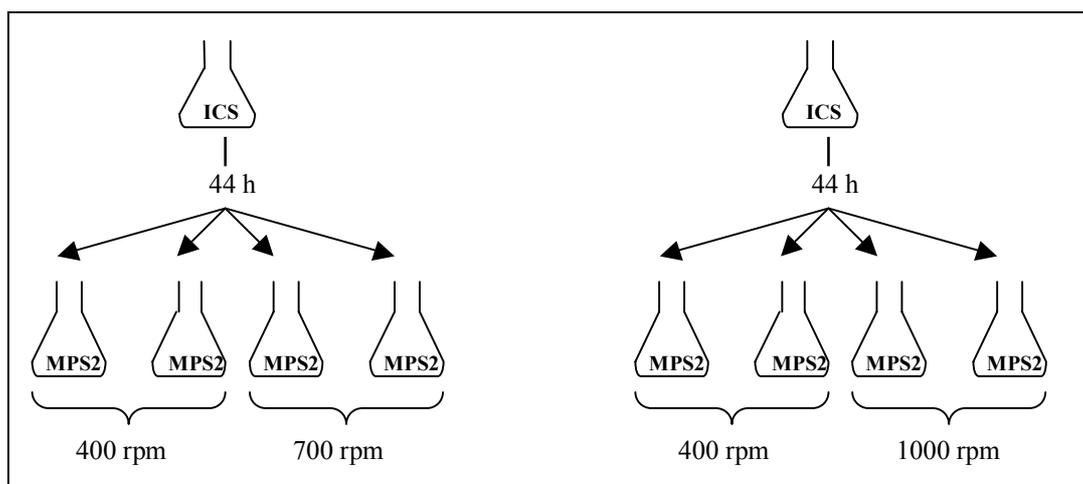


Figure 26 : Cultures de *S. pristinaespiralis* réalisées afin d'étudier l'influence de l'agitation en fiole d'Erlenmeyer.

Les cultures sont menées à 28°C et des prélèvements sont effectués afin de suivre la biomasse et la production de pristinamycines par antibiogramme. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 10.

Tableau 10 : influence de la vitesse d'agitation sur la croissance et la production de pristinamycines en fioles d'Erlenmeyer

Vitesse d'agitation (rpm)	400	700	1000
Poids sec maximal (g.L ⁻¹)	5	6	8
Entrée en phase stationnaire	à 50 h	après 33 h	après 33 h
Production de pristinamycines	à 50 h pour 1 fiole, pas de production dans les 3 autres	à 24 h	à 24 h

La vitesse d'agitation semble bien avoir un effet sur la production de biomasse puisque la concentration maximale de biomasse obtenue augmente avec la vitesse d'agitation.

La croissance de la souche est plus rapide avec une agitation de 700 ou 1000 rpm puisque la densité cellulaire maximale est atteinte plus rapidement.

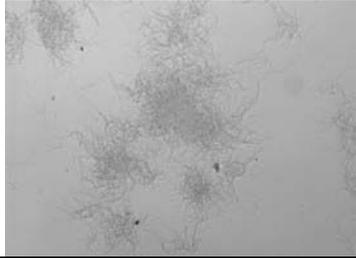
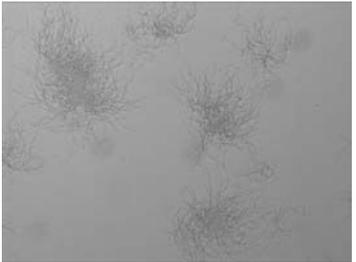
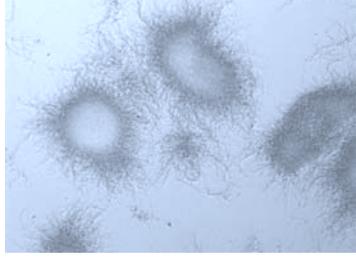
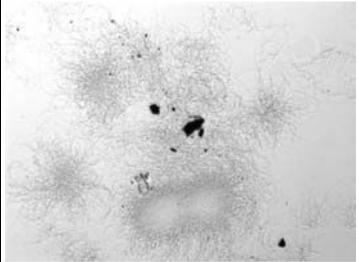
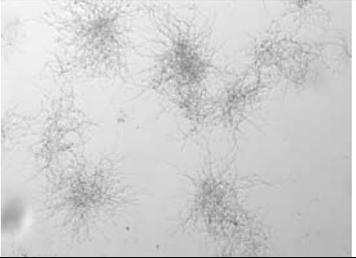
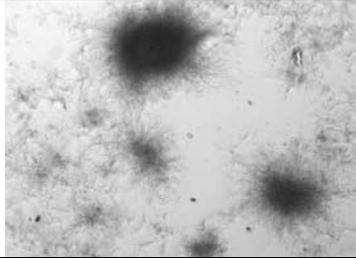
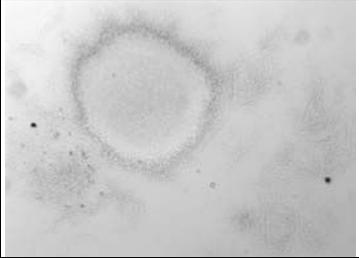
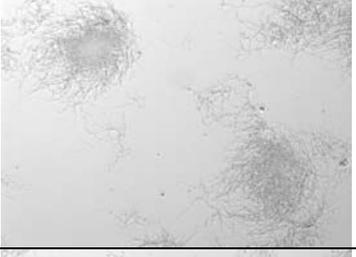
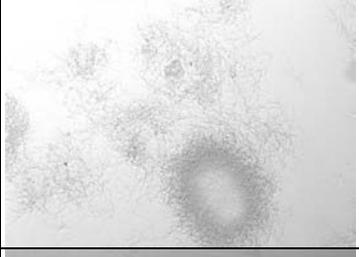
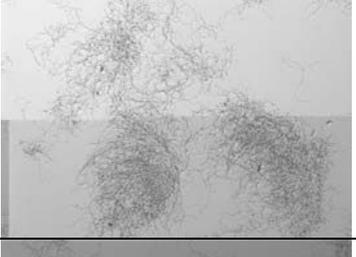
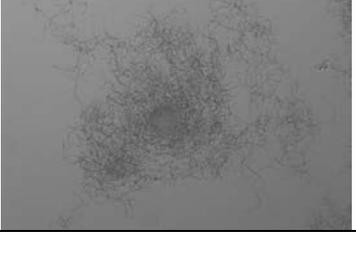
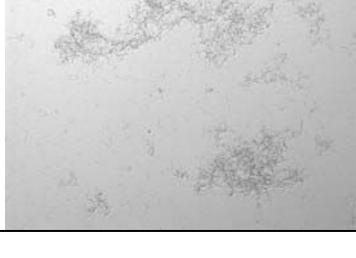
Des photographies sont également réalisées sur des états frais au grossissement x100 (tableau 11) afin de comparer la morphologie des pelotes au cours des cultures.

Lors des cultures réalisées à 400 rpm, *S. pristinaespiralis* forme des enchevêtrements dont la taille augmente jusqu'à la fin de la culture (54 h). Lorsque l'agitation est de 700 rpm, les bactéries forment des enchevêtrements à 24 h, mais présentent dès la 27^{ème} heure de culture une morphologie plus compacte, de type pelote et dont la taille augmente au cours du temps. En fin de culture, dès la 51^{ème} heure, ces pelotes disparaissent à cause d'un phénomène de lyse cellulaire au profit de fragments de mycélium plus ou moins assemblés, encore visibles au microscope.

Les cultures réalisées à 1000 rpm présentent dès la 24^{ème} heure de culture une morphologie compacte de type pelote en plus des enchevêtrements. Ces pelotes atteignent leur taille maximale après 30 h de culture, leur taille diminue ensuite en raison de la lyse cellulaire (33 h).

Les cultures réalisées à 700 et 1000 rpm présentent des structures de type pelote, absentes des cultures réalisées à 400 rpm. De plus, ces pelotes apparaissent plus rapidement à 1000 rpm. La vitesse d'agitation a donc un effet sur la morphologie de la souche en plus de son effet sur la vitesse de croissance.

Tableau 11 : Evolution de la morphologie des amas cellulaires de *S. pristinaespiralis* en fonction de la vitesse d'agitation en fiole d'Erlenmeyer (grossissement X100).

Temps (heures)	Agitation 400 rpm	Agitation 700 rpm	Agitation 1000 rpm
24	ND		
27			
30			
33			
51			
54			

En fioles d'Erlenmeyer, il est cependant difficile de dissocier l'effet de l'agitation et de l'aération, l'aération du milieu étant réalisée grâce à l'agitation exclusivement. Il est donc possible que l'augmentation de la biomasse observée lorsque la vitesse d'agitation augmente puisse être due à une meilleure aération du milieu résultant de l'augmentation de l'agitation.

Lorsque la vitesse d'agitation augmente, la production de pristinamycines est également plus précoce puisqu'elle arrive en fin de phase de croissance et non en phase stationnaire, comme c'est le cas à 400 rpm pour une culture sur trois ayant produit des pristinamycines. En plus de l'effet sur la croissance cellulaire, il semble donc y avoir également un effet sur le temps de déclenchement de la production.

III.3.3. Effet de la vitesse d'agitation sur la biomasse lors de cultures en réacteur en mode discontinu

Suite aux résultats obtenus en fiole d'Erlenmeyer, trois essais sont conduits en réacteur en mode discontinu avec une agitation de départ de 700 rpm (au lieu de 250), afin de déterminer si la biomasse maximale et la production de pristinamycines étaient restaurées.

La préculture en milieu ICS est placée 44 h à 28°C et à 250 rpm, puis est utilisée pour ensemercer du milieu MPS2 en fioles d'Erlenmeyer. Après une incubation de 24 h à 28°C sous une agitation de 250 rpm, ces cultures sont utilisées pour inoculer le réacteur Applikon de 7 L contenant du MPS2 et dont l'agitation de départ est fixée à 700 rpm (fig. 27). La saturation en air est de 100 % lors du démarrage de la culture.

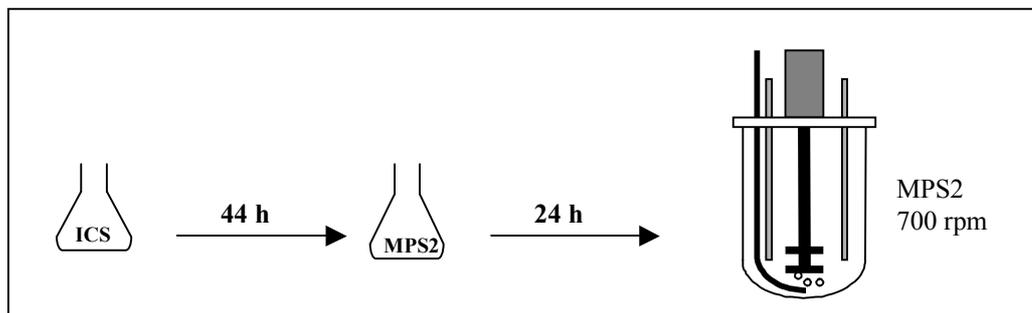


Figure 27 : Procédé de mise en culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur.

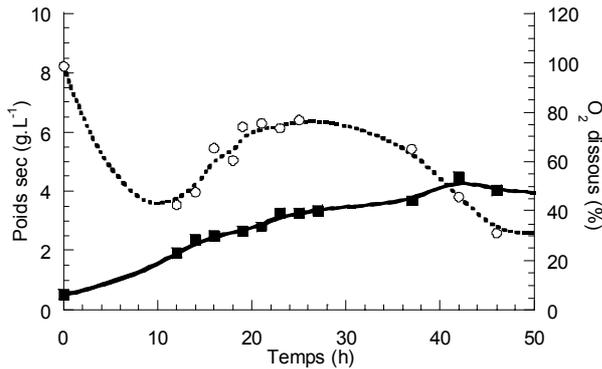


Figure 28 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en oxygène dissous (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* avec une agitation initiale de 250 rpm.

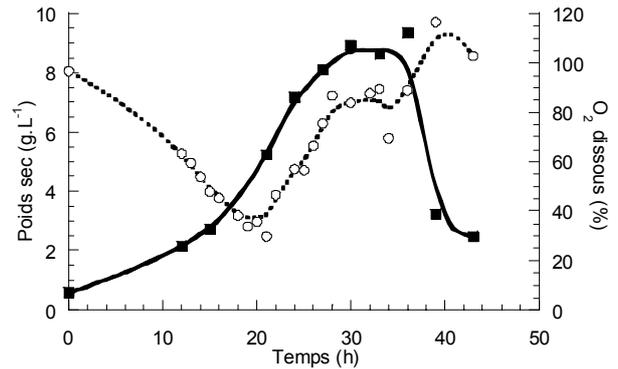


Figure 29 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en oxygène dissous (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* avec une agitation initiale de 700 rpm.

De même que lors des études en fioles d'Erlenmeyer, lorsque les fermentations en réacteurs sont conduites avec des vitesses d'agitation supérieures (700 rpm au lieu de 250), l'effet est notable sur la biomasse maximale qui passe de 4 g.L^{-1} à en moyenne 10 g.L^{-1} maximum. La teneur en oxygène dissous n'est pas descendue en dessous de 30 % et ne semble donc pas limitante. Cependant aucune production de pristinamycines n'est survenue lors des différentes cultures.

Une culture en réacteur est également menée avec une vitesse d'agitation de 900 rpm (fig.30) et une concentration double en glucose (60 g.L^{-1}) afin d'éviter l'entrée en phase de déclin, observée dès 36 h sur la culture à 700 rpm (fig. 29), qui risque de se déclencher plus précocement si les bactéries se développent plus vite.

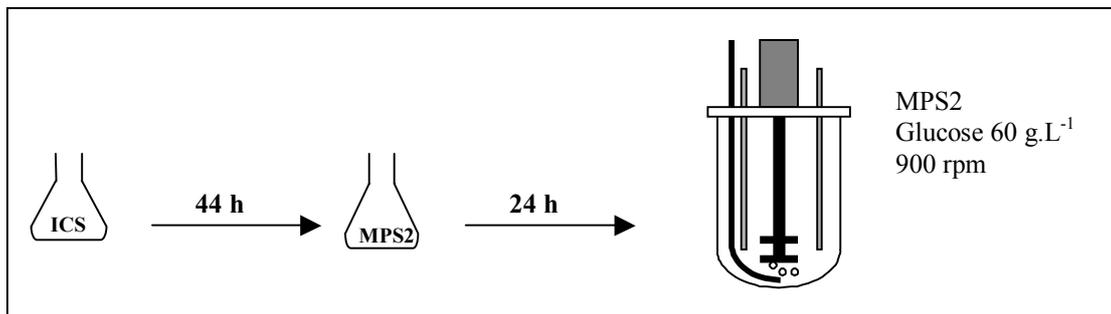


Figure 30 : Mise en culture *S. pristinaespiralis* en réacteur avec une agitation initiale de 900 rpm.

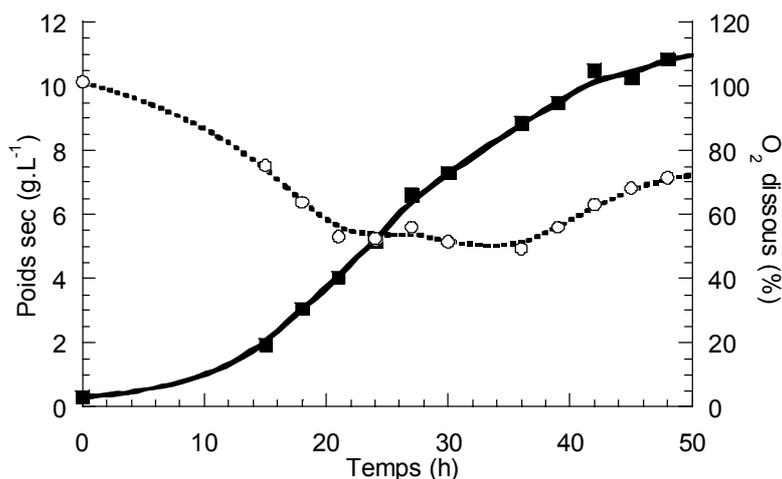


Figure 31 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en oxygène dissous (o) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* avec une agitation initiale de 900 rpm.

La biomasse maximale atteinte à 900 rpm (11 g.L⁻¹) est un peu plus importante qu'à 700 rpm (11 g.L⁻¹). La teneur en oxygène dissous n'est pas descendue en dessous de 50 %. Cependant, cette culture n'a pas non plus permis la production de pristinamycines.

III.3.4. Conclusion

Alors que l'augmentation de la concentration en biomasse lors des expériences menées en fiole d'Erlenmeyer pouvait être attribuée à une meilleure aération du milieu, les cultures en réacteur ont montré que la teneur en O₂ dissous ne semblait pas être responsable de la faible biomasse obtenue lors des cultures en réacteur avec une vitesse d'agitation de départ de 250 rpm. La relation entre la vitesse d'agitation et la production de biomasse observée en fioles d'Erlenmeyer est donc confirmée lors des cultures en réacteur en mode discontinu alors que la teneur en O₂ dissous reste toujours supérieure à 30 % de la saturation en air, quelle que soit la vitesse d'agitation.

L'agitation au moyen de pales provoque des contraintes de cisaillement au niveau des pelotes. Il semble que la vitesse d'agitation et donc les contraintes de cisaillement aient une influence sur le développement bactérien. Ohta (1995) et Tamura (1997) ont observé, chez *S. fradiae*, la formation de structures plus compactes lorsque l'agitation augmente. Ce phénomène a été observé pour *S. pristinaespiralis* lors des essais réalisés en fiole d'Erlenmeyer (tableau 11).

Chez *Penicillium chrysogenum* et *Aspergillus oryzae*, des champignons filamenteux, il a été observé que la taille des pelotes diminue lorsque la vitesse d'agitation augmente (Amanullah et al., 2000). La meilleure croissance observée en réacteur lorsque l'agitation augmente

pourrait être due à un meilleur transfert de matière, entre les pelotes et le milieu, du fait d'une plus petite taille des pelotes.

III.4. Etudes physiologiques sur une culture non productrice de pristinamycines menée en réacteur en mode discontinu avec une agitation de départ de 700 rpm

Afin d'obtenir des réacteurs dont les concentrations en biomasse soient du même ordre de grandeur que celles obtenues lors des études antérieures pour laquelle une production de pristinamycines est survenue (Corvini, 2000), la vitesse d'agitation initiale de 700 rpm est retenue pour la réalisation des cultures en réacteurs afin d'étudier la physiologie de *S. pristinaespiralis* en absence de production d'antibiotiques.

Une fiole d'Erlenmeyer chicanée contenant 50 mL de milieu ICS estensemencée avec 1 mL de stock de spores de *S. pristinaespiralis* et placée à 28°C et à 250 rpm. Après 44 h, cette préculture est utilisée pour ensemenecer du milieu MPS2 en fioles d'Erlenmeyer. Après une incubation de 24 h à 28°C sous une agitation de 250 rpm ces cultures servent à inoculer le milieu MPS2 contenu dans le réacteur Applikon de 7 L et dont l'agitation de départ est fixée à 700 rpm (fig.32).

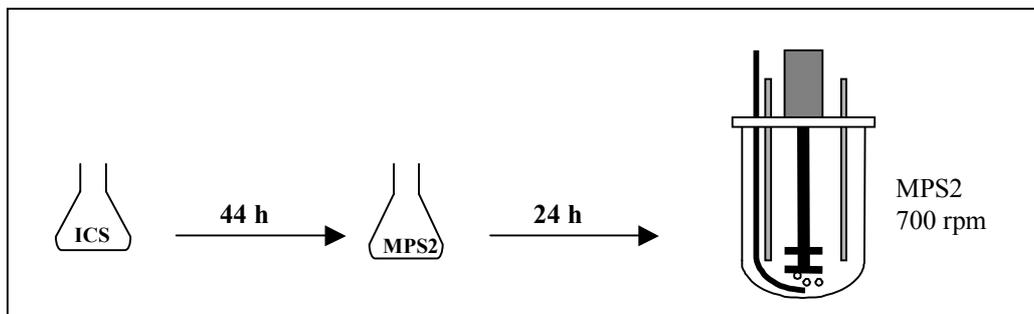


Figure 32 : Procédé de mise en culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur avec une agitation de 700 rpm pour réaliser l'étude physiologique de la souche.

Cette culture a été réalisée quatre fois dans des conditions strictement identiques. Les résultats obtenus étant très similaires, seuls les profils d'une culture caractéristique seront présentés.

III.4.1. Etudes macrocinétiques de *S. pristinaespiralis* au cours d'une culture en réacteur en mode discontinu

- Mesure de la croissance

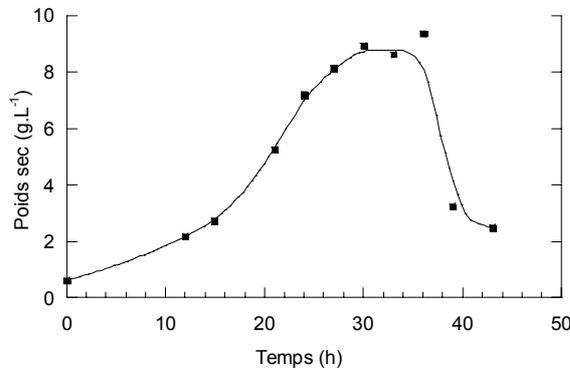


Figure 33 : Evolution de la concentration en biomasse au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

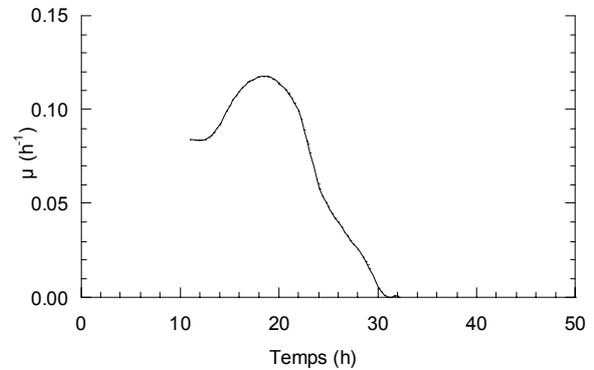


Figure 34 : Evolution de la vitesse spécifique de croissance au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

Le maximum de biomasse (9 g.L^{-1}) est atteint vers 30 h de culture et la vitesse spécifique de croissance maximale est de $0,12 \text{ h}^{-1}$ (vers 18 h). Ces valeurs sont d'un ordre de grandeur tout à fait acceptable pour cette culture et concordent avec les résultats obtenus précédemment avec le réacteur Chemap (fig. 13).

- Quantification de la consommation en glucose et en acides aminés

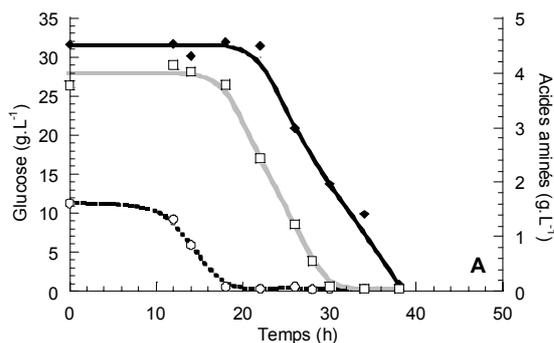


Figure 35 : Evolution de la concentration en glucose (◆), glutamate (○) et arginine (□) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

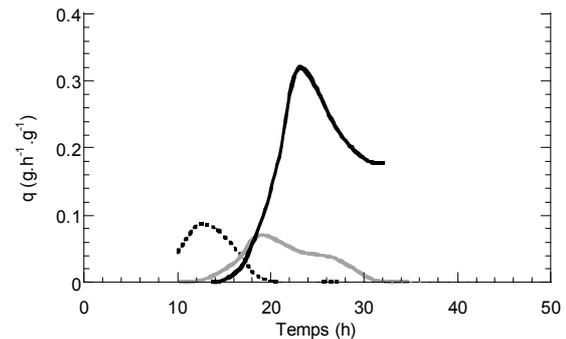


Figure 36 : Evolution de la vitesse spécifique de consommation du glucose (—) du glutamate (---) et de l'arginine (—) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

Le glucose n'est consommé qu'à partir de 18 h environ et il est presque totalement consommé à 36 h de culture. La concentration bactérienne chute d'ailleurs très brutalement entre 36 et 38 h de culture, du fait d'une limitation en substrat carboné.

La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose est de $0,32 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, après 24 h de culture. Cette valeur est 2 fois plus élevée que celle obtenue selon le protocole précédent au même temps de culture, les vitesses spécifiques maximales étant alors obtenues lors de la production des pristinamycines. Cette consommation plus élevée de glucose intervient alors que la production en biomasse n'augmente pas et qu'il n'y a pas de production de pristinamycines. Cette augmentation de la vitesse spécifique de consommation du glucose traduit une activité métabolique sensiblement différente.

Les profils des vitesses spécifiques de consommation des acides aminés et du glucose montrent une consommation séquentielle : glutamate en premier puis arginine et glucose dont la consommation démarre simultanément lorsque le glutamate devient limitant. Ce phénomène, déjà décrit chez *S. pristinaespiralis* (Corvini *et al.*, 2004) permet de penser que le glutamate est utilisé comme source de carbone, d'azote et d'énergie. Comme précédemment, l'utilisation simultanée du glucose et de l'arginine est observée.

- **Quantification de la production de pristinamycines**

Au cours des quatre fermentations réalisées selon ces paramètres il n'y a eu aucune production de pristinamycines.

- **Evolution du potentiel d'oxydoréduction et de l'oxygène dissous**

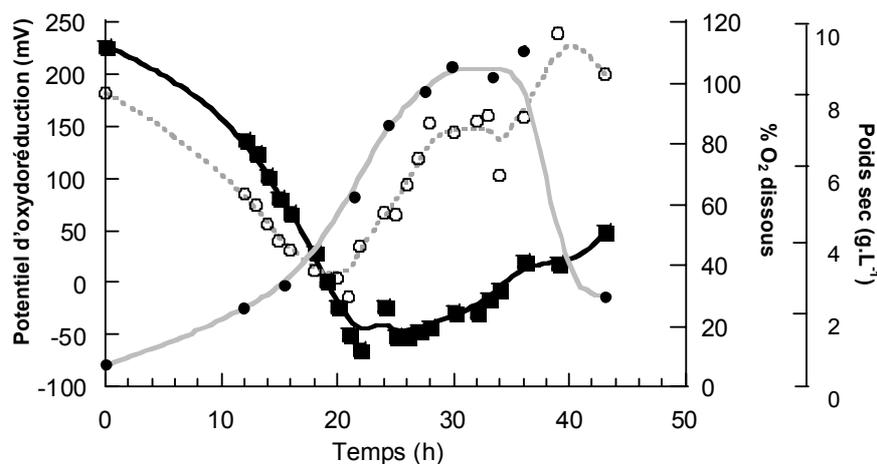


Figure 37 : Evolution de la biomasse (●), du potentiel d'oxydoréduction (■) du milieu et de la teneur en oxygène dissous (○) au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

Le potentiel d'oxydoréduction et la teneur en oxygène présentent durant les 20 premières heures une baisse de leurs valeurs respectives. Cette chute du potentiel d'oxydoréduction en début de culture est, pour partie, le reflet de la consommation d'oxygène pour l'oxydation des substrats. Néanmoins, elle n'est pas due uniquement à la baisse de pO_2 puisqu'une réduction décimale de la pO_2 se traduit par une chute de 50 mV du potentiel redox (Hitchman, 1978). Une partie de la baisse du potentiel d'oxydoréduction pourrait être attribuée aux modifications du milieu liées à la croissance bactérienne (consommation de substrats ou accumulation de produits).

- **Accumulation d'acides organiques**

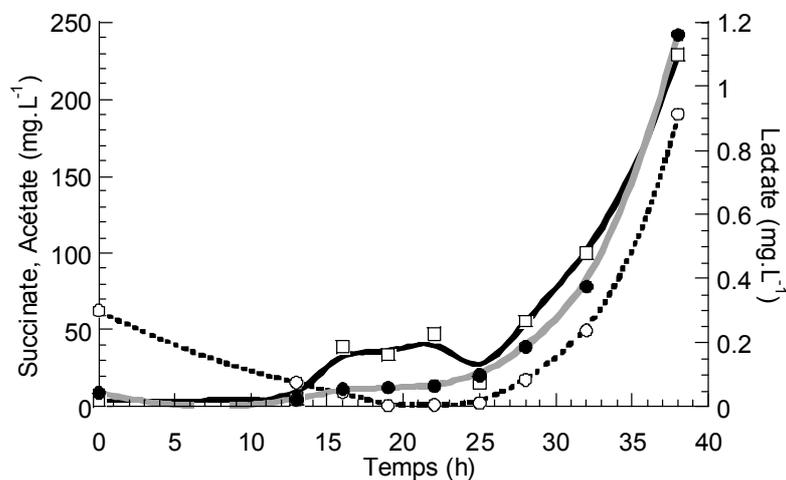


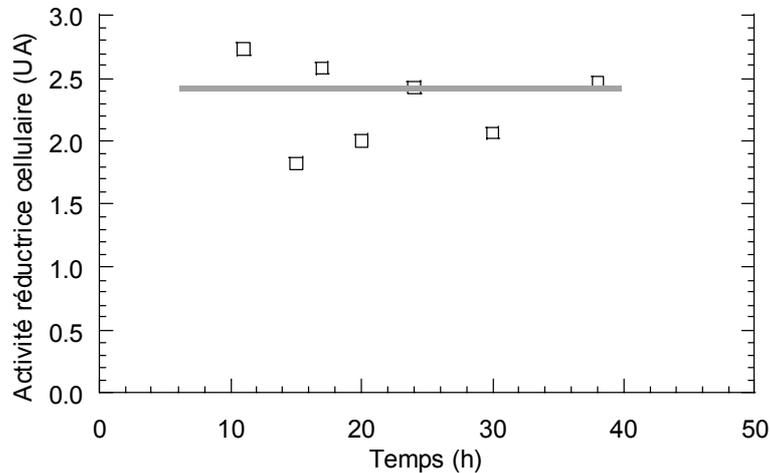
Figure 38 : Evolution des concentrations en lactate (●), acétate (○) et succinate (□) lors d'une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*.

Les acides organiques sont excrétés après 20 h de culture, les majoritaires étant le succinate et l'acétate. Les concentrations en lactate et succinate sont nettement plus faibles que celles obtenues lors de la culture de référence (jusqu'à 400 $mg.L^{-1}$ de lactate et 2500 $mg.L^{-1}$ de succinate). Lors de ces cultures, une accumulation de seulement 1,2 $mg.L^{-1}$ de lactate et 240 $mg.L^{-1}$ de succinate a été mesurée, alors que le flux glycolytique est très élevé.

En ce qui concerne l'acétate, il est consommé en début de culture, puis de nouveau accumulé dans le milieu de culture après 20 h, alors que dans les cas de la culture ayant produit des pristinamycines, l'acétate présent en faible quantité (90 $mg.L^{-1}$) était consommé au cours des dix premières heures de la culture puis n'était plus détectable (Corvini, 2000).

- **Activité réductrice globale**

L'activité réductrice globale des cellules de la culture est mesurée au cours du temps. Cette mesure d'activité rend compte de la capacité des cellules à



transporter des électrons et donc de leur capacité respiratoire.

Figure 39 : Evolution de l'activité réductrice cellulaire au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis* à 700 rpm.

Aucune variation significative de l'activité respiratoire globale n'est observée au cours de la culture. Il ne semble donc pas y avoir établissement d'un métabolisme fermentaire dû à une incapacité à respirer. Cependant, cette culture présente un métabolisme différent puisqu'elle n'a pas permis la production de pristinamycines.

Dans la culture ayant produit des pristinamycines présentée au début de ce chapitre, le lactate et le succinate étaient excrétés massivement (respectivement 0,4 et 2,5 g.L⁻¹), l'une des hypothèses pouvant justifier cette excrétion massive étant le basculement d'un métabolisme de type respiratoire à fermentaire. Ces acides sont présents ici en quantités beaucoup plus faibles (1,2 et 230 mg.L⁻¹) (fig. 38) et de plus la teneur en oxygène dissous (fig. 37) reste élevée au cours de la culture et ne semble donc pas être un facteur limitant, ce qui est en accord avec les mesures d'activité respiratoire. Cependant, la teneur en oxygène dissous est mesurée dans le milieu de culture et ne reflète peut-être pas la teneur au sein des structures de type pelote qui pourrait être inférieure en cas de limitations diffusionnelles au sein de la pelote.

- **Bilans de matière globaux au cours d'une culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur en mode discontinu**

Un bilan de recouvrement de matière est réalisé dans un but de comparaison avec celui réalisé sur la culture de référence ayant produit (chap. III.1.2). Pour réaliser ce bilan, la culture est divisée en trois phases : de 0 à 18 h lors de la phase de croissance utilisant le glutamate, de 18 à 30 h lors de la croissance utilisant l'arginine et le glucose et de 30 à 36 h lors de la phase stationnaire de croissance.

Tableau 12 : Bilan carboné et azoté entre 0 et 18 h lors de la consommation du glutamate pour une culture en réacteur à 700 rpm.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formules	Carbone mmol.L ⁻¹	Bilan C %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	0,15	0,8	C ₆ H ₁₂ O ₆	5		0	
	arginine	0,405	2,3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	14		9	
	glutamate	1,455	9,9	C ₅ H ₈ NO ₄	49		10	
	acétate	0,06	1	C ₂ H ₄ CO ₂	2			
	total				68	100	19	100
produits	biomasse	3,28	115	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	115	168	24	
	lactate	0	0	C ₃ H ₆ O ₃	0	0	0	
	succinate	0,03	0,25	C ₄ H ₆ O ₄	1	1,5	0	
	total				116	169,5	24	126

Tableau 13 : Bilan carboné et azoté entre 18 et 30 h lors de la consommation de l'arginine pour une culture en réacteur à 700 rpm.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formules	Carbone mmol.L ⁻¹	BilanC %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	17,67	98,2	C ₆ H ₁₂ O ₆	589		0	
	arginine	3,45	19,8	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	119		79	
	glutamate	0,113	0,8	C ₅ H ₈ NO ₄	4		1	
	Total				712	100	80	100
produits	biomasse	4,9	171,9	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	172	24,2	36	
	lactate	0	0	C ₃ H ₆ O ₃	0	0	0	
	succinate	0,080	0,7	C ₄ H ₆ O ₄	3	0,4	0	
	acétate	0,030	0,5	C ₂ H ₄ CO ₂	1	0,1	0	
	Total				176	24,7	36	45

Tableau 14 : Bilan carboné et azoté entre 30 et 36 h lors de la phase stationnaire de croissance pour une culture en réacteur à 700 rpm.

		g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	Formules	Carbone mmol.L ⁻¹	BilanC %	Azote mmol.L ⁻¹	Bilan N %
substrats	glucose	9,59	53,3	C ₆ H ₁₂ O ₆	320		0	
	arginine	0,16	0,9	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	5		4	
	glutamate	0,007	0	C ₅ H ₈ NO ₄	0		0	
	Total				325	100	4	100
produits	biomasse	0	0	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	0		0	
	lactate	0,001	0	C ₃ H ₆ O ₃	0,02	0,01	0	
	succinate	0,100	0,8	C ₄ H ₆ O ₄	3,4	1,04	0	
	acétate	0,095	1,6	C ₂ H ₄ CO ₂	3,2	0,97	0	
	Total				6,6	2,02	0	0

La répartition du carbone consommé dans les différents produits de la culture est représentée figure 40 pour les trois périodes définies précédemment.

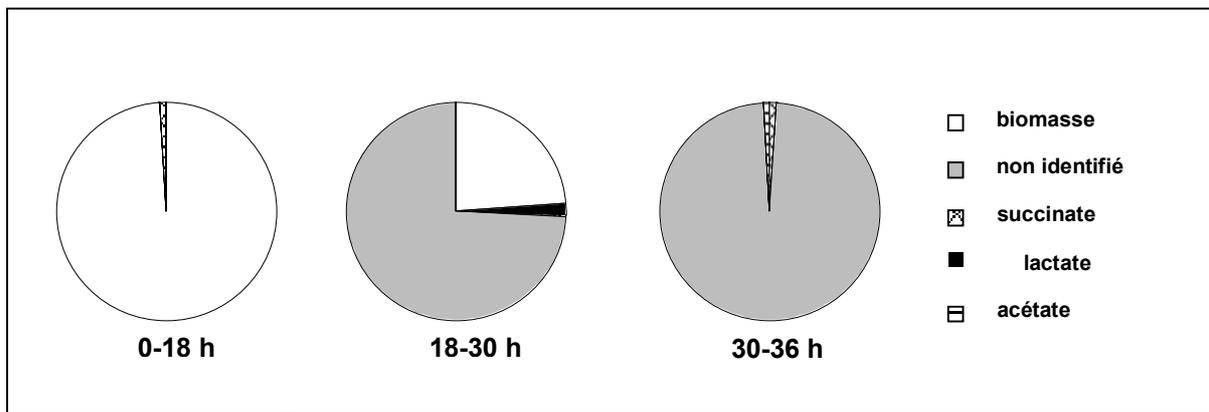


Figure 40 : répartition du carbone consommé au cours de la culture de *S. pristinaespiralis*.

0-18 h : croissance sur glutamate ; 18-30 : consommation de l'arginine et du glucose ; 30-36 : phase stationnaire de croissance.

Lors de la phase de croissance utilisant le glutamate, le carbone utilisé pour la biomasse est supérieur au carbone consommé, le recouvrement est de 168 % ce qui n'est théoriquement pas possible, de plus ce chiffre ne tient pas compte du carbone qui part sous forme de CO₂. Le recouvrement azoté semble également élevé puisqu'il est de 126 %. Le carbone provenant du glutamate n'est pas suffisant compte tenu de la biomasse formée. Comme dans le cas de la culture de référence, ces valeurs élevées pourraient être dues surtout à une surestimation de la teneur en carbone de la biomasse lors de la croissance active, ou encore à une imprécision sur la mesure du glucose.

Lors de la phase de consommation de l'arginine, le recouvrement en carbone est de 24,7 % ce qui est faible. Si on considère qu'il y a autant de moles de CO₂ produites que de moles de carbones produite par la biomasse (Voelker et Altaba 2001), le rendement en carbone atteint

49 %. Cette valeur est plus faible que lors de la culture de référence. Par conséquent, la présence d'autres éléments non identifiés qui seraient produit au cours de cette culture, tel que le glycérol, ou bien, étant donné la forte consommation en glucose, un produit issu directement de la dégradation du glucose, n'est pas exclus. Il est également possible qu'une partie du carbone et de l'azote se trouve dans le surnageant (Roubos *et al.*, 2001).

Lors de la phase stationnaire, le recouvrement en carbone est encore plus faible que lors de la culture de référence. Ce recouvrement est de 2 %. Ceci pourrait s'expliquer par une lyse cellulaire élevée au cours de cette phase..

III.4.2. Quantification des activités enzymatiques au cours des cultures de *S. pristinaespiralis* en réacteur en mode discontinu

- **Mise au point du dosage de la citrate synthase et de l'aconitase chez *S. pristinaespiralis***

Afin de compléter les études métaboliques effectuées précédemment, le dosage des activités enzymatiques citrate synthase et aconitase apparaît comme particulièrement intéressant. Une méthode de dosage de ces deux activités a dû être adaptée à la souche *S. pristinaespiralis*. L'influence des différents paramètres intervenant dans le dosage de l'activité de l'aconitase et de la citrate synthase a été testée. Dans un premier temps, la linéarité de la réponse en fonction de la quantité de protéines présentes dans l'extrait a été vérifiée. Dans un second temps, les effets des quantités des différents réactifs ont été évalués afin de choisir par la suite les concentrations optimales pour chaque dosage.

➤ Dosage de la citrate synthase

Le dosage de la citrate synthase repose sur le couplage du DTNB avec le CoASH (libéré à partir de l'acétyl-CoA lors de la synthèse enzymatique du citrate) provoquant la formation de l'ion mercaptide, détecté à 412 nm (Srere, 1969). Les substrats mis en présence de l'extrait enzymatique sont l'oxalo-acétate et l'acétyl-CoA. Les différents paramètres testés pour

adapter le dosage de l'activité de la citrate synthase ont été successivement : la linéarité de la réponse et l'absence de réaction parasite ; l'influence de la concentration en acétyl-CoA et en oxalo-acétate ; la reproductibilité du dosage et la stabilité de l'enzyme au cours du temps, en vue d'un stockage permettant de différer éventuellement le dosage de l'activité enzymatique.

Influence du volume d'extrait

Afin de vérifier si la réponse est proportionnelle à la quantité de protéines présentes, l'influence du volume d'extrait sur l'activité mesurée est vérifiée (fig.41).

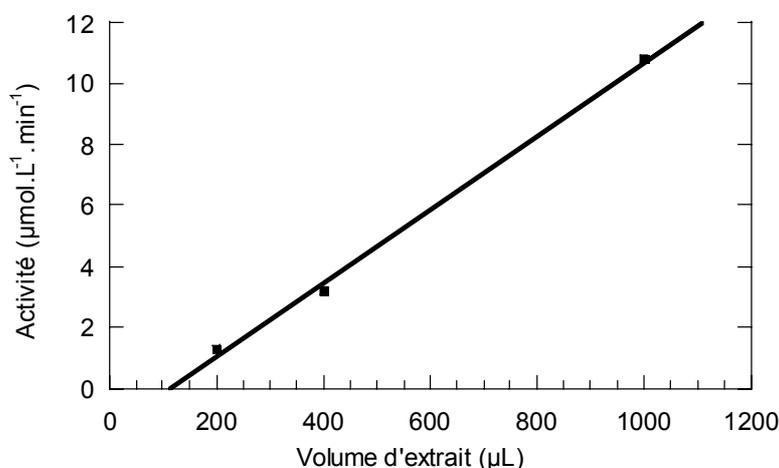


Figure 41 : Evolution de l'activité de la citrate synthase en fonction du volume d'extrait ajouté.

Les différents essais réalisés montrent que l'activité mesurée est proportionnelle au volume d'extrait et donc à la quantité de protéine présente dans le mélange réactionnel. Les dosages effectués sur des extraits dénaturés thermiquement montrent une perte totale de l'activité (résultats non présentés), indiquant qu'il n'y a pas de réactions non-enzymatiques parasites.

Influence de la concentration en acétyl-CoA

Afin de déterminer la concentration optimale en acétyl-CoA pour réaliser le dosage, afin que la réaction ne soit pas limitée par ce substrat, l'influence de la quantité d'acétyl-CoA sur l'activité spécifique mesurée est étudiée (fig. 42).

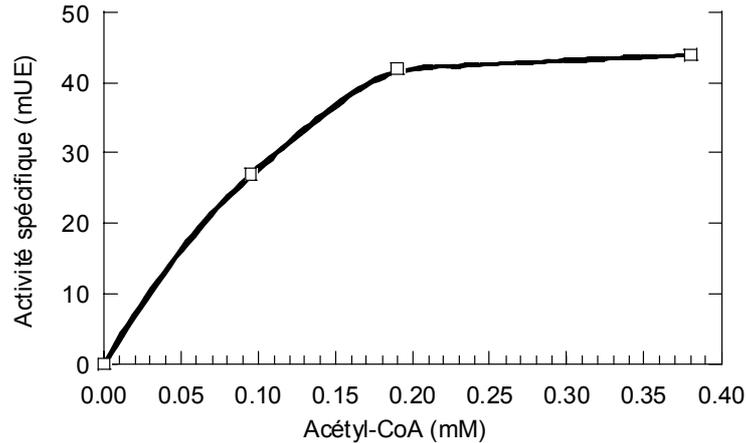


Figure 42 : Evolution de l'activité spécifique de la citrate synthase en fonction de la concentration en acétyl-CoA.

Le K_m apparent obtenu est de l'ordre de 7.10^{-5} M. Il est de l'ordre de grandeur de ceux déjà déterminés pour cette enzyme chez *S. coelicolor* : $3,2.10^{-5}$ M (Viollier *et al.*, 2001a) et chez *S. hygroscopicus* SF-129 : 10^{-4} M (Shimotohno *et al.*, 1990). La valeur du K_m apparent obtenue, de l'ordre de grandeur de ceux déterminés chez d'autres *Streptomyces*, indique qu'il n'y a pas d'activité parasite importante dans ce dosage.

Par la suite, les dosages seront réalisés avec une concentration finale en acétyl-CoA saturante dans le mélange réactionnel égale à 0,4 mM.

Influence de la concentration en oxalo-acétate

Lorsque le pH de la solution d'oxaloacétate n'est pas ajusté, une diminution de l'activité spécifique est observée lorsque la concentration finale en oxaloacétate excède 2 mM. Cette chute de l'activité spécifique pourrait être due soit à un effet inhibiteur du substrat, soit à un effet pH (pas de vérification du pH dans cette première expérience). Une autre série de dosage est réalisée en ajustant, entre 7 et 8, le pH de la solution d'oxaloacétate (fig.43).

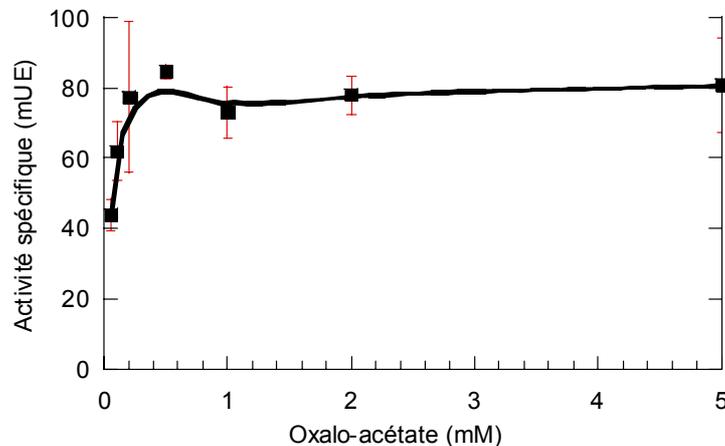


Figure 43 : Evolution de l'activité spécifique de la citrate synthase en fonction de la concentration en oxalo-acétate lorsque le pH de la solution est ajusté.

Dans ces conditions, l'enzyme ne présente plus de perte d'activité au-delà de 2 mM en oxaloacétate. La perte d'activité précédemment observée était donc liée à un effet du pH sur l'enzyme. Le K_m apparent obtenu est de l'ordre de 0,04 mM soit 4.10^{-5} M. Il est de l'ordre de ceux obtenus chez *S. coelicolor* : $1,7.10^{-5}$ M (Viollier *et al.*, 2001a) et chez *S. hygroscopicus* : $3,0.10^{-5}$ M (Shimotohno *et al.*, 1990).

Par la suite, les dosages seront réalisés avec une concentration finale saturante en oxaloacétate dans le mélange réactionnel égale à 1 mM.

Stabilité à la congélation

Afin de déterminer les meilleures conditions de stockage de l'extrait pour différer les dosages, la stabilité de l'échantillon à -80 °C avant et après la sonication est mesurée (fig. 44).

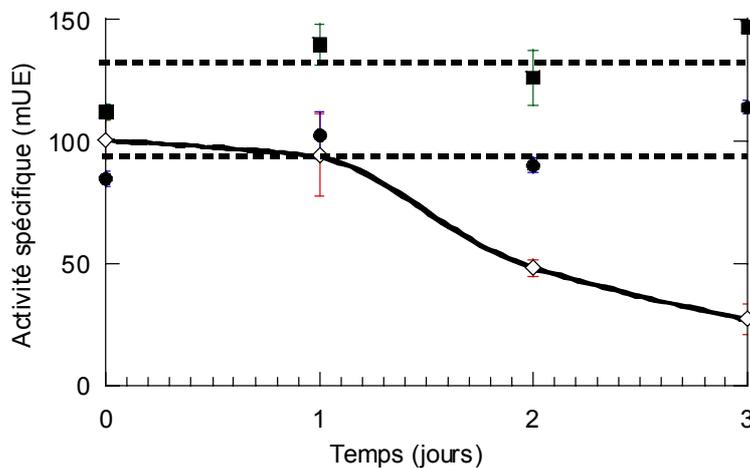


Figure 44 : Stabilité de la citrate synthase à la congélation.

(◇) congélation avant sonication, (■) et (●) congélation des extraits après sonication.

Les échantillons congelés après extraction montrent une bonne stabilité à la congélation, au cours du temps. A l'inverse, les échantillons congelés dans le tampon de sonication avant l'extraction et extraits au fur et à mesure des dosages montrent une chute, donc une perte, de l'activité spécifique. Par la suite, dans la mesure où les dosages ne peuvent être effectués immédiatement, les échantillons subiront l'étape d'extraction avant d'être congelés en attendant d'être analysés.

Reproductibilité

La culture est répartie en 3 fractions A, B et C. Chacune des fractions est ensuite traitée afin d'obtenir un extrait acellulaire. Après la dernière centrifugation, les extraits collectés sont rassemblés de façon à obtenir 3 extraits (1, 2 et 3) pour la fraction A et un extrait pour B et C.

Sur chaque extrait, le dosage enzymatique est réalisé 3 fois. Les valeurs moyennes sont présentées dans le tableau 15.

La première partie du tableau présente les résultats pour chaque extrait A, B ou C, à partir de 3 mesures effectuées et la dernière partie présente la valeur obtenue pour la totalité de la culture à partir de tous les dosages effectués.

Tableau 15 : Répétitivité des dosages de la citrate synthase et intervalles de confiance.

Essai	A-1	A-2	A-3	B	C
AS en mUE	118	104	79	85	112
écart type	6,4	5,3	5,1	2,5	3,0
intervalle de confiance à 90 %	5,3	5,1	4,8	2,4	2,8
AS moyenne générale en mUE	101				
écart type général	16,3				
intervalle de général à 90 %	6,7				
intervalle de confiance à 95 %	8,0				

AS : activité spécifique. Les écarts types et les intervalles de confiances sont exprimés en mUE.

La comparaison de A1, A2 et A3 permet de déterminer l'effet du dosage sur la mesure de l'activité spécifique. La comparaison avec B et C permet de quantifier l'effet du traitement des échantillons sur la mesure de l'activité. Etant donnée la faible valeur de l'intervalle de confiance obtenu avec chaque série, ce dosage présente une bonne fiabilité.

➤ Dosage de l'aconitase

Le dosage de l'aconitase repose sur l'apparition du NADPH provenant de l'activité de l'IDH qui est couplée à celle de l'aconitase. Les substrats mis en présence de l'extrait enzymatique sont le cis-aconitate, le NADP et l'isocitrate déshydrogénase. Les différents paramètres à tester pour adapter le dosage de l'activité de l'aconitase ont été successivement : la linéarité de la réponse et la présence de réactions parasites ; l'influence de la concentration en cis-aconitate, en NADP ; la reproductibilité du dosage et enfin la stabilité de l'enzyme au cours du temps, en vue d'un stockage permettant le dosage différé de l'activité enzymatique.

Influence de la quantité de protéines présentes sur l'activité aconitase mesurée

La mesure d'activité de l'aconitase est réalisée avec différents volumes d'extrait acellulaire afin de déterminer si la réponse est bien proportionnelle à la quantité de protéines présentes (fig.45).

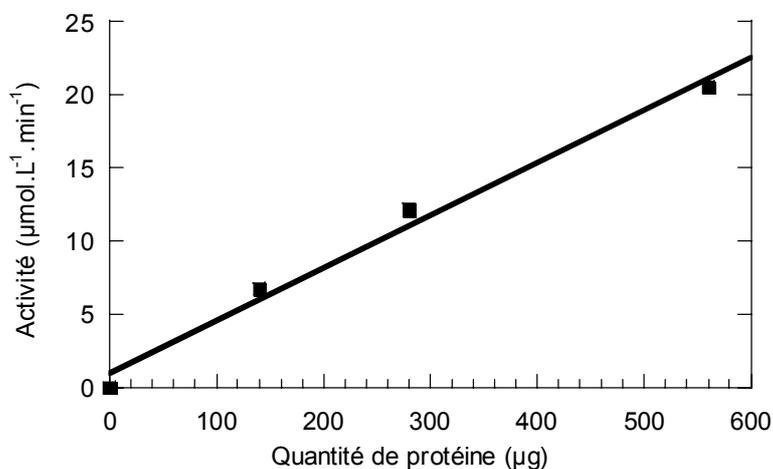


Figure 45 : Evolution de l'activité aconitase en fonction de la quantité de protéines présentes dans le milieu de dosage.

Les différents essais réalisés montrent que l'activité mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le mélange réactionnel. D'autre part, les dosages effectués sur des extraits dénaturés (traitement thermique) montrent une perte totale de l'activité.

Consommation de NADPH

Le dosage reposant sur la mesure de l'apparition de NADPH il convient de vérifier si ce dernier est consommé dans le milieu réactionnel. Le mélange réactionnel a donc été réalisé en présence de tous les constituants à l'exception du NADP. Du NADPH a été ajouté dans le mélange et l'absorbance a été suivie à 340 nm. Les différents essais réalisés ont montré que le NADPH n'était pas consommé par le mélange.

Influence de la concentration en cis-aconitate sur l'activité aconitase

Le dosage de l'activité de l'aconitase a été réalisé avec différentes concentrations de cis-aconitate afin de déterminer la concentration optimale à utiliser pour le dosage (fig.46).

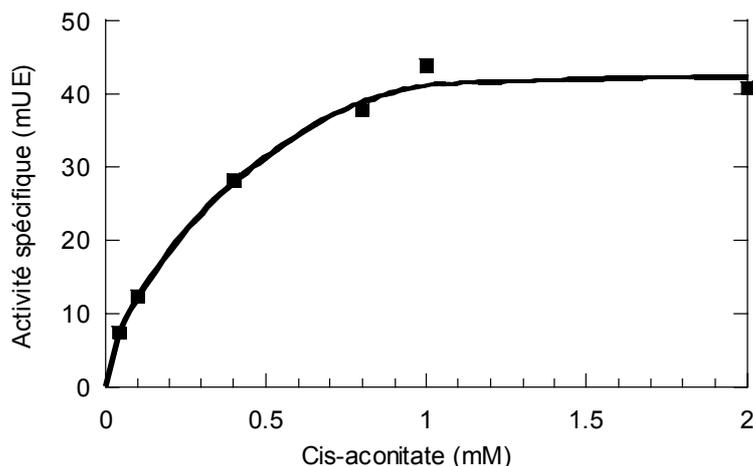


Figure 46 : Evolution de l'activité spécifique de l'aconitase en fonction de la concentration en cis-aconitate.

Le K_m apparent obtenu est de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les dosages seront réalisés avec une concentration finale saturante dans le mélange réactionnel en cis-aconitate égale à 2 mM de façon à ce que la réaction se fasse toujours à une vitesse maximale.

Influence de la concentration en NADP sur l'activité aconitase

Afin de déterminer la concentration optimale de NADP à utiliser pour le dosage de l'aconitase, différentes concentrations son testées. (fig.47)

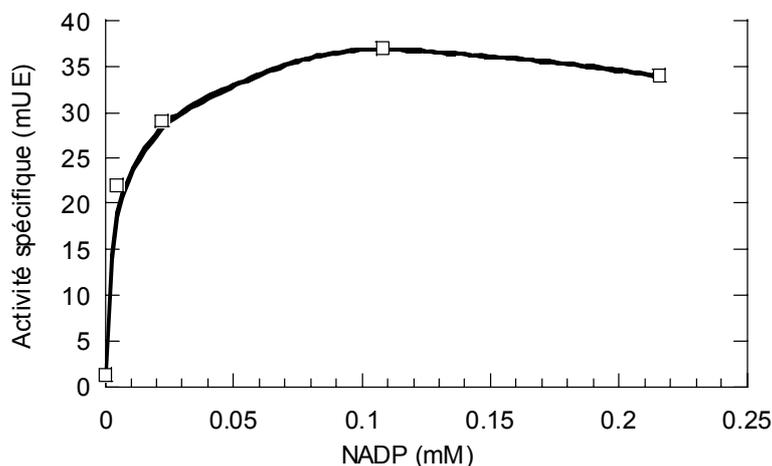


Fig. 47 : Evolution de l'activité spécifique de l'aconitase en fonction de la concentration en NADP.

Le K_m apparent obtenu est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$ M. Les dosages ultérieurs seront réalisés avec une concentration finale dans le mélange réactionnel en NADP égale à 0,2 mM, soit 10 fois le K_m apparent de façon à opérer à la vitesse maximale.

Influence de la congélation sur l'activité aconitase (fig.48)

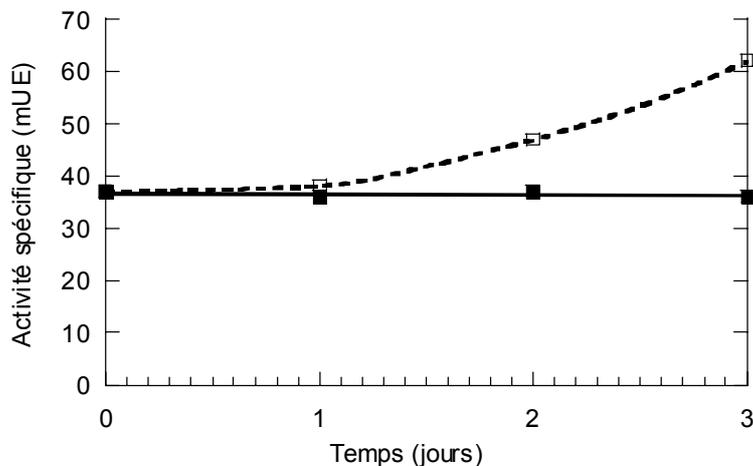


Figure 48 : Stabilité de l'activité aconitase à la congélation au cours du temps.

(□) congélation avant sonication, (■) congélation des extraits après sonication.

Les échantillons congelés après extraction par sonication montrent une très bonne stabilité à la congélation. A l'inverse, lorsque les échantillons sont congelés avant l'extraction, dans le tampon de sonication, et que l'extraction est réalisée au fur et à mesure des dosages, l'activité spécifique augmente au cours du temps. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la destruction d'inhibiteurs de cette enzyme. Par la suite, si les dosages ne peuvent être effectués immédiatement, les échantillons subiront l'étape d'extraction puis seront congelés en attendant d'être analysés.

Reproductibilité du dosage de l'aconitase

Une culture est répartie en 3 fractions A, B et C. Chacune des fractions est ensuite traitée afin d'obtenir l'extrait cellulaire. Après la dernière centrifugation, les extraits collectés sont rassemblés de façon à obtenir 3 extraits (1, 2 et 3) pour chaque fraction. Sur chaque extrait le dosage enzymatique est réalisé 3 fois. Les valeurs moyennes sont présentées dans le tableau 16. La seconde partie du tableau présente les résultats pour chaque fraction A, B ou C, et la dernière partie présente la valeur obtenue pour la totalité de la culture à partir de tous les dosages effectués.

Tableau 16 : Reproductibilité des dosages de l'aconitase et intervalles de confiance.

Essai	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2
AS en mUE	13,2	12,7	13,7	9,9	11,5	12,2	15,7	17,8
écart type	0,3	0,5	0,7	0,4	0,6	0,3	0,6	0,7
intervalle de confiance à 90 %	0,3	0,5	0,7	0,4	0,6	0,3	0,6	0,7
AS en mUE obtenue par fraction		13,1			11,2		16,8	
écart type général		0,7			1,1		1,3	
intervalle de général à 90 %		0,4			0,6		0,9	
intervalle de confiance à 95 %		0,4			0,7		1	
AS moyenne totale en mUE					13,3			
écart type					2,4			
intervalle de confiance à 90 %					0,8			
intervalle de confiance à 95 %					1			

AS : activité spécifique. Les écarts types et les intervalles de confiances sont exprimés en mUE.

Malgré la faible valeur d'activité spécifique obtenue lors de ce dosage, les intervalles de confiance de ces résultats montrent une bonne reproductibilité.

- **Effet du pH sur les activités aconitase et citrate synthase**

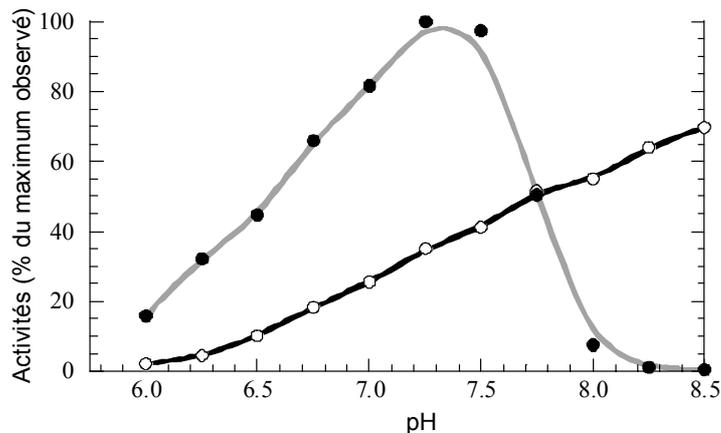


Figure 49 : Effet du pH sur les activités enzymatiques de l'aconitase (○) et de la citrate synthase(●).

La citrate synthase présente une activité optimale lorsque la valeur du pH est de 7,25. L'effet du pH est très différent pour l'aconitase. Au cours de la culture de référence, le pH intracellulaire variait de 6,4 à 8,5 (fig. 18). Ainsi les activités de ces deux enzymes pourront être affectées très différemment par les variations du pH intracellulaire.

Conclusions

Les différents paramètres pour le dosage de l'aconitase et de la citrate synthase ont pu être adaptés et optimisés pour réaliser la mesure de ces activités enzymatiques chez *S.*

pristinaespiralis. Ces méthodes ont par la suite été appliquées à des échantillons issus de cultures en réacteur.

- **Evolution des activités enzymatiques intracellulaires au cours d'une culture sans production**

Au cours des cultures en réacteur Applikon de 7 L, les activités spécifiques des enzymes du métabolisme central précédemment dosées (tableau 6) ont été mesurées, ainsi que celles de la citrate synthase et de l'aconitase afin d'avoir une vision plus complète du cycle de Krebs (fig. 50 à 54).

Les valeurs d'activités spécifiques traitées dans cette partie résultent de dosages *in vitro* qui ne tiennent pas compte de l'environnement intracellulaire tel que le pH intracellulaire, la présence ou non d'inhibiteurs, d'inducteurs ou encore la concentration en substrat et co-facteurs. La souche présentant un métabolisme différent, le protocole de mesure du pH intracellulaire aurait nécessité une mise au point afin d'être adapté aux nouvelles conditions cellulaires lors de cette culture (métabolisme du glucose différent, pas de production de pristinamycines...).

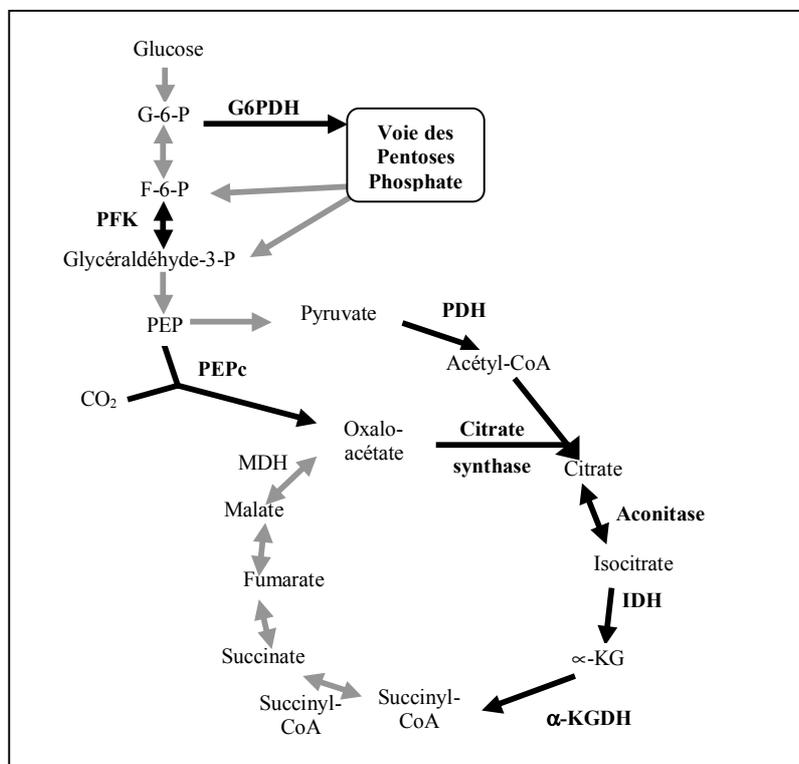


Figure 50 : Schéma du métabolisme central . Les flèches noires représentent les enzymes dont les activités spécifiques ont été mesurées.

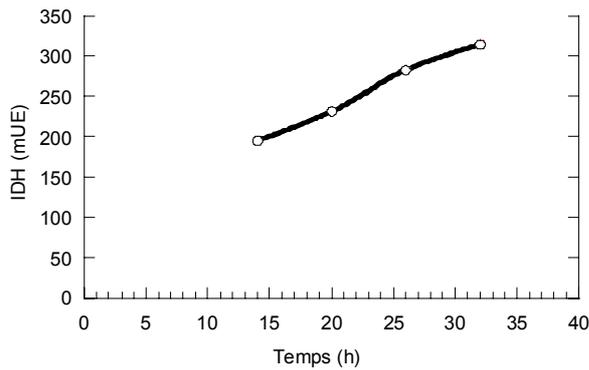


Figure 51 : Evolution de l'activité spécifique de l'isocitrate déshydrogénase lors d'une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. (○) IDH.

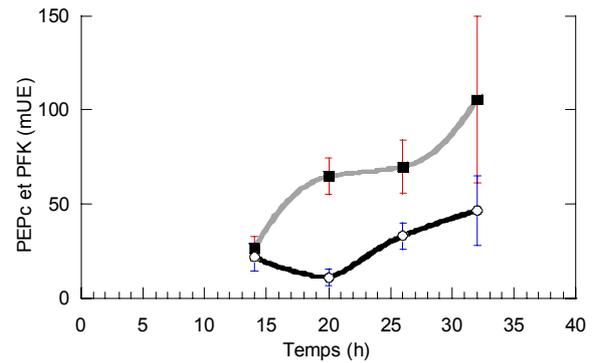


Figure 52 : Evolution des activités spécifiques de la phospho-énolpyruvate carboxylase et de la phospho-fructo-kinase lors d'une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. (■) PEPc, (○) PFK.

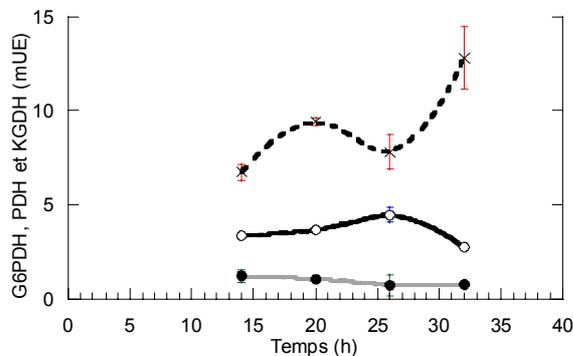


Figure 53 : Evolution des activités spécifiques de la pyruvate déshydrogénase, de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de l'α-cétoglutarate déshydrogénase lors d'une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. (×) G6PDH, (○) PDH, (●) KGDH.

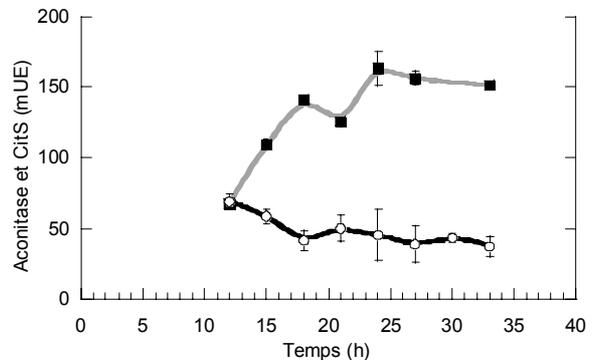


Figure 54 : Evolution des activités spécifiques de la citrate synthase et de l'aconitase lors d'une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 avec *S. pristinaespiralis*. (■) Aconitase, (○) CitS.

Toutes les valeurs des activités spécifiques mesurées sont du même ordre de grandeur que celles de la culture de référence (tableau 6), cependant les profils des activités sont différents.

L'activité de la G6PDH augmente entre 14 h et 20 h (6,7 mUE à 9,4 mUE) de culture, puis présente une légère diminution de son activité à 26 h (7,8 mUE) pour ensuite augmenter à nouveau à 32 h (12,8 mUE). Ceci suggère un maintien de la voie des pentoses phosphate active en fin de culture. Lors des cultures précédemment réalisées, son activité augmentait jusqu'à 29 h, passant de 13,7 à 19,2 mUE au début de la production des antibiotiques et diminuait ensuite à 8,6 mUE à 35 h lors de la production des pristinamycines.

La PFK présente une baisse d'activité de 22 mUE à 14 h à 11 mUE à 20 h, suivie d'une augmentation jusqu'à 46 mUE à 32 h, susceptible d'indiquer une forte activité glycolytique en fin de culture. Ce profil de variation est l'inverse de celui obtenu lors des cultures précédentes.

Les valeurs d'activité spécifique de la PEPc augmentent constamment au cours du temps, ce qui pourrait indiquer une augmentation du flux de matière entrant dans le cycle de Krebs par l'oxaloacétate.

Globalement, comme cela peut être visualisé sur la figure 55, un maintien d'une activité enzymatique importante dans la glycolyse, la voie des pentoses phosphate et la voie anaplérotique est observé tout au long de la culture.

Concernant les enzymes du cycle de Krebs, l'activité spécifique de la citrate synthase diminue légèrement au cours du temps. L'aconitase présente une activité spécifique élevée qui augmente en début de fermentation et se stabilise ensuite. Les valeurs d'activité spécifique de l'IDH augmentent constamment au cours du temps. Quant à l' α -KGDH, son activité spécifique est faible et diminue au cours du temps, cette évolution est similaire à celle observée précédemment.

Les modifications parfois brutales observées précédemment avant ou pendant la phase de production des pristinamycines ne sont pas observées au cours des cultures en Applikon pour lesquelles il n'y a pas de production d'antibiotique.

Afin de mieux visualiser les évolutions des différentes enzymes du métabolisme central, un schéma a été établi pour représenter l'évolution du métabolisme au cours du temps (fig.55).

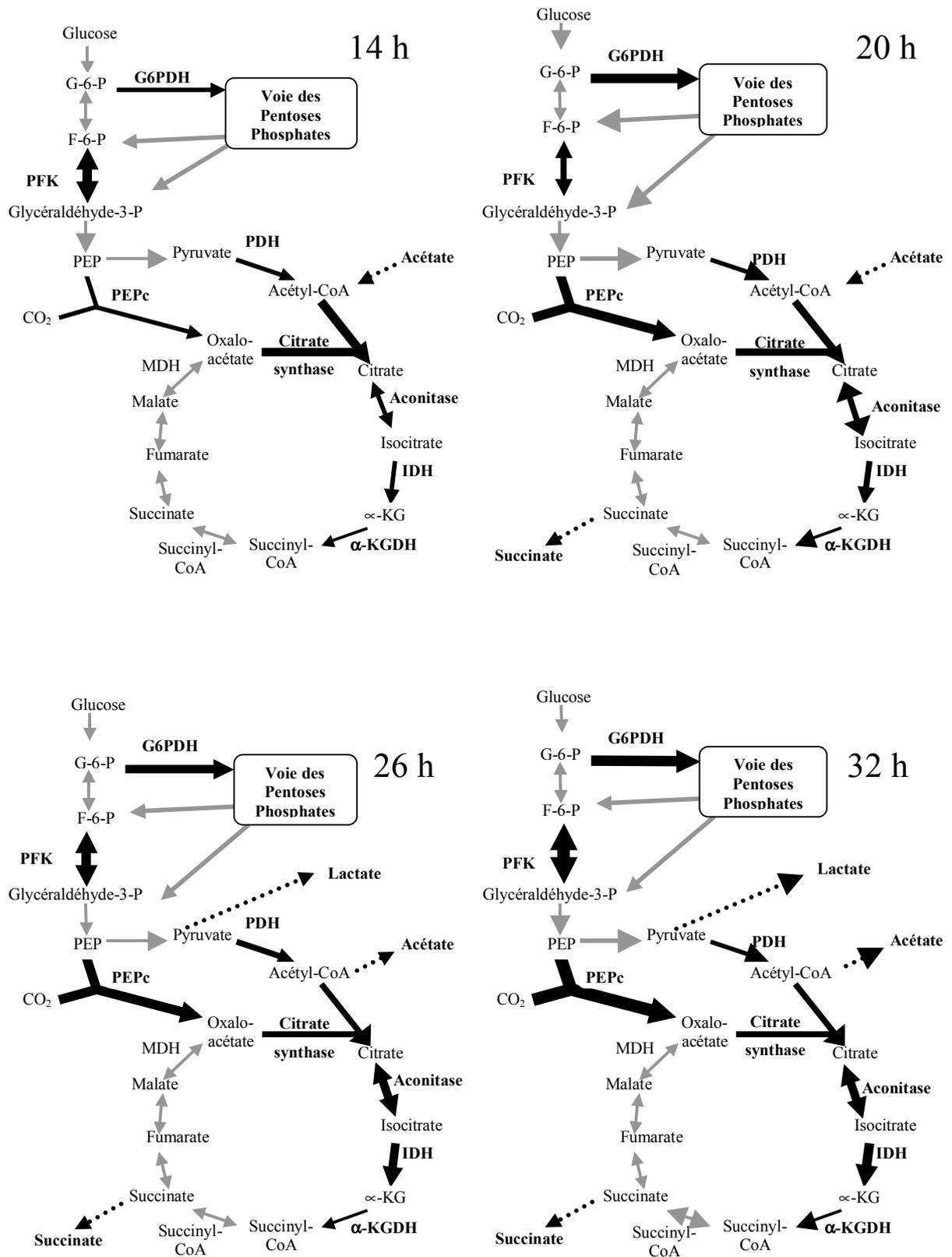


Figure 55 : Evolution des activités spécifiques dosées au cours du temps lors de la culture de *S. pristinaespiralis* sans production de pristinamycines.

Les flèches correspondant aux réactions catalysées par des enzymes dont les activités ont été mesurées sont représentées en noir. La variation de la taille de la flèche dépend des variations d'activité mesurées. Les flèches en pointillé représentent les consommations ou productions des acides organiques dosés.

Pour mieux appréhender la répartition des flux dans les différentes voies métaboliques étudiées, les rapports d'activités spécifiques de différentes enzymes ont été calculés (tableau 17).

Tableau 17 : Rapport des activités spécifiques mesurées aux différents temps.

Temps	14 h	20 h	26 h	32 h
Rapports	Rapport des activités enzymatiques mesurées			
PFK / G6PDH	3,2	1,1	4,2	3,6
PFK / PDH	6	3	7	17
PEPc / PDH	8	18	16	39
IDH / KGDH	163	222	393	419
PFK / PEPc	0,815	0,167	0,475	0,439
PEPc / CitS	0,5	1,3	1,8	2,8
PDH / CitS	0,06	0,07	0,11	0,07
CitS / Aco	0,53	0,40	0,25	0,24

Le rapport (PFK/G6PDH) représentant la répartition des flux de matière entre la voie des pentoses phosphate et la glycolyse chute de 3,2 à 14 h à 1,1 à 20 h, ce qui pourrait indiquer une augmentation du flux de matière dans la voie des pentoses phosphate. Ce rapport présente ensuite une augmentation de 1,1 à 4,2 à 26 h, ce qui pourrait indiquer une réorientation du flux de carbone dans la voie de la glycolyse, en accord avec une vitesse spécifique du consommation de glucose maximale calculée à ce moment.

L'activité de la PDH varie peu alors que l'activité de la PFK augmente après 20 h et passe de 11 à 46 (32 h) et que l'activité spécifique de la PEPc augmente.

Le rapport (PEPc/PDH) rend compte de l'alimentation du cycle de Krebs dans sa totalité. Celui-ci augmente de 8 à 18 entre 14 et 26 h, et baisse légèrement entre 20 et 26 h. Ce rapport augmente de 16 à 39 en fin de fermentation (32 h). L'augmentation de flux dans la glycolyse se traduirait donc par une augmentation d'entrée de matière dans le cycle de Krebs *via* la PEPc. La faible augmentation de l'activité PDH comparée à l'augmentation des activités de la PFK et de la PEPc pourrait indiquer une réorientation des flux de matière vers l'oxaloacétate. De plus ce phénomène pourrait être à l'origine de la consommation d'acétate observée jusqu'à 20 h, qui pourrait ainsi répondre à la demande en acétyl-CoA de la citrate synthase suite à l'entrée de l'oxaloacétate dans le cycle de Krebs.

Le rapport (PFK/PDH) chute de 6 à 3 entre 14 et 20 h, puis augmente de 3 (20 h), à 7 (26 h) puis 17 (32 h) tandis que le rapport PFK/PEPc chute de 0,82 à 0,17 entre 14 h et 20 h puis augmente à 0,47 (26 h) et semble se stabiliser (0,44 à 32 h). Malgré ces variations, ce rapport

reste tout au long de la culture inférieur à 1. Cela peut signifier que la totalité du flux de matière passant par la PFK pourrait être pris en charge par la PEPc. Ce n'est pas le cas pour la PDH. Cela laisse de nouveau penser que le flux anaplérotique pourrait être responsable de l'entrée de la majeure partie du flux de matière dans le cycle de Krebs.

Entre 14 et 20 h, le rapport PEPc/CitS augmente continuellement, passant de 0,5 (14 h) à 2,8 (32 h). La chute de l'activité spécifique de la citrate synthase au cours du temps, bien que faible, alors que l'activité de la PEPc augmente pourrait donc constituer une limitation conduisant à une accumulation de l'oxaloacétate et via un fonctionnement inverse du cycle de Krebs à la production de succinate observée dès 14 h et qui s'accroît après 26 h de culture.

Cette limitation va dans le même sens que celle due à la PDH.

Le rapport PDH/CitS passe de 0,7 (20 h) à 0,11 (26 h). Comme précédemment pour le rapport PFK/PEPc, ce rapport reste inférieur à 1 tout au long de la culture ce qui pourrait signifier que le flux pouvant passer par la citrate synthase est supérieur à la capacité de la PDH. Cette observation va à l'encontre de l'accumulation d'acétate dans le milieu de culture observé à partir de 26 h. Il faut cependant mentionner que la citrate synthase est inhibée par l'ATP chez certaines espèces bactériennes telles que *C. glutamicum* et *B. lactofermentum* (Jetten *et al.*, 1994). Or, l'intense activité glycolytique observée au cours de la culture pourrait laisser présager d'une importante synthèse d'ATP qui pourrait moduler l'activité citrate synthase et donc le rapport PDH/CitS. La citrate synthase *S. coelicolor* présente 40 % d'inhibition à 10 mM d'ATP. De même, la citrate synthase de *S. hygroscopicus* est faiblement inhibée par l'ATP, contrairement à celle de *B. subtilis* (50 % d'inhibition à 0,81 mM d'ATP) (Viollier *et al.*, 2001a).

- **Conclusions**

Les études précédentes ont montré que la production des pristinamycines a lieu au cours de la phase stationnaire de croissance (Corvini, 2000 ; Paquet, 1990). Au cours des cultures que nous avons menées, aucune production n'a pu être mesurée. La seule différence avec les cultures de Corvini (2000) ayant produit des pristinamycines semble être la vitesse de consommation très élevée du glucose ($0,32 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) dès lors que le glutamate devient limitant. Les vitesses de consommation du glucose obtenues lors des travaux précédents

étaient environ 2 fois plus faibles au moment où le glutamate devenait limitant. La vitesse spécifique de consommation du glucose présentait un premier maximum, suivi d'un minimum précédemment à la production des pristinamycines et augmentait lors de la production des pristinamycines jusqu'à des valeurs de l'ordre de $0,35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Cette augmentation de la vitesse spécifique de consommation du glucose se traduit par une baisse rapide de la concentration en glucose. Ce substrat est même complètement consommé au cours de la culture, ce qui n'était pas le cas lors de la culture de référence.

Dans la nature, la production d'antibiotiques permet à la souche de créer un milieu sélectif qui lui est favorable, permettant d'éliminer les souches susceptibles d'entrer en compétition pour la consommation des substrats présents. L'absence de production des pristinamycines s'accompagne ici d'une forte consommation du glucose. Cela pourrait s'apparenter à une stratégie alternative pour favoriser le développement du microorganisme : la souche va tenter de consommer le glucose le plus rapidement possible afin qu'il en reste le moins possible pour d'éventuels concurrents.

Au niveau du métabolisme, ce phénomène se traduit par une forte augmentation du rapport PPFK/G6PDH à 26 h ce qui peut indiquer que le flux de matière apporté par le glucose partirait davantage vers la glycolyse, préférentiellement à la voie des pentoses-phosphates.

Au cours des cultures ayant permis la production des pristinamycines, une baisse générale des activités spécifiques, à l'exception de l' α -KGDH, survenait lors de la production des pristinamycines, entre 29 et 35 h. Au cours de la culture en réacteur ayant produit une biomasse satisfaisante mais n'ayant pas permis la production de ces antibiotiques, cette diminution générale d'activité n'est pas observée. Entre 26 et 32 h, seule l'activité de la PDH présente une baisse importante, l'aconitase et la citrate synthase montrent une légère baisse de leur activité, et toutes les autres enzymes voient leur activité spécifique augmenter. Ces observations vont dans le sens du maintien d'une forte activité métabolique tout au long de la culture, ce qui est en accord avec une forte consommation en glucose (source d'énergie).

Exception faite du glucose, les autres mesures macrocinétiques réalisées donnent des résultats similaires à ceux obtenus lors du procédé ayant permis la production des pristinamycines : la production de biomasse est comparable et la séquence de consommation des substrats est similaire. A ce stade, aucune explication satisfaisante ne permet de comprendre comment un simple changement de réacteur peut induire de tels changements physiologiques.

Il est possible que l'absence de production soit liée à la préculture, soit par un effet lié à l'état physiologique de la préculture au moment du repiquage, soit par un effet dû à un élément provenant de la préculture. En effet, les cultures en fioles d'Erlenmeyerensemencées directement à partir de la préculture en milieu complexe permettent la production de pristinamycines, pour les expériences en réacteur, après la préculture en milieu complexe, une culture intermédiaire de 24 h en milieu MPS2 intervient avant l'inoculation du réacteur. Dans le but de rétablir la production d'antibiotique, nous avons donc été amenés à nous intéresser à ces différents paramètres. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

IV.1. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de pristinamycines.....	116
IV.2. Influence de l'âge de la préculture sur la production de pristinamycines.....	118
IV.2.1. Croissance de la préculture	118
IV.2.2. Influence de l'âge de la préculture sur la production de biomasse et de pristinamycines	119
• Croissance lors des précultures	119
• Influence de l'âge de la préculture sur la fréquence de production des pristinamycines en MPS2	122
• Influence de l'âge de la préculture sur la croissance et la production de pristinamycines de <i>S. pristinaespiralis</i> cultivées en MPS2	124
IV.2.3. Effet de la présence des pristinamycines dans la préculture sur la production de pristinamycines en MPS2	127
IV.2.4. Effet de la présence de milieu ICS provenant de la préculture sur la production des pristinamycines	128
IV.3. Conclusions.....	130

Afin de résoudre le problème de reproductibilité de la production des pristinamycines observé lors du chapitre précédent, des études sont menées en fioles d'Erlenmeyer sur l'influence de la composition du milieu de culture et de l'âge des cellules de la préculture sur la production des pristinamycines.

IV.1. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de pristinamycines

Différents milieux synthétiques sont testés lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer. Ces milieux diffèrent du milieu MPS2 usuellement utilisé par la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote. Ces milieux (notés M 2 à M 7) sont ensemencés à partir de précultures réalisées sur milieu ICS, âgées de 46 h.

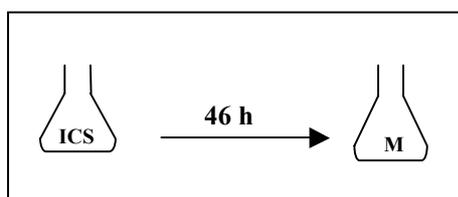


Figure 56 : Ensemencement des différents milieux synthétiques.

Tableau 18 : Récapitulatif de la composition carbonée et azotée des différents milieux et des productions moyennes obtenues en pristinamycines.

Milieu	Composition g.L ⁻¹			Nombre de répétitions	Fréquence de production	Concentrations moyennes obtenues (mg.L ⁻¹) en cas de production
MPS2	glucose 30	Arginine 3	glutamate 1,5	14	75 %	60 +/- 28
M 2	glucose 60	Arginine 3	glutamate 1,5	4	75 %	59 +/- 32
M 3	glucose 60	Arginine 1,5	glutamate 1,5	4	75 %	29 +/- 21
M 4	glucose 30	NH₄Cl 5		4	0 %	0
M 5	glucose 30	Arginine 1,5	glutamate 1,5	4	25 %	14
M 6	glucose 30	NaNO₃ 3		4	50 %	25 +/- 3
M 7	dextrines 30	Arginine 3	glutamate 1,5	4	100 %	18 +/- 10

Les concentrations moyennes sont données avec l'intervalle de confiance à 95% en mg.L⁻¹ en cas de production.

Le milieu MPS2 utilisé précédemment, ainsi que le milieu M 2 qui est deux fois plus riche en glucose ont permis la production de pristinamycines dans 3 cas sur 4, de même que le milieu M 3 qui contient également le double de glucose par rapport au milieu MPS2 et qui ne contient que la moitié d'arginine.

Le milieu M 5 contenant la moitié d'arginine comparé au milieu MPS2 n'a permis la production de pristinamycines que dans une culture sur les quatre réalisées, et le milieu M6 contenant du nitrate de sodium comme seule source d'azote a permis la production de pristinamycines dans la moitié des cultures réalisées.

Contrairement aux résultats présentés par Voelker et Altaba (2001), le milieu M 4 contenant du chlorure d'ammonium n'a pas permis la production de pristinamycines.

L'utilisation de dextrans (M 7) à la place du glucose a permis une production systématique d'antibiotique, mais cependant le niveau produit est resté faible (18 mg.L⁻¹ contre 60 mg.L⁻¹ dans le milieu MPS2). Ceci peut être dû au fait que les dextrans sont une source de carbone plus lentement assimilable et que leur utilisation permet un apport de carbone de façon lente mais continue. La même constatation avait été effectuée pour la production de spiramycine par *S. ambofaciens* (Lamsaïf, 1992). Cependant, il est à noter que l'utilisation de dextrans rend plus délicat les calculs des cinétiques de consommation de la source de carbone et d'énergie puisqu'il s'agit de sucres complexes.

Les milieux MPS2 et M 2 sont équivalents et présentent une fréquence et un niveau de production de pristinamycines similaires, le glucose n'a donc pas d'effet notable, quelle que soit la concentration, pour les deux concentrations testées. Le milieu M 3 a permis une fréquence de production identique à M 2, mais la production moyenne est divisée par deux comparée à celle obtenue avec M 2. L'unique différence entre M 2 et M 3 est la concentration en arginine qui est de 3 g.L⁻¹ pour M 2 et de 1,5 g.L⁻¹ pour M 3. Il semble que la concentration en arginine ait une influence sur la concentration finale en antibiotique puisqu'une réduction importante de la concentration en pristinamycines est observée dans le milieu M 5 (1,5 g.L⁻¹). Il est à noter que dans ce milieu, seule une culture sur quatre a produit des pristinamycines.

L'utilisation des substrats se faisant de façon séquentielle, et l'arginine servant de source d'azote lorsque le glucose est consommé, il est possible que cette plus faible concentration en arginine constitue une limitation en azote.

Ainsi, comme attendu, la composition du milieu a un effet sur la production des pristinamycines. Néanmoins, le milieu MPS2, utilisé jusqu'à présent, se révèle être un des plus intéressants en terme de fréquence de production et de concentration finale en pristinamycines. De plus, bien que les dextrans permettent une production systématique d'antibiotiques, la complexité de leur dosage ne permet pas la réalisation d'études cinétiques sur la consommation de la source carbonée.

IV.2. Influence de l'âge de la préculture sur la production de pristinamycines

Le milieu MPS2 ayant permis en fioles d'Erlenmeyer une bonne fréquence et un bon niveau de production, ce dernier ne semble pas être la cause de la non production systématique en réacteur. De façon à identifier le(s) facteur(s) responsable de la non production en réacteur, l'influence de l'état physiologique des cellules de la préculture sur les performances de la culture va être étudiée, ainsi que l'effet d'éléments pouvant provenir du milieu complexe utilisé lors de la préculture.

IV.2.1. Croissance de la préculture

Afin de connaître l'état physiologique des bactéries de la préculture réalisée avec ICS, un suivi de la croissance par mesure de l'absorbance est effectué. De cette façon, il sera possible d'avoir une relation entre le temps de préculture et la capacité de prolifération immédiate des cellules.

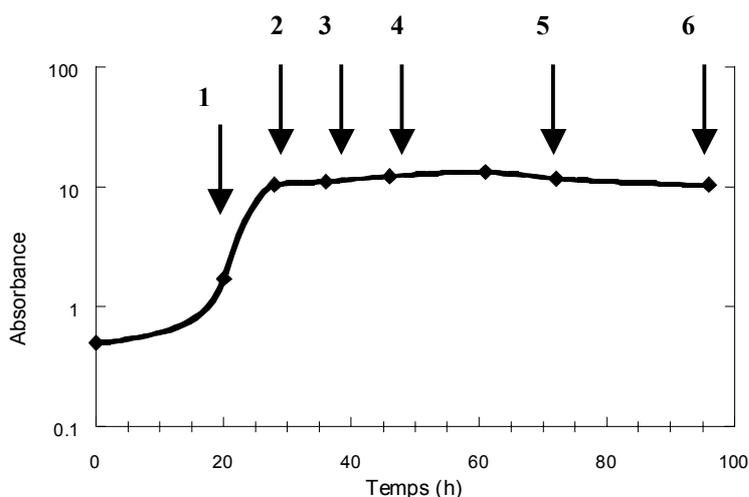


Figure 57 : Evolution de la croissance de la préculture sur milieu ICS par mesure de l'absorbance à 660 nm.

La préculture sur milieu ICS présente un profil de croissance typique : phase de latence en début de culture, suivie de la phase d'accélération qui précède la phase exponentielle (1), puis phase de ralentissement et enfin phase stationnaire (2 à 6) dès la 28^{ème} heure qui se poursuit jusqu'à la fin de la culture (96 h).

Dans le protocole employé jusqu'à présent, la préculture était âgée de 46 h, ce qui conduisait à l'utilisation de cellules en phase stationnaire.

D'après le profil de croissance obtenu en ICS, l'âge de la préculture est choisi de façon à tester différents états physiologiques :

- en début de phase exponentielle de croissance (1)
- en début de phase stationnaire (2)
- en phase stationnaire plus ou moins avancée (3-6)

L'effet de ces différents états physiologiques de la préculture sur la croissance et la production de pristinamycines lors de cultures de *S. pristinaespiralis* Pr11 en milieu MPS2 est testé.

IV.2.2. Influence de l'âge de la préculture sur la production de biomasse et de pristinamycines

Une préculture sur milieu ICS est utilisée après 20 h, 28 h, 36 h, 46 h, 72 h et 96 h de culture afin d'ensemencer deux séries de fioles d'Erlenmeyer contenant du milieu MPS2. Cette expérience est effectuée 4 fois, donc avec 4 précultures différentes sur milieu ICS (figure 58).

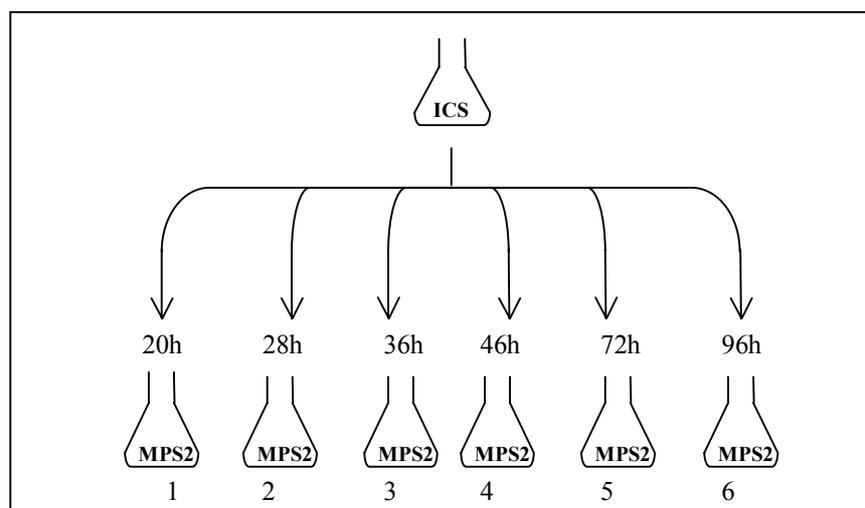


Figure 58 : Utilisation d'une même préculture à différents temps pour ensemencer le milieu MPS2.

- **Croissance lors des précultures**

Un suivi de la croissance cellulaire par mesure de l'absorbance à 660 nm (fig.57) est réalisé sur les quatre précultures.

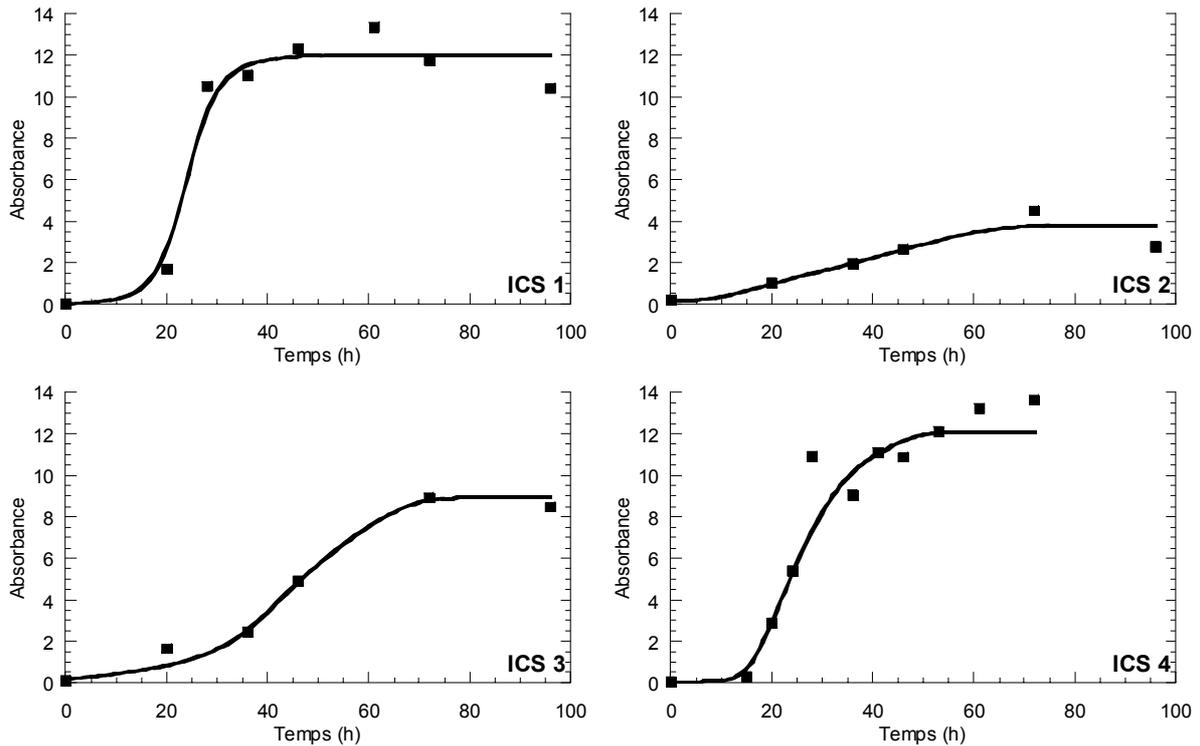


Figure 59 : Evolution de l'absorbance à 660 nm, au cours du temps pour quatre précultures de *S. pristinaespiralis* en fiole d'Erlenmeyer sur milieu ICS.

Bien que les quatre précultures aient été préparées dans des conditions strictement identiques (milieux, vaisselle, stock de spores, incubation), on note une importante hétérogénéité quant à l'évolution de la concentration en biomasse. Néanmoins, les quatre séries d'expériences menées à partir de ces quatre précultures peuvent être regroupées par deux selon le profil de la préculture. Les cellules des précultures ICS 1 et ICS 4 se trouvent bien en début de phase exponentielle à 20 h et leur absorbance maximale mesurée est de $13,5 \pm 0,2$. Pour les précultures 2 et 3 la croissance est plus lente et les absorbances maximales atteintes sont plus faibles (4,5 et 8,9 unités respectivement).

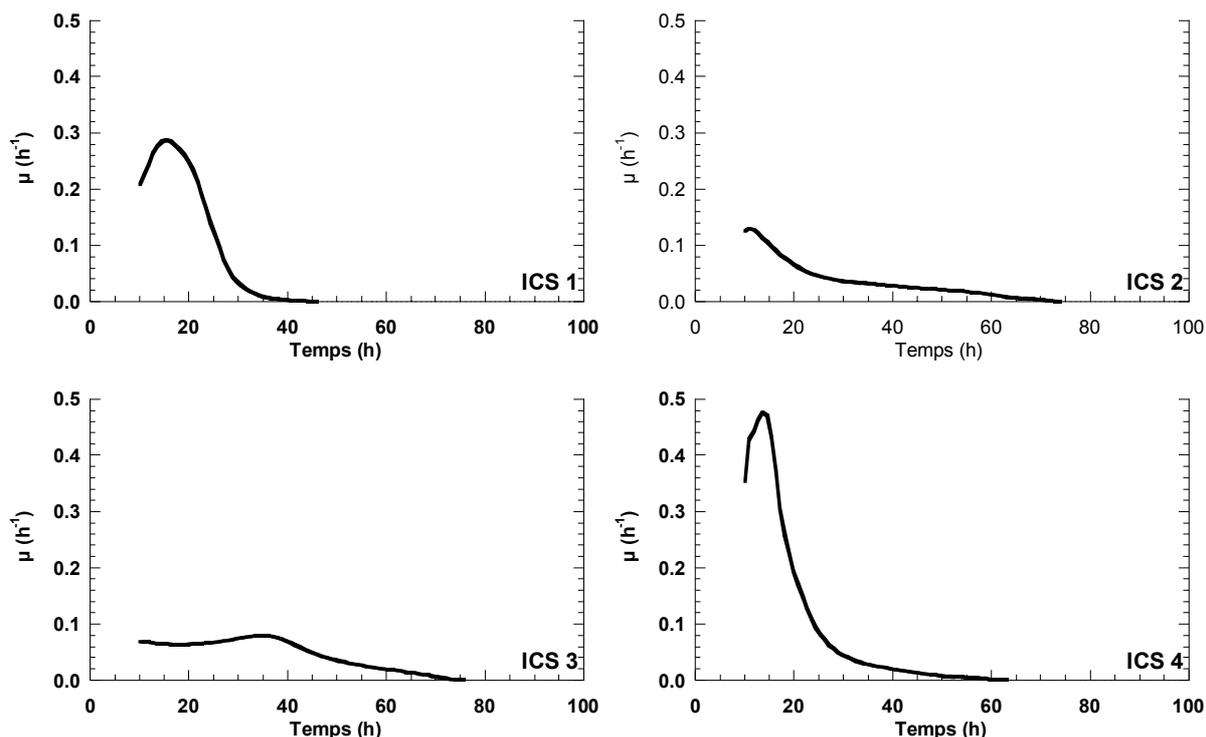


Figure 60 : Evolution des vitesses de croissance spécifiques au cours du temps pour quatre précultures de *S. pristinaespiralis* en fiole d'Erlenmeyer sur milieu ICS.

Les 2 types de population sont retrouvés à partir de l'analyse des vitesses spécifiques de croissance (fig. 60) : d'une part, les précultures ICS 1 et ICS 4 qui ont vers 15-20 h une vitesse spécifique de croissance maximale élevée $0,3 \text{ h}^{-1}$ (ICS 1) et $0,5 \text{ h}^{-1}$ (ICS 4), d'autre part, les précultures ICS 2 et ICS 3 dont les vitesses spécifiques de croissance maximales sont beaucoup plus faibles : $0,13 \text{ h}^{-1}$ (ICS 2) et $0,08 \text{ h}^{-1}$ (ICS 3). Ces résultats demeurent difficiles à expliquer car ces cultures ont été effectuées dans des conditions identiques et l'inoculation a été réalisée avec des spores provenant d'un même stock.

Dans la mesure où l'état physiologique des cellules est fortement dépendant de leur vitesse spécifique de croissance, par la suite, les expériences seront traitées selon le profil de la préculture : celles ayant une préculture "classique" (ICS 1 et ICS 4) et celles dont la préculture présente un profil "atypique" (ICS 2 et ICS 3).

• **Influence de l'âge de la préculture sur la fréquence de production des pristinamycines en MPS2**

Au sein de chacune des deux catégories de préculture sur ICS ("classique" et "atypique"), une étude, sur l'effet de l'âge de la préculture sur la fréquence de production des pristinamycines en milieu MPS2 en fonction de l'âge de la préculture, est réalisée (tableaux 19 et 20).

Tableau 19 : Fréquence de production des pristinamycines selon l'âge de la préculture et de la culture avec une croissance "classique" sur milieu ICS.

âge préculture (h)	20	28	36	46	72	96
Temps de culture (h)						
0	0/4	0/4	0/4	0/10	0/2	0/2
17	0/4	0/4	0/4	0/10	0/2	0/2
25	4/4	0/4	0/4	0/10	0/2	0/2
44	4/4	0/4	0/4	6/10	0/2	0/2
50	4/4	0/4	0/4	6/10	0/2	0/2

Parmi les cultures issues de précultures de profil "classique", deux populations permettent la production de pristinamycines : les précultures âgées de 20 h et celles âgées de 46 h. Les précultures âgées de 20 h permettent une production systématique et plus précoce (production entre 17 et 25 h) que les précultures de 46 h (démarrage de la production entre 25 et 44 h pour les six cultures ayant produit).

Tableau 20 : Fréquence de production des pristinamycines selon l'âge de la préculture et de la culture avec une préculture ayant une croissance "atypique" sur milieu ICS.

âge préculture (h)	20	28	36	46	72	96
Temps de culture (h)						
0	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
17	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
25	4/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4
44	4/4	1/4	2/4	0/4	4/4	2/4
50	4/4	1/4	2/4	0/4	4/4	3/4

Lors de l'utilisation de précultures "atypiques" les résultats sont plus hétérogènes. Ainsi, les précultures âgées de 20 h permettent, comme dans le cas des précultures classiques, une

production systématique et plus précoce des pristinamycines : deux cultures sur quatre permettent la production des pristinamycines entre 0 et 17 h et les deux autres cultures restantes entre 17 et 25 h.

Les précultures âgées de 28 h et 36 h permettent également la production des pristinamycines mais pas de manière systématique; quant aux précultures âgées de 46 h, elles ne permettent pas la production de pristinamycines.

Les précultures âgées de 72 h et 96 h permettent également la production contrairement à celles issues de précultures "classiques", le démarrage de la croissance en ICS étant plus lent, elles se trouvent en début de phase stationnaire. Cette production est plus tardive (entre 25 et 50 h) pour ces deux types de cultures, toutefois, les précultures âgée de 72 h permettent également une production systématique de pristinamycines.

Ainsi pour chaque type de préculture, deux populations permettent systématiquement la production des pristinamycines. En considérant non plus le temps pendant lequel la préculture est cultivée, mais son état physiologique, deux populations permettent la production quel que soit le type de la préculture : d'une part celles en début de phase exponentielle (20 h pour les quatre précultures) et d'autre part celles en début de phase stationnaire avec une vitesse spécifique de croissance proche de zéro (46 h pour les précultures "classiques" et 72 h pour les cultures "atypiques"). Les cellules en phase exponentielle permettent une production systématique alors que la production de pristinamycines à partir de cellules en début de phase stationnaire présente un caractère plus aléatoire.

De plus, l'utilisation d'un inoculum en phase de croissance rapide permet une production plus précoce qu'avec un inoculum plus âgé, comme c'est le cas pour *S. ambofaciens*, producteur de spiramycine (Drouin, 1996).

Afin de confirmer la relation entre la vitesse spécifique de croissance de *S. pristinaespiralis* dans la préculture au moment de son utilisation pour ensemercer le milieu MPS2 et la fréquence de production de pristinamycines un histogramme présentant la production selon la vitesse spécifique de croissance est réalisé (fig. 61).

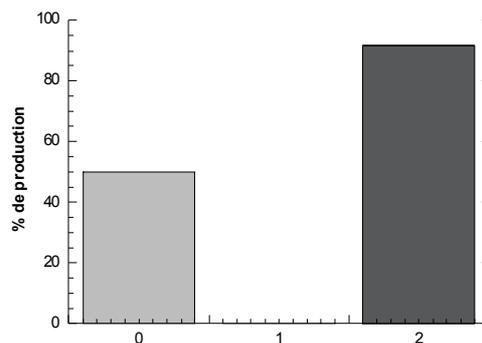


Figure 61 : Fréquence de production des cultures sur MPS2 selon la vitesse spécifique de croissance de la préculture de *S. pristinaespiralis* sur ICS lors de son utilisation pour ensemercer le milieu MPS2.

(0) : < 0,024 h⁻¹. (1) : de 0,024 à 0,055 h⁻¹. (2) : > 0,055 h⁻¹.

Il apparaît sur la figure 61 que lorsque la vitesse spécifique de croissance des cellules de la préculture lors du repiquage est comprise entre 0,024 et 0,055 h⁻¹, aucune des cultures en milieu synthétique qui en sont issues ne permet la production de pristinamycines.

- **Influence de l'âge de la préculture sur la croissance et la production de pristinamycines de *S. pristinaespiralis* cultivées en MPS2**

Les cultures en réacteur sont réalisées à partir d'une préculture âgée de 46 h. Afin de déterminer si l'âge de la préculture joue un rôle important sur le développement de la culture en milieu synthétique, quatre précultures sont réalisées (ICS 1 à 4). A différents temps, chaque préculture est utilisée pour inoculer deux fioles d'Erlenmeyer chicanées contenant du milieu MPS2 (fig.62). Sur ces cultures menées en parallèle, des mesures de biomasse sont réalisées au cours du temps et les concentrations de pristinamycines produites sont dosées.

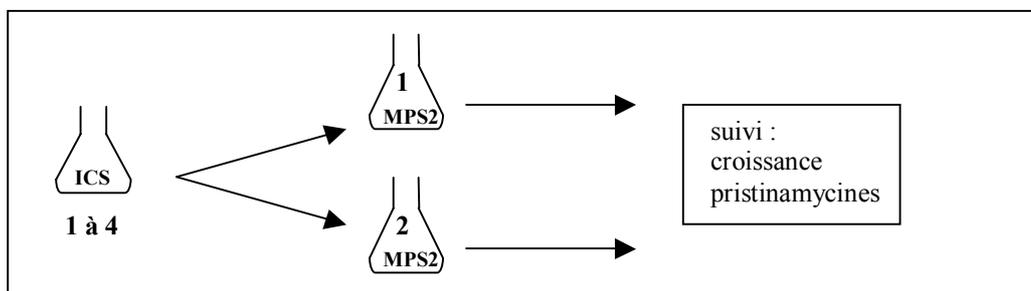


Figure 62 : Ensemencement en parallèle des fioles contenant du milieu MPS2 aux différents temps à partir des différentes précultures.

Les cultures sont présentées deux par deux, selon que la préculture présente un profil "classique" ou "atypique" (tableaux 21 et 22).

*Chapitre IV : Influence de la nature du milieu de culture
et de l'âge de la préculture sur la production des pristinamycines*

Tableau 21 : Biomasse maximale atteinte et production maximale des pristinamycines selon l'âge de la préculture obtenues avec des précultures de croissance "classique".

âge préculture (h)	20		28		36		46		72		96	
Culture	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P
1-1	8,6	19	9,4	0	10,8	0	8,4	11	10,0	0	10,4	0
1-2	8,0	20	9,8	0	10,4	0	9,0	20	9,7	0	9,8	0
4-1	9,3	14,5	11	0	10,7	0	7,8	108	-	-	-	-
4-2	9,4	19,9	9,4	0	10,2	0	7,7	103	-	-	-	-
Concentration moyenne en cas de production	18,4 /- 2,2		0		0		60,5 +/- 45		0		0	

(X : biomasse (g.L⁻¹), P : pristinamycines (mg.L⁻¹), - : essai non réalisé, (+/-) : écart type).

Le premier chiffre indique la préculture employée et le second la culture issue de cette préculture.

Les biomasses maximales atteintes sont relativement homogènes pour toutes les cultures (en moyenne 9,5+/-0,4 g.L⁻¹). Cependant, toutes ces cultures sur MPS2 ne permettent pas la production de pristinamycines. Bien que le niveau de production des pristinamycines soit homogène pour les quatre cultures issues d'un inoculum âgé de 20 h (en moyenne 18,4 +/- 2,2 mg.L⁻¹), ce n'est pas le cas pour les cultures issues de précultures âgées de 46 h (60,5 +/- 45 mg.L⁻¹ en moyenne). Pour chaque préculture, les deux cultures issues de la même préculture présentent toutefois des résultats homogènes similaires, aussi bien pour la quantité de pristinamycines produite que pour la biomasse maximale atteinte. Il semble donc que l'effet de l'âge de la préculture sur la production de pristinamycines soit plus important pour les cultures issues d'une préculture âgée de 46 h.

Les autres précultures (28 h, 36 h, 72 h et 96 h) ne permettent pas la production de pristinamycines bien que les biomasses maximales atteintes soient du même ordre de grandeur. Les précultures ayant 72 h et 96 h se trouvent en phase stationnaire tout comme les précultures âgées de 46 h, cependant elles sont plus âgées et se trouvent en état de phase stationnaire plus avancée, et bien que permettant une bonne croissance de la souche, elles ne permettent plus la production d'antibiotiques, contrairement aux précultures âgées de 46 h.

*Chapitre IV : Influence de la nature du milieu de culture
et de l'âge de la préculture sur la production des pristinamycines*

Tableau 22 : Biomasse maximale atteinte et production maximale des pristinamycines selon l'âge de la pré-culture obtenues à croissance "atypique".

âge préculture (h)	20		28		36		46		72		96	
Répétition	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P
2-1	2,2	20,8	2,7	0	2,7	0	2,6	0	2,8	23,6	1,8	18,3
2-2	1,9	14,3	3,0	0	2,6	0	2,4	0	2,3	67,6	2,0	26,4
3-1	3,1	4,3	4,3	0	3,6	3,2	3,5	0	3,2	32,6	3,2	0
3-2	3,5	19,5	4,2	1,9	3,7	21	3,8	0	2,8	30,9	3,3	2,6
Concentration moyenne en cas de production	15 +/- 6,5		1,9		12 +/- 9		0		39 +/- 17		16 +/- 10	

(X : biomasse (g.L⁻¹), P : pristinamycines (mg.L⁻¹), (+/-) écart type).

Le premier chiffre indique la préculture employée et le second la culture issue de cette préculture.

Comme dans le cas des cultures issues de précultures "classiques", les concentrations en biomasse maximales atteintes pour les cultures issues de précultures "atypiques" sont homogènes (en moyenne 3,0 +/- 0,3 g.L⁻¹), mais cependant en moyenne 3 fois plus faibles que les concentrations obtenues pour les cultures issues de précultures classiques. En dépit de cette faible concentration cellulaire, certaines cultures ont néanmoins permis la production des antibiotiques.

Les précultures âgées de 20 et 72 h, permettant systématiquement la production des pristinamycines, ainsi que les précultures âgées de 96 h, permettent d'obtenir des concentrations maximales en pristinamycines (en moyenne, respectivement, 14,7, 39 et 15,8 mg.L⁻¹) supérieures à celles obtenues avec les cultures ayant une fréquence de production plus faible.

Les différences remarquées sur les précultures ont permis de les classer en deux catégories : les précultures "classiques" et les précultures "atypiques". Prises 2 à 2 (selon la préculture), les séries de cultures qui en sont issues sont homogènes. Les cultures issues d'une préculture classique atteignent des valeurs de biomasse maximale satisfaisantes (tableau 21) alors que les autres présentent de faibles biomasses (tableau 22). Ainsi, l'état physiologique des bactéries issues la croissance de la préculture a des répercussions importantes sur la croissance de la souche lors de la culture sur MPS2.

De plus, un seul état physiologique de la préculture permet une production systématique de pristinamycines lors de la croissance sur milieu MPS2 : les précultures se trouvant en début de phase exponentielle. Celles se trouvant en début de phase stationnaire ont une fréquence de production plus aléatoire.

Ces résultats diffèrent de ceux présentés par Paquet (1990) qui obtenait en réacteur de deux litres, mais sur milieu MPS 1 contenant du xylose en plus du glucose, avec des inoculas dont les âges variaient de 24 à 42 h, une production systématique excepté à 42 h, le meilleur titre en pristinamycines étant obtenu avec un inoculum âgé de 24 h.

La préculture classique en début de phase stationnaire (46 h) permet le maximum de production de pristinamycines alors que Paquet (1990) obtenait le maximum de production avec des précultures âgées de 24 h et ce, en réacteur.

Ainsi l'état physiologique de la préculture joue un rôle prépondérant dans la variabilité de croissance observée, mais aussi dans la variabilité de production des pristinamycines. Ce phénomène pourrait être attribué à la variabilité de la germination puisque des profils de croissance en préculture identiques conduisent à des résultats similaires. Il serait donc souhaitable de déterminer la phase dans laquelle se trouvent les bactéries de la préculture par un suivi de la croissance avant chaque culture.

Pour augmenter la probabilité d'avoir une production de pristinamycines il serait donc préférable d'utiliser une préculture âgée de 20 h (tableau 21 et 22), et ce quel que soit le profil de croissance de la préculture.

En revanche, pour obtenir une production maximale, il faudrait choisir une préculture âgée de 46 h (tableau 19) issue d'une préculture de profil "classique" ; la probabilité de production n'est cependant que de 60 % dans ce cas.

IV.2.3. Effet de la présence des pristinamycines dans la préculture sur la production de pristinamycines en MPS2

Afin de déterminer si la présence de pristinamycines provenant de la préculture influence la production ultérieure sur milieu MPS2, une mise en évidence de l'activité antibiotique est réalisée par antibiogramme sur la préculture au moment du repiquage de la souche dans le milieu synthétique (tableaux 23 et 24). La présence d'antibiotiques dans les cultures issues de ces précultures est également indiquée dans ces tableaux.

*Chapitre IV : Influence de la nature du milieu de culture
et de l'âge de la préculture sur la production des pristinamycines*

Tableau 23 : Production de pristinamycines dans les précultures et dans les différentes cultures issues de précultures présentant une croissance "classique".

âge préculture (h)	0	20	28	36	46	72	96
Temps de culture (h)							
ICS 1	-	-	+	+	+	+	+
Erlen 1-1	o	+	-	-	+	-	-
Erlen 1-2	o	+	-	-	+	-	-
ICS 4	-	-	-	-	-	o	o
Erlen 4-1	o	+	-	-	+	o	o
Erlen 4-2	o	+	-	-	+	o	c

(- : absence de pristinamycines, + présence de pristinamycines, o : essai non réalisé)

Tableau 24 : Production de pristinamycines dans les précultures et dans les différentes cultures issues de précultures présentant une croissance "atypique".

âge préculture (h)	0	20	28	36	46	72	96
Temps de culture (h)							
ICS 2 et ICS 3	-	-	-	-	-	-	-
Erlen 2-1 et 2-2	o	+	-	-	-	+	+
Erlen 3-1 et 3-2	o	+	+	+	-	+	-/+

(- : absence de pristinamycines, + présence de pristinamycines, o : essai non réalisé)

Des pristinamycines sont détectées dans une seule des deux précultures "classique", la préculture ICS 1. Aucune pristinamycine n'est détectée dans les précultures "atypiques" ICS 2 et ICS 3.

Cependant, ces 4 précultures donnent lieu à des cultures permettant et ne permettant pas la production d'antibiotiques, et les profils de production des cultures issues des précultures "classiques" ICS 1 et ICS 4 sont similaires. La présence ou non de pristinamycines dans la préculture n'influe donc pas sur la production ultérieure en milieu synthétique. De plus, en dépit de cette nouvelle variabilité de la préculture, une seule des deux précultures de type "classique" a permis la production des pristinamycines ; les cultures issues des précultures "classiques" donnent des résultats homogènes.

IV.2.4. Effet de la présence de milieu ICS provenant de la préculture sur la production des pristinamycines

Afin de déterminer si certains composés du milieu ICS ou issus du métabolisme de *Streptomyces pristinaespiralis* provenant de la préculture peuvent avoir une influence sur la production de pristinamycines, des expériences en fioles d'Erlenmeyer sont menées en parallèle, avec soit un ensemencement direct (D) à partir de la préculture, soit après trois étapes de lavage (L) avant le repiquage dans le milieu synthétique MPS2 afin d'éliminer toute

trace de milieu ICS. Après 24 h de culture en MPS2, les bactéries sont prélevées pour ensemercer un nouveau milieu MPS2, sans étape de lavage, comme lors de l'ensemencement des milieux en réacteur. Cette expérience est menée à partir d'une seule préculture en ICS qui est utilisée aux différents temps pour ensemercer les milieux MPS2 (fig.63). Les absorbances à 660 nm mesurées à 20h et 46h sont de 2,2 et 10, la croissance de la préculture est donc de type classique.

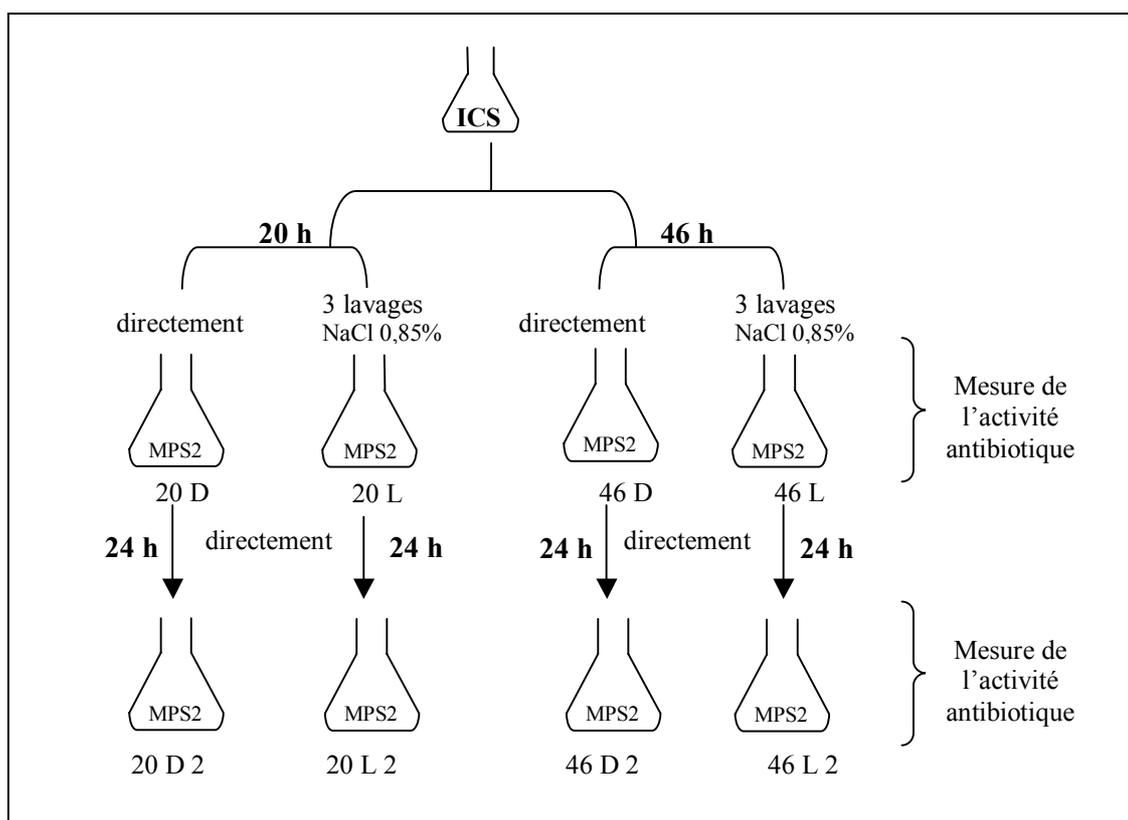


Figure 63 : Schéma récapitulatif des expériences concernant l'effet de la présence de milieu ICS dans les cultures de *S. pristinaespiralis* sur milieu MPS2 sur la production de pristinamycines.

La détection des pristinamycines est réalisée par la méthode microbiologique sur toutes les cultures et également sur la préculture au moment de son utilisation (tableau 25).

Pour les cultures sur MPS2 issues de la préculture âgée de 20h (20D et 20L) le lavage ne semble pas influencer sur le déclenchement de la production. Cependant, pour les cultures inoculées directement (20D), le maximum d'activité inhibitrice est atteint plus tôt, dès 20h (tableau 25). De même, pour les cultures sur MPS2 issues de la préculture âgée de 46h (46D et 46L) le lavage n'a pas d'effet sur l'activité qui apparaît après 20 h de culture, que les cellules aient été lavées ou non.

*Chapitre IV : Influence de la nature du milieu de culture
et de l'âge de la préculture sur la production des pristinamycines*

Tableau 25 : Production de pristinamycines mesurée par antibiogramme au cours du temps, dans les différentes cultures réalisées en milieu MPS2 et sur la préculture sur milieu ICS.

Temps de culture (h)	0	20	25	30	45	50
ICS	nd	o	nd	nd	o	nd
20D	o	20 et 20	20 et 20	20 et 20	20 et 20	18 et 18
20L	o	12 et 10	12 et 10	13 et 10	12 et 21	17 et 23
46D	o	12	12	12	12	12
46L	o	12	12	13	11	12
20D2	7	8	o	18	17	17
20L2	o	o	o	o	o	o
46D2	o	o	o	15	12	12
46L2	o	o	o	o	o	14

Les chiffres correspondent au diamètre d'inhibition de croissance de *Listeria ivanovii* en mm comprenant le puits de 5 mm. (nd : non déterminé). Les cultures 20 D et 20 L ayant été réalisées en double, les 2 valeurs mesurées sont indiquées pour chaque temps.

Pour les cultures 20D2 et 46D2, pour lesquelles la préculture initiale en ICS n'a pas été lavée avant son utilisation, un retard de la production est observé comparé aux cultures 20D et 46D : les pristinamycines sont détectées à 30 h au lieu de 20 h. L'utilisation d'une étape intermédiaire de 24 h en milieu synthétique provoque un retard dans le déclenchement de la production.

Pour les cultures 20L2 et 46L2 issues des cultures obtenues après le lavage des cellules de la préculture ICS, l'apparition de l'activité est fortement retardée comparativement aux cultures 20D2 et 46D2. Pour la culture 46L2 celle-ci intervient entre 45 et 50 h et pour la culture 46D2 aucun antibiotique n'est détecté après 50 h de culture. Il semble que l'étape de lavage entre la préculture et la première culture sur MPS2 provoque la perte d'un facteur facilitant la production.

Ces résultats pourraient être interprétés par la présence d'un composé exogène présent dans la préculture en milieu ICS que la cellule peut intégrer, qui serait perdu au cours des dilutions et qui agirait sur la production des pristinamycines même lorsqu'il est dilué.

IV.3. Conclusions

Certains des paramètres pouvant influencer sur la production des pristinamycines ont été étudiés en fioles d'Erlenmeyer chicanées. Le milieu MPS2 utilisé habituellement au laboratoire permet, comparé aux autres milieux testés, une bonne fréquence et un bon niveau de production des pristinamycines (tableau 18). Un effet certain de la préculture sur la croissance et la production de pristinamycines dû à la variabilité de croissance de la préculture a pu être démontré. Deux états physiologiques de la préculture permettant la production des

pristinamycines ont été identifiés : les précultures âgées de 20 h, en début de phase exponentielle permettant une production systématique (tableaux 19 et 20) et les précultures en début de phase stationnaire produisant des concentrations en pristinamycines en moyenne supérieures à celles produites par les précultures âgées de 20 h mais pour lesquelles la fréquence de production n'est que de 60 %. De plus, il semblerait que l'utilisation d'une préculture en phase exponentielle permette une production plus précoce des pristinamycines sur milieu MPS2.

Les études menées sur la présence de milieu ICS dans le milieu MPS2 et sur l'impact d'une étape intermédiaire de 24 h sur milieu MPS2 ont montré que le lavage des précultures âgées de 46 h avant l'ensemencement ne semble pas avoir d'effet sur la production de pristinamycines, alors que dans le cas de précultures âgées de 20 h même si le lavage ne semble pas agir sur le déclenchement de la production, le maximum d'activité est atteint plus rapidement lorsque la préculture n'est pas lavée.

Il semble enfin que l'utilisation d'une étape intermédiaire de 24 h sur milieu MPS2 entre la préculture et la culture provoque un retard plus ou moins important de la production des pristinamycines.

La présence d'un composé stable dans la préculture en milieu ICS qui agirait sur la production des pristinamycines même lorsqu'il est dilué n'est pas à exclure. Il semble que les pristinamycines ne soient pas responsables de cet effet. Il pourrait s'agir d'un inducteur de production de type autorégulateur – butyrolactone, étant donné que ces composés sont capables d'induire la production des antibiotiques en très faibles concentrations (nM).

De plus, chez *S. pristinaespiralis* NRRL2958, dans le cluster des gènes de biosynthèse des pristinamycines se trouve un gène codant pour une protéine régulant la biosynthèse des antibiotiques. La protéine SpbR, faisant partie de la famille des protéines récepteurs de γ -butyrolactones, se fixe en aval du promoteur de ce gène. Des composés de structure apparentée aux butenolides sont capables d'inhiber la formation du complexe qui se forme entre SpbR et le promoteur. Parmi les métabolites synthétisés par *S. pristinaespiralis* NRRL2958, il existe un ligand similaire aux autorégulateurs de type butyrolactone avec lequel la protéine SpbR va interagir de façon spécifique. (Folcher *et al.*, 2001).

Des travaux menés par Paquet (1990) ont montré la présence, dans le surnageant de culture de la souche Pr11, d'un composé capable de provoquer la production des pristinamycines chez une souche non productrice inductible. Cependant, des essais menés par cet auteur sur la

souche Pr11 avec une gama-butyrolactone induisant la souche non productrice n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet d'induction sur la souche Pr11.

Les conditions optimales déterminées ici, que nous qualifieront de "nouveau procédé", à savoir, permettant la meilleure fréquence de production, seront désormais utilisées pour une culture en réacteur. Il s'agit d'utiliser le milieu MPS2 et d'ensemencer le réacteur directement à partir d'une préculture sur ICS âgée de 20 h (présentant une DO entre 1 et 3 unités), ceci afin de pouvoir réaliser l'étude physiologique de la souche lors d'une culture produisant des antibiotiques.

V.1. Etudes Macrocinétiques réalisées au cours du nouveau procédé.....	135
V.1.1. Croissance et production des pristinamycines	135
V.1.2. Evolution des concentrations des sources en carbone, azote et énergie au cours du temps	137
V.1.3. Evolution de la concentration en phosphate au cours du temps	139
V.1.4. Evolution de la concentration en ions ammonium	140
V.1.5. Quantification de la concentration en acides organiques	141
V.1.6. Bilans de matière globaux au cours du procédé de production des pristinamycines en mode discontinu	142
V.1.7. Etude de l'existence d'une corrélation entre la chute du potentiel d'oxydoréduction et la production de pristinamycines	145
V.1.8. Discussion	147
V.2. Mesures microcinétiques réalisées au cours du nouveau procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu.....	152
V.2.1. Evolution du pH intracellulaire et extracellulaire au cours du procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu	152
V.2.2. Evolution des activités enzymatiques intracellulaires au cours du procédé de production des pristinamycines en réacteur discontinu	153
V.2.3. Vers une estimation des activités enzymatiques " <i>in vivo</i> "	158
V.3. Conclusions.....	161

Les travaux présentés dans cette partie sont réalisés dans un premier temps afin de vérifier si les conditions en fioles d'Erlenmeyer établies précédemment (chap. IV.) sont transposables en réacteur en mode discontinu et permettent la production des pristinamycines. Dans un second temps, ces cultures sont l'objet d'études macro et microcinétiques.

Les différents paramètres macrocinétiques étudiés sont, outre la croissance et la production des pristinamycines, l'évolution des concentrations en substrats (glucose, glutamate et arginine), en ions ammonium et phosphate et l'activité réductrice globale. De plus, une attention particulière est portée au potentiel d'oxydoréduction dont l'importance lors de la production de pristinamycines en réacteur en mode continu est apparue lors de travaux antérieurs à ce travail de thèse (Corvini, 2000).

Le suivi de l'évolution du pH intracellulaire et des activités spécifiques des enzymes précédemment dosées (chap. IV.A) sont l'objet de l'étude microcinétique.

Quatre cultures différentes (appelées A, B, C et D) sont réalisées afin d'en apprécier la reproductibilité. Ces cultures sont réalisées à partir de précultures en milieu complexe, âgées de 20 h et incorporées directement dans un réacteur Applikon de 7 L contenant le milieu MPS2 (fig.64). Au cours de ces cultures, la température au sein du réacteur est réglée à 28°C, le pH à 6,8 et le point de consigne de la teneur en oxygène fixé à 30 %. La vitesse d'agitation fixée à 700 rpm est restée constante pour l'ensemble des cultures réalisées.

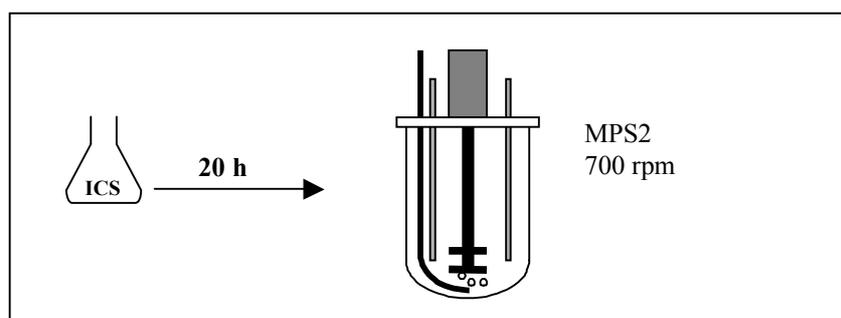


Figure 64 : Schéma du protocole expérimental pour la mise en culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur.

V.1. Etudes Macrocinétiques réalisées au cours du nouveau procédé

V.1.1. Croissance et production des pristinamycines

Les absorbances mesurées en fin des quatre précultures sont respectivement de 3,3 (A), 3,5 (B), 2,8 (C) et 1 (D). Il semble donc que les précultures soient de type "classique" (cf. chap. IV) pour les réacteurs A, B et C et de type "atypique" pour la culture D.

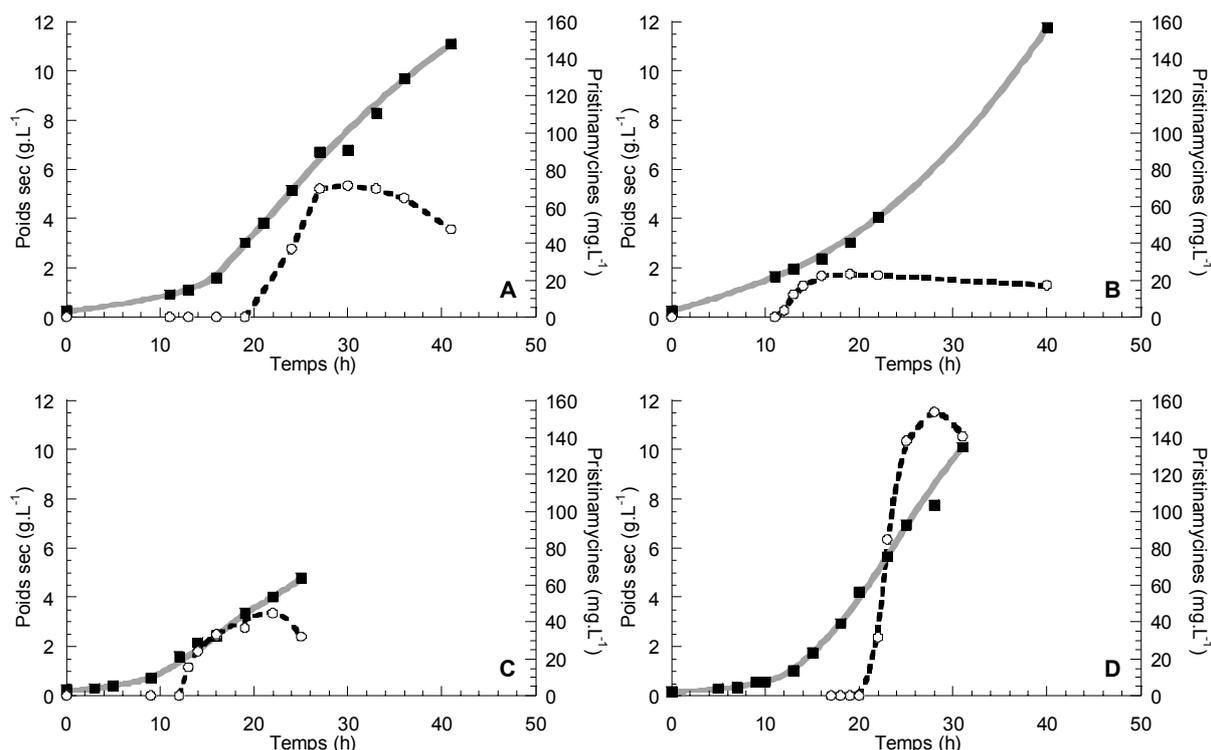


Figure 65 : Evolution de la concentration en biomasse (■) et en pristinamycines (○) au cours du temps pour 4 cultures en réacteur en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

La production de biomasse est comparable pour les différentes cultures réalisées (fig.65) : après 20 h de culture, la densité cellulaire moyenne est de $3,6 (+/- 0,2) \text{ g.L}^{-1}$.

Bien que la concentration de pristinamycines produite ne semble pas reproductible, les concentrations maximales atteintes varient de 23 mg.L^{-1} (B) à 154 mg.L^{-1} (D), le début de l'excrétion intervient dans tous les cas au cours de la phase de croissance, à 21, 12, 13 et 22 h (cultures A - D).

Les cultures peuvent être rassemblées en deux groupes : celles permettant une production plus précoce à 12 et 13 h (cultures B et C) et celles permettant une production plus tardive à 21 et 22 h (cultures A et D). Il semble qu'il y ait une certaine reproductibilité au sein de ces deux groupes, les cultures permettant une production précoce (B et C) produisant 23 et 44 mg.L^{-1}

de pristinamycines contre 71 et 154 mg.L⁻¹ pour les cultures permettant une production plus tardive (A et D). Ainsi il semble que plus le début de la production des pristinamycines est précoce, plus la concentration maximale atteinte est faible, ce qui est en accord avec les études réalisées dans le chapitre précédent. De plus il ne semble pas exister de relation entre le "type" de préculture et la cinétique de culture en réacteur : A est issue d'une préculture de type "classique" comme B et C mais présente des résultats similaires à la culture D, qui, elle, est issue d'une préculture de type "atypique".

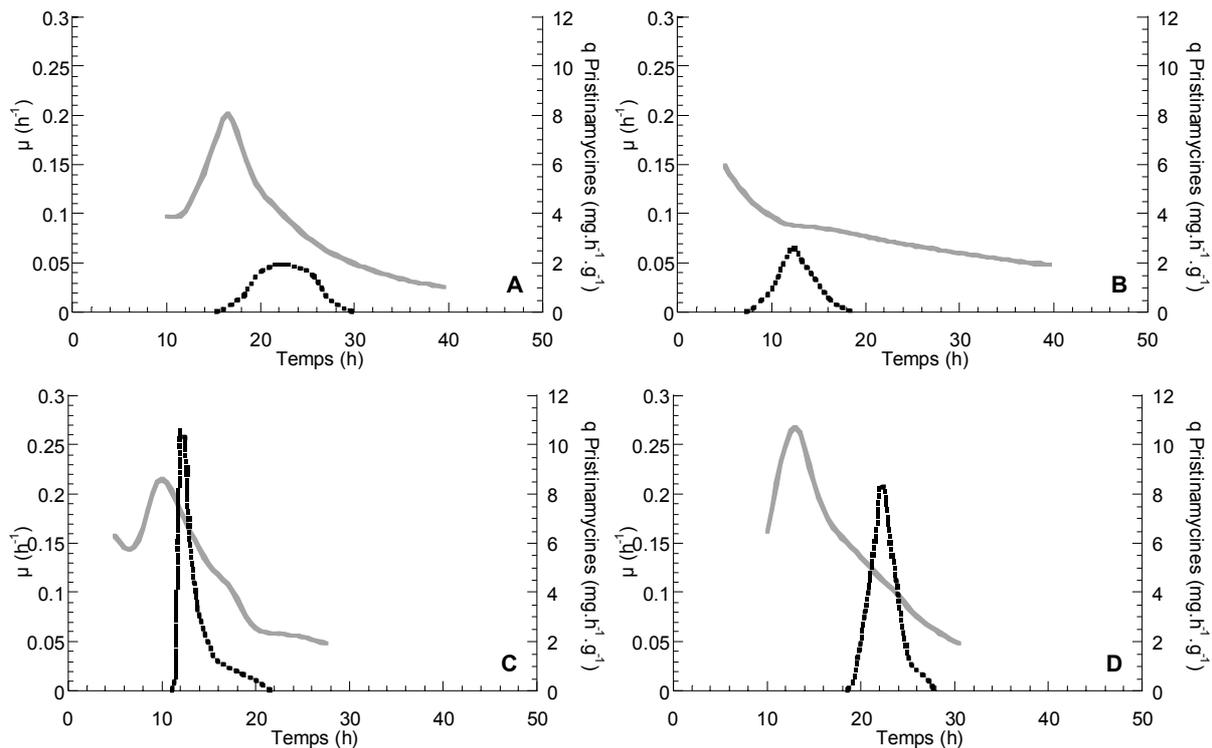


Figure 66 : Evolution des taux de croissance (—) et des vitesses spécifiques de production des pristinamycines (----) au cours du temps pour 4 cultures en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

Les vitesses spécifiques de croissance maximales sont élevées, de l'ordre de 0,2 h⁻¹ en moyenne (fig. 66). Il apparaît clairement que la production des pristinamycines débute après que les taux de croissance aient atteint leur maximum et alors que les valeurs sont encore relativement élevées : aux environs de 0,1-0,15 h⁻¹.

Les vitesses spécifiques de production maximales des pristinamycines varient entre 2 et 10 mg.h⁻¹.g⁻¹.

V.1.2. Evolution des concentrations des sources en carbone, azote et énergie au cours du temps

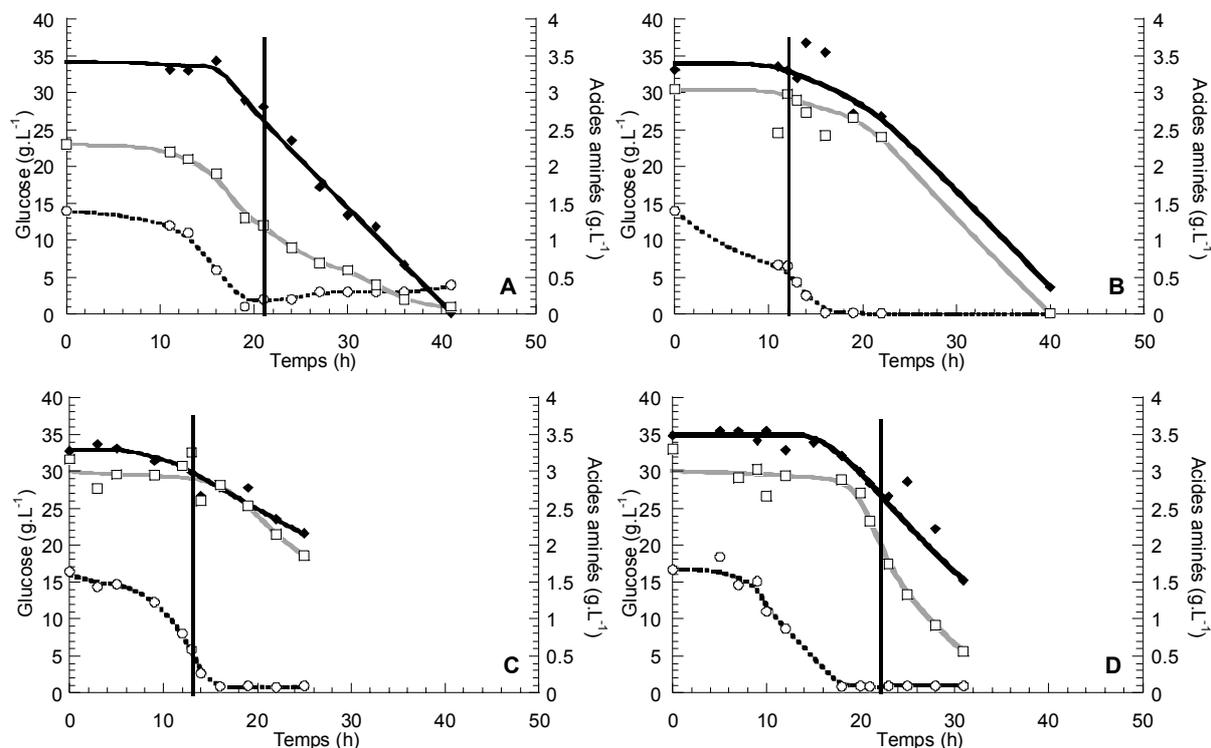


Figure 67 : Evolution de la concentration en glucose (◆), arginine (□) et glutamate (○) au cours du temps pour 4 cultures en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Pour les quatre cultures, de façon classique, le glutamate est utilisé en premier, à la fois comme source de carbone et d'azote, suivi d'une consommation simultanée de l'arginine et du glucose. Dans ces quatre cultures il reste de l'arginine dans le milieu au moment du début de la production des pristinamycines.

Comme précédemment, on retrouve les deux mêmes couples de cultures : d'une part, les cultures B et C au cours desquelles la production des pristinamycines intervient alors que le glucose et l'arginine ont été très peu consommés, et d'autre part, les cultures A et D dont la consommation en substrat est plus avancée lorsque la production d'antibiotiques a lieu (environ 10 g.L^{-1} de glucose, 1 g.L^{-1} d'arginine et la quasi totalité du glutamate ont été consommés).

Il est à noter que les concentration en pristinamycines les plus élevées sont mesurées dans les cultures où le glutamate est totalement consommé avant le début de l'excrétion des antibiotiques (cultures A et D).

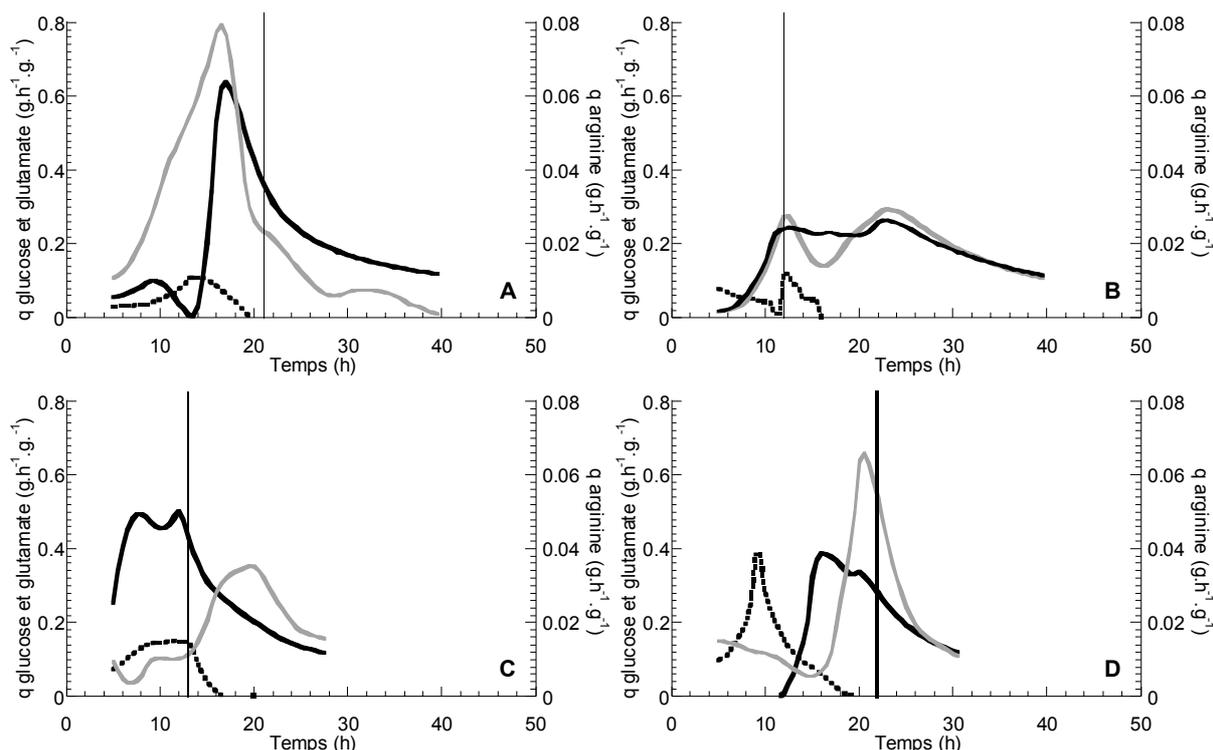


Figure 68 : Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose (—) du glutamate (---) et de l'arginine (—) au cours du temps pour 4 cultures en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Pour les cultures A et D, la production des pristinamycines intervient après épuisement du glutamate et après que les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de l'arginine aient atteint leur valeur maximale. En revanche, pour les cultures B et C, produisant de moins fortes concentrations de pristinamycines, la production a lieu alors que la vitesse spécifique de consommation du glutamate est maximale.

Pour les quatre cultures réalisées, la production des pristinamycines se déclenche sans qu'il y ait de limitations en azote ou en carbone et pendant la phase de croissance.

Les vitesses spécifiques de consommation du glucose atteignent leurs valeurs maximales rapidement, au bout de 8 à 17 h de culture. Ces vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose sont élevées, la valeur moyenne obtenue est de $0,45 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

La consommation du glucose semble se déclencher plus tardivement pour les cultures A et D, pour lesquelles une plus forte production de pristinamycines est mesurée, que pour les cultures B et C.

V.1.3. Evolution de la concentration en phosphate au cours du temps

Afin de déterminer s'il existe des limitations en phosphate au cours de la culture pouvant être responsables du déclenchement de la production des pristinamycines, ce dernier est dosé lors des quatre cultures réalisées (fig. 69).

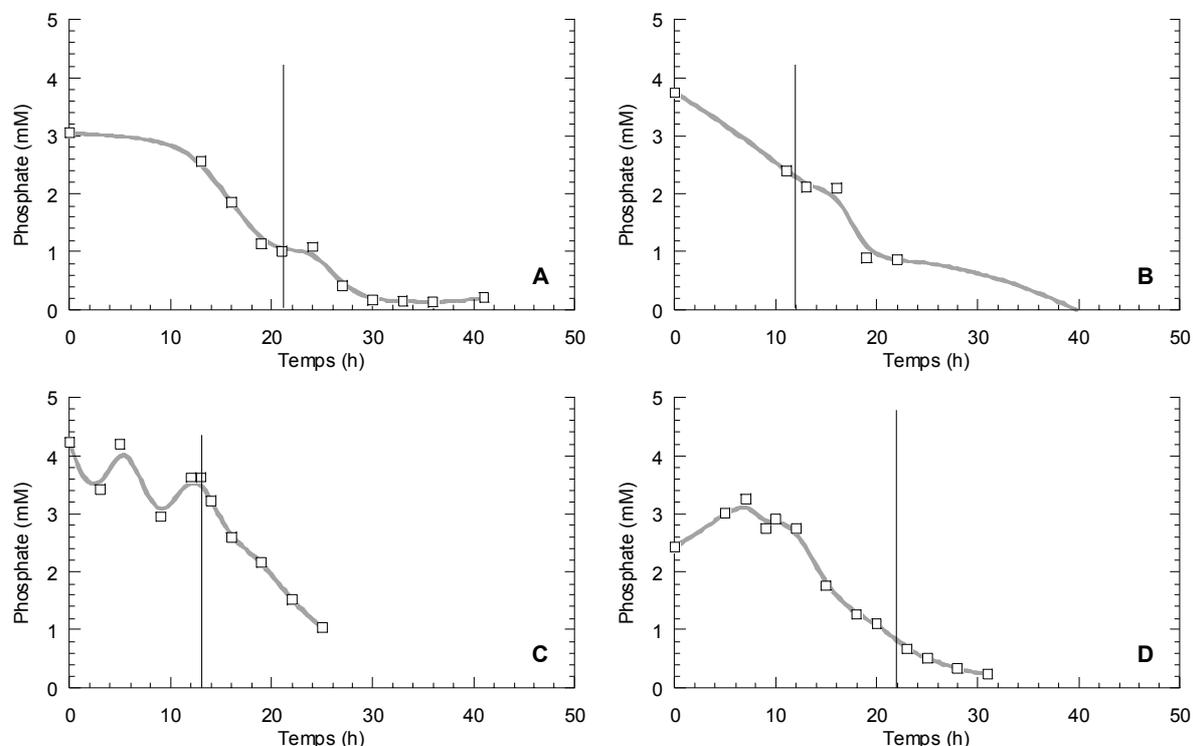


Figure 69 : Evolution de la concentration en phosphate au cours du temps pour 4 cultures réalisées en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Le phosphate est consommé tout au long des cultures. La concentration en phosphate est parfois décrite comme étant un facteur limitant la croissance lorsqu'il se trouve en quantité insuffisante (Martin, 1977; Curdova *et al.*, 1989). Son épuisement provoque l'entrée en phase stationnaire des cellules et par la suite la production de métabolites secondaires. Pour *S. pristinaespiralis*, lorsque le phosphate est épuisé, la croissance continue mais avec un taux de croissance plus faible, grâce aux "réserves" de la cellule (Voelker et Altaba, 2001).

Dans le cas des quatre cultures présentées, la concentration en phosphate ne semble pas influencer sur la production de pristinamycines : la production se déclenche à 1 (A), 2,2 (B), 3,5 (C) ou 0,8 mM (D). Néanmoins, les concentrations produites sont plus importantes lorsque la concentration en phosphate au moment du déclenchement de la production est inférieure à 1 mM.

V.1.4. Evolution de la concentration en ions ammonium

La concentration en ions ammonium peut également inhiber la production de métabolites secondaires tels que les antibiotiques (Aharonowitz *et al.*, 1980 ; Brana et Demain, 1988). Un dosage de l'ammonium a donc été réalisé sur chacune des fermentations réalisées.

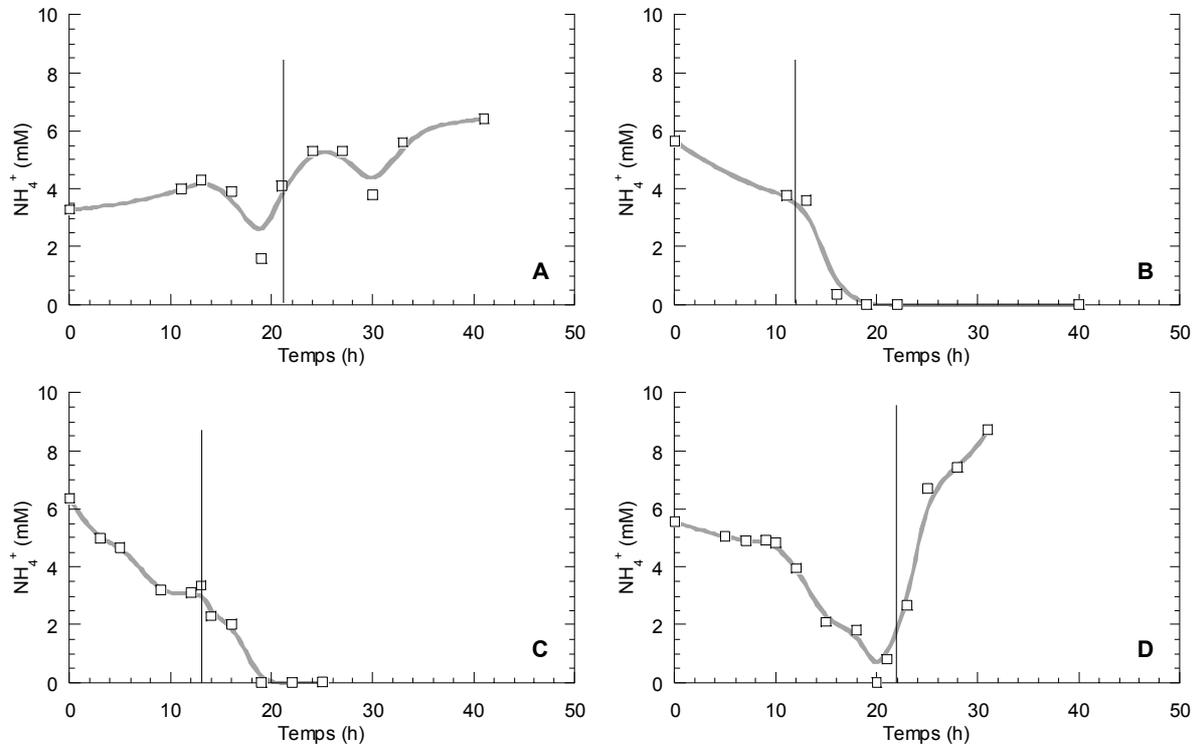


Figure 70 : Evolution de la concentration en ammonium au cours du temps pour 4 cultures réalisées en réacteur, en mode discontinu, sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

L'ammonium présent en début de culture est consommé au cours des 20 premières heures, mais pour les cultures A et D une accumulation d'ammonium est observée au-delà de ce temps. L'augmentation de la concentration en ammonium pour les cultures A et D coïncide avec l'épuisement en glutamate du milieu. Le déclenchement de la production ne semble pas être dépendant de la concentration en ions ammonium. En effet, des concentrations variables en ions ammonium (entre 2 et 4 mM) sont mesurées lorsque les pristinamycines commencent à être produites.

V.1.5. Quantification de la concentration en acides organiques

D'importantes productions de lactate et de succinate ayant été dosées lors de la culture de référence, le dosage des acides organiques est réalisé sur les cultures B et D (fig. 71).

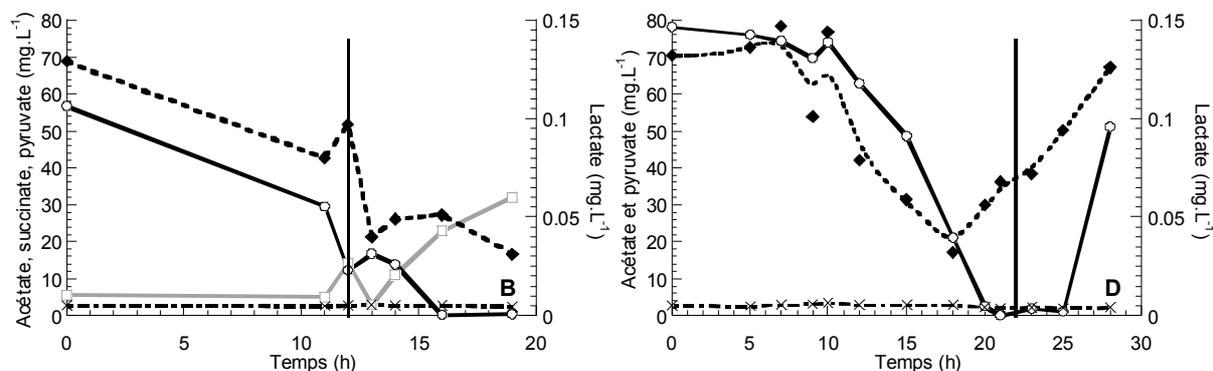


Figure 71 : Evolution des concentrations en pyruvate (x), succinate (□), lactate (♦) et acétate (○) au cours du temps pour une culture réalisée en réacteur, en mode discontinu, sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

La concentration en pyruvate dans le milieu de culture est très faible et reste stable tout au long de la fermentation (environ 2 mg.L⁻¹). L'acétate et le lactate sont présents dès le début de la culture, cependant à de faibles concentrations (respectivement 56 mg.L⁻¹ et 0,13 mg.L⁻¹). Ils proviennent de la préculture, et sont consommés au cours du temps. Pour la culture D une faible production de lactate démarre 5 h avant la production des pristinamycines, et une production d'acétate a lieu 5 h après le déclenchement de la production des pristinamycines, alors que la production de ces dernières cesse (fig. 65).

Une production de succinate a lieu peu de temps après le déclenchement de la production des pristinamycines dans le cas de la culture B uniquement. La concentration maximale atteinte est très faible, de l'ordre de 30 mg.L⁻¹. Aucune excrétion de succinate n'a été mesurée au cours de la culture D.

Un dosage de l'activité réductrice globale est réalisé sur la fermentation D (fig.72).

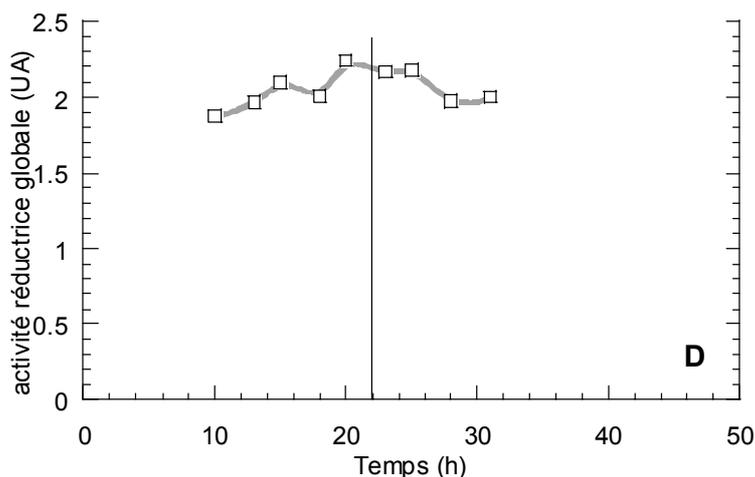


Figure 72 : Evolution de l'activité réductrice globale au cours du temps pour une culture en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Aucune modification de l'activité respiratoire globale au moment de la production des pristinamycines n'a pu être mesurée. Le changement entre phase de croissance et phase de production ne semble pas être lié à un basculement du métabolisme de type respiratoire vers un métabolisme de type fermentaire. Ces résultats sont en accord avec les faibles quantités d'acides organiques dosées (lactate et succinate).

V.1.6. Bilans de matière globaux au cours du procédé de production des pristinamycines en mode discontinu

Des bilans de matière globaux en carbone et en azote sont réalisés sur la culture D. Cette culture est découpée en trois périodes : de 0 à 18 h lors de la consommation du glutamate, de 18 à 20 h lors de la consommation de l'arginine et du glucose et alors qu'il n'y a pas encore de production des pristinamycines et de 20 à 30 h lors de la production des pristinamycines.

Les quantités d'acides produites sont tellement faibles qu'elles n'influent pas sur les bilans de matière, c'est pourquoi ces acides n'apparaissent pas dans les tableaux (tableaux 26-28).

*Chapitre V : Etude de la production de pristinamycines
en mode discontinu à partir d'une préculture âgée de 20 h*

Tableau 26 : Bilans carboné et azoté entre 0 et 18 h lors de la consommation du glutamate.

		g/L	mmol/L	Formules	Carbone mmol/L	Bilan C %	Azote mmol/L	Bilan N %
substrats	glucose	2,9	16,1	C ₆ H ₁₂ O ₆	97		0	
	arginine	0,51	2,9	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	18		12	
	glutamate	1,54	10,5	C ₅ H ₈ NO ₄	52		10	
	acétate	0,057	1,0	C ₂ H ₄ CO ₂	2		0	
	NH ₃		3,7		0		4	
	Total				169	100	26	100
produits	biomasse	2,82	98,9	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	99	58,7	21	
	Total				99	58,7	21	80,2

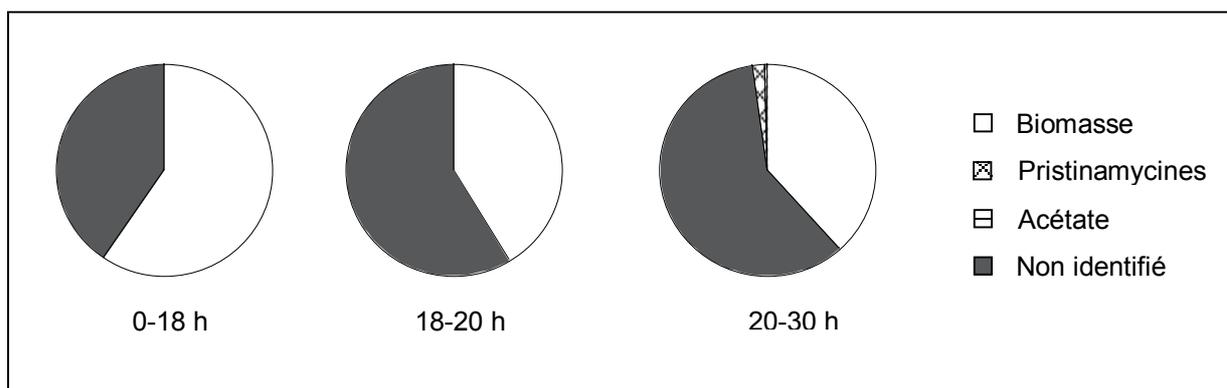
Tableau 27 : Bilans carboné et azoté entre 18 et 20 h lors de la consommation de l'arginine et du glucose, précédemment à la production des pristinamycines.

		g/L	mol/L	Formules	Carbone mmol/L	Bilan C %	Azote mmol/L	Bilan N %
substrats	glucose	2,26	126	C ₆ H ₁₂ O ₆	75		0	
	arginine	0,24	1,4	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	8		5,5	
	glutamate	0,04	0,3	C ₅ H ₈ NO ₄	1		0,3	
	acétate	0,0186	0,3	C ₂ H ₄ CO ₂	1		0	
	NH ₃		1,8				1,8	
	Total				85	100	7,6	100
produits	biomasse	1	35,1	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	35	41,3	7,4	
	Total				35	41,3	7,4	97

Tableau 28 : Bilans carboné et azoté entre 20 et 30 h lors de la production de pristinamycines.

		g/L	mmol/L	Formules	Carbone mmol/L	Bilan C %	Azote mmol/L	Bilan N %
substrats	glucose	10,94	60,8	C ₆ H ₁₂ O ₆	365		0	
	arginine	1,69	9,7	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	58		39	
	glutamate	0	0	C ₅ H ₈ NO ₄	0		0	
	Total				423	100	39	100
produits	biomasse	4,6	161,4	CH _{1,82} O _{0,62} N _{0,21} P _{0,02}	161	38,17	34	
	NH ₃		7,4				7,4	
pristina	acétate	0,0487	0,8	C ₂ H ₄ CO ₂	2	0,4	0	
	PII _A 60%	0,092	0,17	C ₂₈ N ₄	5	1,16	1	
	PII _B 10%	0,015	0,03	C ₂₈ N ₄	1	0,2	0	
	PI _A 22%	0,034	0,04	C ₄₃ N ₈	2	0,40	0	
	PI _B 8%	0,012	0,01	C ₄₂ N ₈	1	0,14	0	
	Total				171	40,5	43	109,7

Figure 73 : Répartition du carbone consommé au cours de la culture de *S. pristinaespiralis*.



0-18 h : croissance sur glutamate ; 18-20 : consommation de l'arginine et du glucose ; 20-30 : phase de production des pristinamycines.

Durant la phase de croissance sur glutamate, seule de la biomasse est formée. Le bilan carboné est de 59 %. Si on considère qu'il y a autant de moles de CO₂ produites que de moles de carbone utilisées pour la biomasse (Voelker et Altaba, 2001), le bilan en carbone sur cette période est de 118 %. La souche utilise sans doute des éléments de la préculture ou des réserves intracellulaires constituées lors de la préculture pour croître lors de la transition entre le milieu ICS et le milieu MPS2. Cependant, il est également possible qu'il y ait une surestimation de la biomasse produite, conduisant à cette valeur légèrement trop élevée.

Au cours des deux phases suivantes, le rendement en carbone de la biomasse est de 40 %. Si on considère la même hypothèse que précédemment pour la production de CO₂ (Voelker et Altaba, 2001), seuls 20 % du carboné consommé sont manquants. Roubos et son équipe (2001) obtenaient des manques en carbone allant de 10 à 25 % lors de cultures de *S. clavuligerus*. Ce carbone manquant lors des bilans se trouvait en réalité dans le surnageant et provenait probablement de la lyse cellulaire. Le recouvrement carboné réalisé sur ces deux phases est donc de l'ordre de ceux obtenus par Roubos *et al.* (2001).

Le recouvrement en azote est très élevé au cours des trois phases : il semble qu'il y ait peu de pertes d'azote. Ce bilan est d'ailleurs excédentaire lors de la phase de production des pristinamycines. Cet azote excédentaire pourrait provenir de la préculture ou de réserves intracellulaires constituées lors de la préculture.

V.1.7. Etude de l'existence d'une corrélation entre la chute du potentiel d'oxydoréduction et la production de pristinamycines

- Evolution du potentiel d'oxydoréduction, de la teneur en oxygène dissous et de la production de pristinamycines

Une des cultures de *S. pristinaespiralis* ayant permis la production des pristinamycines (fig. 74) présente dans un premier temps une baisse régulière du potentiel d'oxydoréduction, suivie d'une chute brutale. La diminution du potentiel d'oxydoréduction en début de culture, observée également lors des cultures sans production (fig. 75) est, pour partie, le reflet de la consommation en oxygène nécessaire à l'oxydation des substrats. Néanmoins, elle n'est pas due uniquement à la baisse de pO_2 puisqu'une réduction décimale de la pO_2 se traduit par une chute de 50 mV du potentiel redox (Hitchman, 1978). Ainsi, une partie de la baisse du potentiel d'oxydoréduction semble pouvoir être attribuée aux modifications du milieu liées à la croissance bactérienne (consommation de substrats ou accumulation de produits).

Dans la fig. 74, seuls les résultats obtenus à partir de la culture C sont montrés, mais il a pu être constaté que la chute brutale du potentiel d'oxydoréduction est corrélée à la production des pristinamycines et ce, pour les quatre cultures réalisées dans ces conditions.

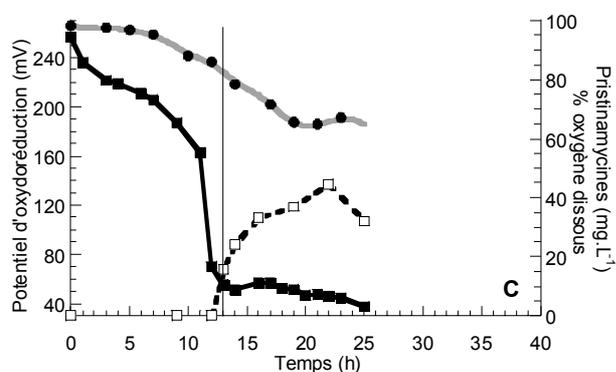


Figure 74 : Evolution de la teneur en oxygène dissous (●), du potentiel d'oxydoréduction (■) et de la concentration en pristinamycines (□) au cours du temps pour une culture productrice d'antibiotiques en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

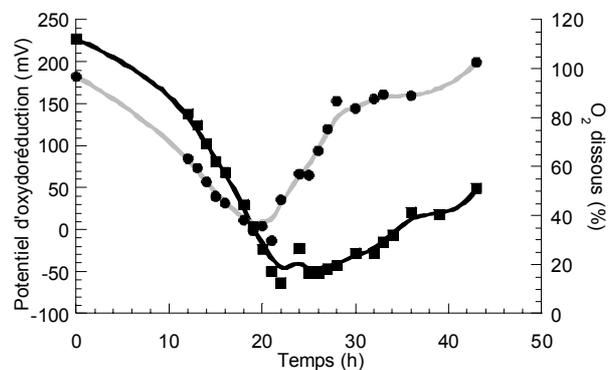


Figure 75 : Evolution de la teneur en oxygène dissous (●) et du potentiel d'oxydoréduction (■) au cours du temps pour une culture non productrice d'antibiotiques en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

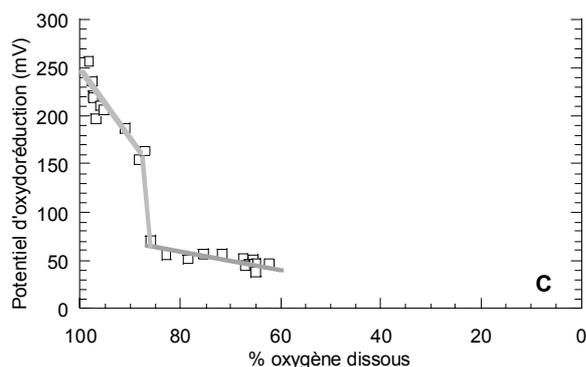


Figure 76 : Evolution du potentiel d'oxydoréduction en fonction de la teneur en oxygène dissous pour une culture productrice d'antibiotiques en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

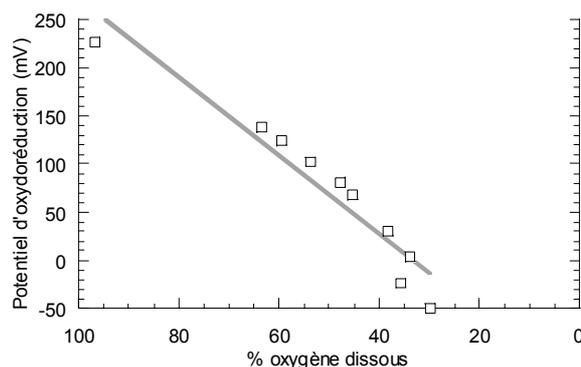


Figure 77 : Evolution du potentiel d'oxydoréduction en fonction de la teneur en oxygène dissous pour une culture non productrice d'antibiotiques en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm.

Dans le cas de la culture ayant permis la production des pristinamycines, la figure 76, représentant le potentiel d'oxydoréduction en fonction de la concentration en oxygène dissous, montre une rupture dans la pente, inexistante lors des cultures sans production de pristinamycines (fig. 77). Cette brusque chute du potentiel, dans le cas des cultures avec production d'antibiotiques n'est donc pas uniquement due à la baisse de la teneur en oxygène et aux modifications liées à la croissance. Cette chute brutale est très certainement due à une modification de la composition du milieu de culture, suite à une évolution du métabolisme cellulaire juste avant la production des antibiotiques.

Les observations en mode continu concernant la chute du potentiel d'oxydoréduction (Corvini, 2000) et la production des pristinamycines sont donc confirmées en mode discontinu.

- **Effet de l'ajout de pristinamycines sur la valeur du potentiel redox**

Afin de mieux comprendre pourquoi le potentiel d'oxydoréduction chute brutalement lors de la production des pristinamycines, des pristinamycines sont ajoutées au milieu MPS2 afin de mesurer leur effet sur le potentiel d'oxydoréduction.

Le potentiel d'oxydoréduction du milieu neuf est mesuré, puis des pristinamycines II_A (PII_A) et ensuite des pristinamycines I_A (PI_A) sont ajoutées afin de juger si leur ajout provoque une modification du potentiel (tableau 29).

Tableau 29 : Effet de l'ajout de pristinamycines sur la valeur du potentiel d'oxydoréduction.

	Concentration finale	Potentiel redox (mV)
Milieu seul		202
Milieu + PII _A	PII _A 20 mg.L ⁻¹	200
Milieu + PII _A + PI _A	PII _A 20 mg.L ⁻¹ PI _A 10 mg.L ⁻¹	208

Il apparaît que l'ajout des pristinamycines majoritaires (PII_A et PI_A) n'a pas d'effet significatif sur le potentiel d'oxydoréduction. Ainsi, ce n'est pas leur accumulation qui provoque la chute observée lors des réacteurs en mode continu et discontinu.

Une baisse du potentiel d'oxydoréduction est liée à une apparition de molécules réductrices dans le milieu de culture. Les pristinamycines I sont des protonophores. Leur excrétion dans le milieu de culture pourrait faciliter une sortie des ions H⁺ et ainsi contribuer à la chute du potentiel d'oxydoréduction observée. Une sortie d'ions H⁺ contribuerait à faire remonter le pH intracellulaire. Lors de la culture de référence, l'excrétion des pristinamycines coïncide avec une plus forte augmentation des valeurs du pH intracellulaire (fig. 18).

V.1.8. Discussion

Les paramètres de fermentation établis précédemment en fioles d'Erlenmeyer sur un volume de 80 mL permettent bien de reproduire la production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis* au cours de cultures en réacteur de 5 L en mode discontinu.

Les précultures âgées de 20 h qui avaient permis une production systématique et précoce en fioles d'Erlenmeyer (tableaux 4 et 5) donnent des résultats similaires en réacteur. Les quatre réacteurs réalisés permettent la production précoce, entre 11 h et 22 h de culture, des pristinamycines. Comme dans le cas de la production de spiramycine par *S. ambofaciens* (Drouin, 1996), l'utilisation d'un inoculum en phase de croissance rapide (24 h) permet une production d'antibiotiques plus précoce qu'avec un inoculum en transition entre la phase de croissance rapide et la phase stationnaire (44 h). Selon les cultures étudiées, la production des pristinamycines débute alors que les taux de croissance sont compris entre 0,08 et 0,16 h⁻¹. Ces valeurs sont trois à cinq fois plus élevées que celles observées par Corvini (2000) (0,03 et 0,04 h⁻¹) au même moment de la culture. Il faut noter que les vitesses spécifiques de croissance maximales sont de l'ordre de 0,2 h⁻¹ en moyenne, valeurs bien plus élevées que celles obtenues dans les travaux de Corvini (2000) puisque celles-ci atteignaient 0,1 h⁻¹ pour le même milieu de culture. En revanche, les vitesses spécifiques maximales de production des pristinamycines sont de l'ordre de celles trouvées lors de la culture de référence (entre 2 et 8 mg.h⁻¹.g⁻¹).

Cette production de pristinamycines a lieu en présence d'une croissance active, ce qui présente une originalité sur ce type de milieu : lors des précédents travaux sur milieu MPS2 (Corvini, 2000 ; Paquet, 1990) la production avait systématiquement lieu pendant la phase stationnaire de la culture. La production des pristinamycines a cependant déjà été observée au cours de la trophopase par Voelker et Altaba (2001) lors de l'utilisation d'un milieu contenant du NaNO_3 comme unique source d'azote.

La séquence de consommation des substrats est identique à celle obtenue par Corvini lors d'une culture en réacteur Chemap ayant permis la production des pristinamycines (fig.14) et également à celle obtenue en réacteur Applikon n'ayant pas produit de pristinamycines (fig.35). En revanche, lors des cultures réalisées dans le réacteur Chemap, la production des pristinamycines intervenait après épuisement de l'arginine. Dans les quatre cultures présentées ici, il reste non seulement, à chaque fois, de l'arginine dans le milieu, mais de plus dans deux cultures il reste également du glutamate lors du déclenchement de la production, ce qui est inhabituel. De plus, il est intéressant de relever que les deux cultures ayant permis le plus fort titre en pristinamycines sont celles dans lesquelles il ne reste plus de glutamate au moment du déclenchement de la production.

Les vitesses spécifiques de consommation du glucose atteignent leurs valeurs maximales rapidement, au bout de 8 à 17 h de culture. Ces vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose sont élevées, la valeur moyenne obtenue est de $0,45 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose obtenue lors du procédé n'ayant pas permis la production de pristinamycines était de $0,32 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ au bout de 24 h de culture (fig.36). Pour les cultures B et D, les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose sont de l'ordre de celle obtenue lors de la culture avec laquelle aucune production de pristinamycines n'avait été obtenue. En revanche pour les cultures A et C ces valeurs sont deux fois plus élevées. Les cultures avec les plus fortes productions de pristinamycines sont celles pour lesquelles la consommation de glucose commence plus tardivement (après 10 h) et ne contenant plus de glutamate. Les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose obtenues ici sont également bien plus importantes que celle obtenue lors de la culture de référence ayant permis la production de pristinamycines.

La concentration en phosphate ne semble pas influencer sur la production de pristinamycines. Cependant ces concentrations sont relativement faibles (de 0,8 à 3,5 mM) lors du déclenchement de la production. Lors de précédents travaux concernant *S. pristinaespiralis*, la production de pristinamycines, sur des milieux contenant des acides aminés comme seules source d'azote, se déclenchait quelques heures après l'épuisement en phosphate du milieu, lors de la phase stationnaire. En revanche, lorsque l'azote était présent uniquement sous forme de nitrate de sodium, la production se déclenchait au cours de la phase de croissance et alors qu'il restait une concentration importante de phosphates ($> 485 \text{ mg.L}^{-1}$) (Voelker et Altaba, 2001). Néanmoins, dans ce dernier cas, le rendement de production des pristinamycines était le plus faible rendement obtenu comparé aux autres milieux étudiés dans ce travail.

Parmi les quatre cultures réalisées, celles dont la concentration en phosphate est inférieure ou égale à 1 mM ont atteint un titre en pristinamycines supérieur aux autres cultures. Il n'est donc pas à exclure que lorsque la source d'azote est fournie sous forme d'acides aminés, le phosphate ait tout de même un effet négatif sur la production des pristinamycines comme c'est le cas dans le travail de Voelker et Altaba (2001).

Pour les quatre cultures réalisées, la concentration en ammonium diminue au cours des vingt premières heures. Pour la culture D, une accumulation d'ammonium est observée après 20 h, coïncidant avec l'épuisement en glutamate du milieu et avec la vitesse spécifique maximale de consommation de l'arginine. Lors des travaux précédents publiés par Voelker et Altaba (2001) une production d'ammonium était observée après épuisement du phosphate lorsque la culture était réalisée sur un milieu contenant du glucose et de l'alanine ou du glutamate comme seules sources d'azote, ces acides aminés étant utilisés comme source de carbone. La production d'ammonium a été attribuée à la désamination de ces acides aminés. Lors de la production de spiramycine par *S. ambofacien*, l'utilisation d'arginine comme source d'azote est à l'origine d'une accumulation d'ions ammonium dans le milieu (Lamsaïf, 1992). L'ammonium accumulé au cours de la culture D pourrait provenir de l'arginine, ce qui laisse supposer une utilisation de l'arginine en tant que source de carbone lors du procédé.

Dans le cas des cultures A et D, il ne reste plus de glutamate lors de la production des pristinamycines, et la vitesse de consommation de l'arginine est élevée. Si l'arginine est utilisée pour son squelette carboné, cette vitesse de consommation élevée pourrait conduire à un flux d'ions ammonium provenant de l'arginine supérieur aux besoins de la cellule. Ces ions ammonium excédentaires seraient alors excrétés dans le milieu de culture. Le bilan en azote réalisé sur la phase de production des pristinamycines donne un rendement de 109 % sur cette

période, ce qui est en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'ammonium proviendrait de l'arginine.

Aucune modification de l'activité respiratoire globale, rapportée à la concentration en biomasse, n'est mesurée tout au long du procédé de production des pristinamycines. Le changement entre phase de croissance et phase de production ne semble donc pas être lié à une modification du métabolisme de type respiratoire vers fermentaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Paquet (1990) qui, bien qu'obtenant une production de pristinamycines au cours de la phase stationnaire de la croissance, a observé que l'évolution de l'activité réductrice était similaire à celle de la biomasse.

Dans le cas du procédé n'ayant pas permis la production de pristinamycines, il n'y avait pas non plus de modification de l'activité réductrice globale. Il semble qu'il n'y ait pas de relation entre la production de pristinamycines et l'activité respiratoire.

La production de pristinamycines intervient donc ici lorsque le taux de croissance diminue et alors qu'il ne semble pas y avoir de limitations nutritionnelles. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas de la production d'actinorhodine par *S. coelicolor* A3(2) par Doull et Vining dans le cas d'un ensemencement à partir de cellules végétatives (1990). Ce phénomène a été attribué, d'une part au fait que les cellules végétatives étaient déplacées dans un milieu moins riche, mais également au fait que, dans ces conditions, *S. coelicolor* A3(2) forme des pelotes compactes au sein desquelles il existerait des limitations nutritionnelles partielles.

La concentration en acétate est environ deux fois plus faible que celle mesurée par Corvini (2000) qui obtenait environ 90 mg.L⁻¹ lors de la production des pristinamycines. Les concentrations maximales en succinate et en lactate excrétées lors des cultures réalisées selon le "nouveau" procédé sont également nettement moins importantes que lors des travaux précédents réalisés par Corvini (2000) : 30 mg.L⁻¹ au lieu de 2,5 g.L⁻¹ en moyenne pour le succinate et 0,13 mg.L⁻¹ au lieu de 400 mg.L⁻¹ concernant le lactate.

L'évolution de la concentration en succinate lors des cultures réalisées selon le nouveau procédé est similaire à celle de la culture sans production d'antibiotiques. L'augmentation du titre en succinate lors de la culture avec production de pristinamycines ne semble donc pas être reliée à la production des pristinamycines mais plutôt à la croissance de la souche.

De façon générale, les acides organiques sont excrétés en très faibles quantités comparé à la culture de référence, ce qui traduit un métabolisme différent.

Lors des quatre cultures réalisées en réacteur discontinu, une chute brutale du potentiel d'oxydoréduction du milieu est observée lors de la production des pristinamycines. Cette chute brutale, n'est pas uniquement due à la diminution de la teneur en oxygène dissous du milieu puisqu'une réduction décimale de la concentration en oxygène correspond à une baisse de 50 mV (Hitchman, 1978), et n'est pas due à l'accumulation des pristinamycines dans le milieu de culture, leur ajout dans du milieu neuf n'ayant pas d'effet sur la valeur du potentiel. Lors des fermentations réalisées en réacteur en mode continu, la production des pristinamycines a lieu de manière cyclique (Corvini, 2000). Au cours de ces cultures, une chute brutale du potentiel redox est systématiquement observée avant l'excrétion des pristinamycines, suivi d'un retour à sa valeur précédant la chute (fig. 75).

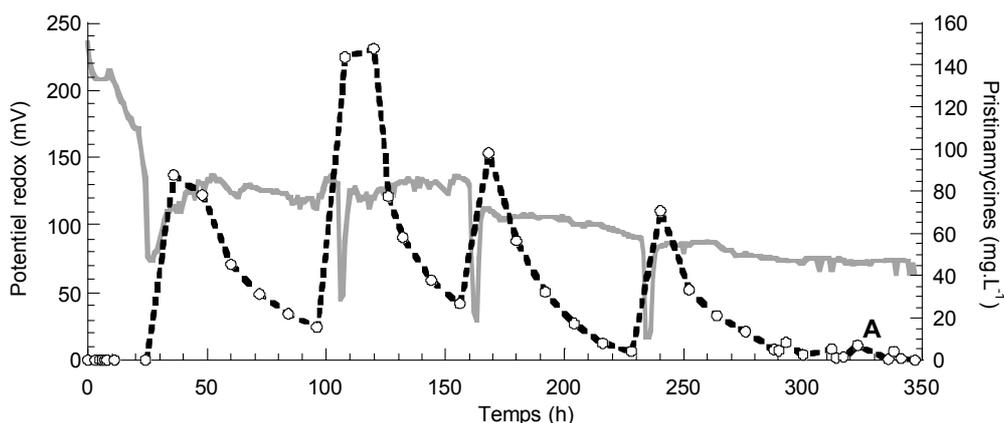


Figure 75 : Evolution du potentiel d'oxydo-réduction (—) et de la concentration en pristinamycines (○) dans le milieu de culture lors d'une culture en réacteur en mode continu sur milieu MPS2.

Le suivi du potentiel d'oxydoréduction du milieu est donc un bon indicateur du déclenchement de la production des pristinamycines, aussi bien en mode continu que discontinu.

Afin de déterminer si la valeur du potentiel redox a une influence sur la production de pristinamycines, des molécules oxydantes ($K_2Cr_2O_7$, $KMnO_4$, $K_3Fe(CN)_6$) ou réductrices (acide ascorbique, L-tyrosine, $K_4Fe(CN)_6$) pourraient être ajoutées dans le milieu lors de cultures en réacteur. En effet, si la chute du potentiel d'oxydoréduction est responsable de la production des pristinamycines, maintenir artificiellement cette valeur élevée devrait empêcher la production de pristinamycines. Au contraire, l'ajout de molécules réductrices

provoquant une chute brutale de la valeur du potentiel d'oxydoréduction devrait permettre de déclencher la production des pristinamycines.

Lors de la production d'imbricine par *S. imbricatus*, les plus forts taux de production sont obtenus pour les plus fortes vitesses d'aération. Sous de fortes aérations, une chute provoquée du potentiel d'oxydoréduction permet de stimuler la production d'antibiotiques alors que pour les faibles valeurs d'aération il y aurait plutôt une inhibition de la production. En revanche, sous de plus faibles vitesses d'aération, dans des conditions d'aérations insuffisantes, la biosynthèse de l'antibiotique peut être provoquée en augmentant le potentiel d'oxydoréduction du milieu (par l'ajout de $K_2Cr_2O_7$, $K_3Fe(CN)_6$ ou $KMnO_4$). Ainsi, une forte production d'imbricine requiert non seulement une aération efficace mais également des valeurs définies du potentiel d'oxydoréduction du milieu (Sukharevich *et al.*, 1998).

V.2. Mesures microcinétiques réalisées au cours du nouveau procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu

V.2.1. Evolution du pH intracellulaire et extracellulaire au cours du procédé de production des pristinamycines en réacteur en mode discontinu

Des mesures du pH_i ont été effectuées sur la culture C (fig. 76) afin de suivre les valeurs du pH_i tout au long d'une culture réalisée selon le nouveau procédé ayant permis la production des pristinamycines.

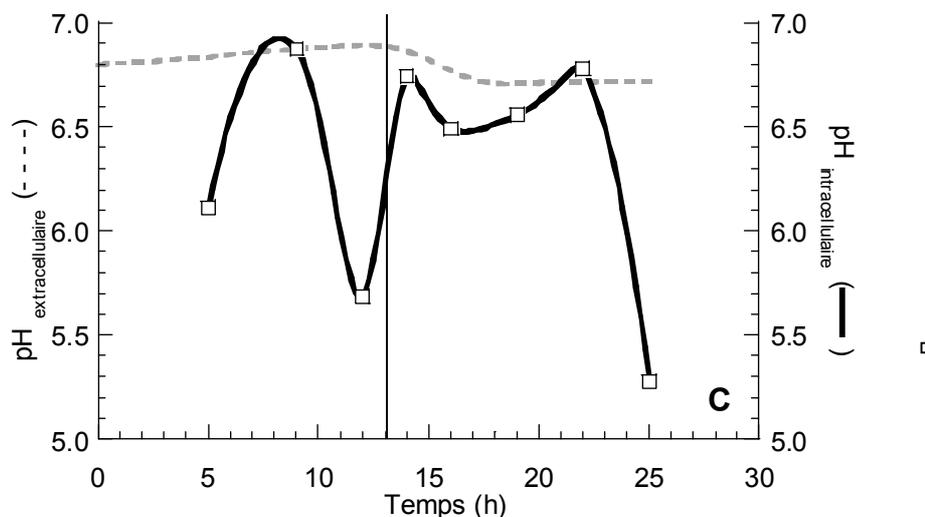


Figure 76 : Evolution du pH intracellulaire (□) et extracellulaire (---) au cours du temps pour une culture en mode discontinu de *S. pristinaespiralis* sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Des variations du pH intracellulaire de 5,3 à 6,8 ont été mesurées. Ces valeurs sont nettement plus faibles que celles mesurées par Corvini (2000) (environ 1,5 unité de moins). Néanmoins, le profil est similaire, le pH_i chute de plus d'une unité pH juste avant le début de l'excrétion des pristinamycines, pour remonter après le début de l'excrétion des pristinamycines. Cette remontée du pH intracellulaire pourrait être due à l'effet protonophore des pristinamycines, provoquant une sortie des ions H⁺.

V.2.2. Evolution des activités enzymatiques intracellulaires au cours du procédé de production des pristinamycines en réacteur discontinu

Les activités spécifiques de différentes enzymes du métabolisme central précédemment étudiées ont été mesurées au cours du procédé de production des pristinamycines nouvellement établi. Les activités ont été mesurées au cours de la culture A, exceptées la PDH et l' α -KGDH qui ont été mesurées au cours de la culture D (fig. 77-79). Ces deux cultures sont sensiblement identiques, elles ont les mêmes profils de croissance et de production des pristinamycines. Pour la culture A, le titre en pristinamycines augmente jusqu'à 26h et pour la culture D jusqu'à 28 h. Les résultats de ces dosages seront donc traités ensemble et placés sur les mêmes schémas métaboliques.

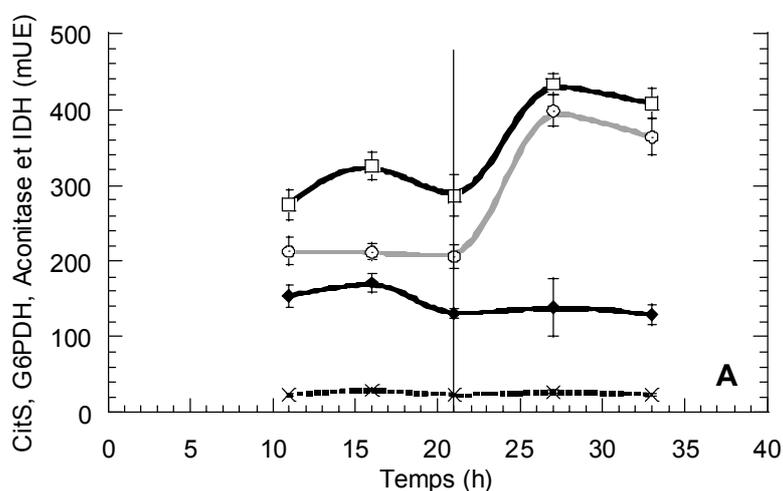


Figure 77 : Evolution des activités spécifiques intracellulaires de la CitS (□), de la G6PDH (x), de l'Aco (♦) et de l'IDH (○) au cours du temps pour une culture de *S. pristinaespiralis* en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

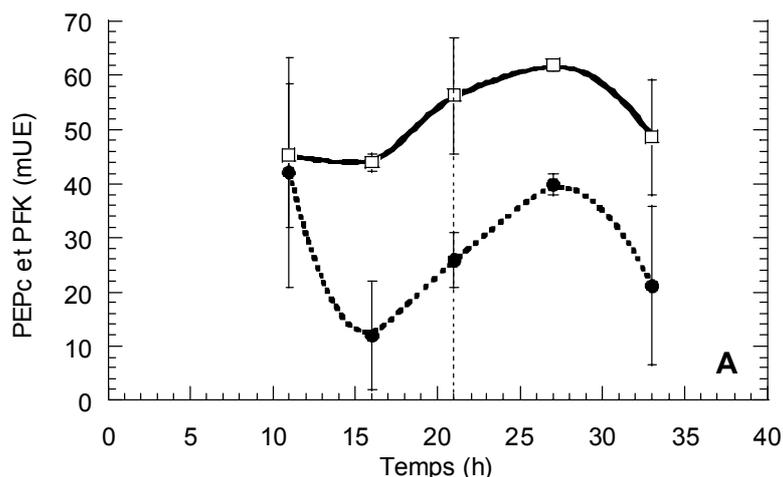


Figure 78 : Evolution des activités spécifiques intracellulaires de la PEPc (□) et de la PFK (●) au cours du temps pour une culture de *S. pristinaespiralis* en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale en pointillé représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

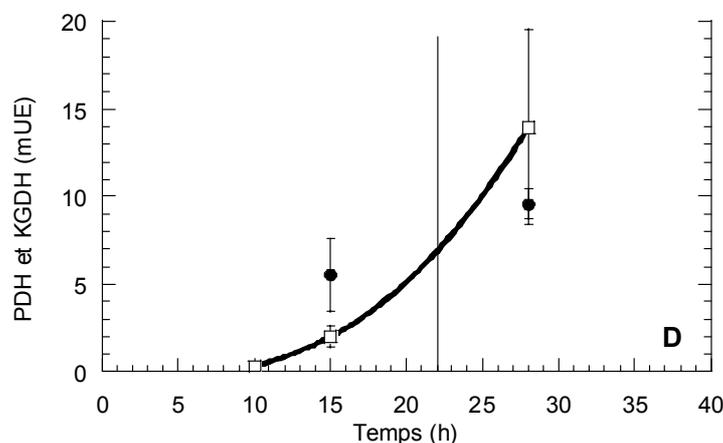


Figure 79 : Evolution des activités spécifiques intracellulaires de la PDH (□) et de l' α -KGDH (●) au cours du temps pour une culture de *S. pristinaespiralis* en mode discontinu sur milieu MPS2 à 700 rpm. La droite verticale représente le début de l'excrétion des pristinamycines.

Les activités mesurées des enzymes sont de l'ordre de grandeur de celles mesurées par Corvini (2000). Néanmoins, contrairement aux travaux précédents, aucune diminution générale des activités enzymatiques mesurées n'est observée lors du passage de la trophophase à l'idiophase. Les niveaux d'activités sont en fait du même ordre de grandeur que ceux mesurés lors de cultures sans production de pristinamycines (fig. 51 à 54).

Afin d'avoir une meilleure vision de ces activités spécifiques, les valeurs sont regroupées dans le tableau 24 et un schéma des activités enzymatiques est réalisé (fig.80). Le pH intracellulaire n'ayant pas été mesuré sur la même culture que celle ayant servi au dosage des activités spécifiques enzymatiques, l'évolution des valeurs du pH_i est indiquée par rapport au déclenchement de la production des pristinamycines.

*Chapitre V : Etude de la production des pristinamycines
en mode discontinu à partir d'une préculture âgée de 20 h*

Tableau 24 : Activités enzymatiques spécifiques (mUE) mesurées au cours du procédé de production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Enzyme	Temps pHi 16h 6,9		Temps pHi 21h 6		Temps pHi 27h 6,7		Temps pHi 33h 6,6	
	5 h avant le déclenchement		déclenchement de la production		6 h après le déclenchement		12 h après le déclenchement	
CitS	325		286		433		408	
G6PDH	30		24		27		24	
Aco	171		131		139		129	
IDH	212		206		398		364	
PEPc	44		56		62		49	
PDH	2						14	
α -KGDH	5						10	
PFK	12		26		40		21	
Pristinamycines totales (mg.L ⁻¹)	0,0		0,0		70		70	

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (CitS) citrate synthase, (Aco) aconitase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α -KGDH) α -cétoglutarate déshydrogénase.

Au cours de la culture, l'activité spécifique de la G6PDH reste relativement constante. La voie des pentoses phosphate resterait donc active tout au long de la culture, y compris au moment de la production des pristinamycines. Cette activité est deux à cinq fois plus élevée que celle mesurée lors de la culture sans production (fig. 53).

Entre 11 h et 15 h, l'activité spécifique de la PFK présente une importante baisse de 42 à 12 mUE, ce qui semblerait indiquer une réorientation des flux de matière vers la voie des pentoses phosphate. Après 15 h, l'activité spécifique de la PFK, et donc le flux de matière dans la glycolyse, augmente jusqu'au moment où le titre en pristinamycines est maximal.

Entre 11 h et 15, l'activité spécifique de la PDH varie de 0,3 à 2 mUE et celle de la PEPc reste constante (45 et 44 mUE) ce qui pourrait indiquer une augmentation de l'entrée de matière dans le cycle de Krebs via l'acétyl-CoA. L'activité spécifique de la PEPc varie ensuite de façon analogue à celle de la PFK. Pour sa part, l'activité spécifique de la PDH augmente jusqu'à 14 mUE. Néanmoins, étant donné le faible niveau d'activité de la PDH, il semblerait que l'augmentation des flux de matière dans la glycolyse due à l'augmentation de l'activité de la PFK soit prise en charge par la PEPc.

Chapitre V : Etude de la production des pristinamycines en mode discontinu à partir d'une préculture âgée de 20 h

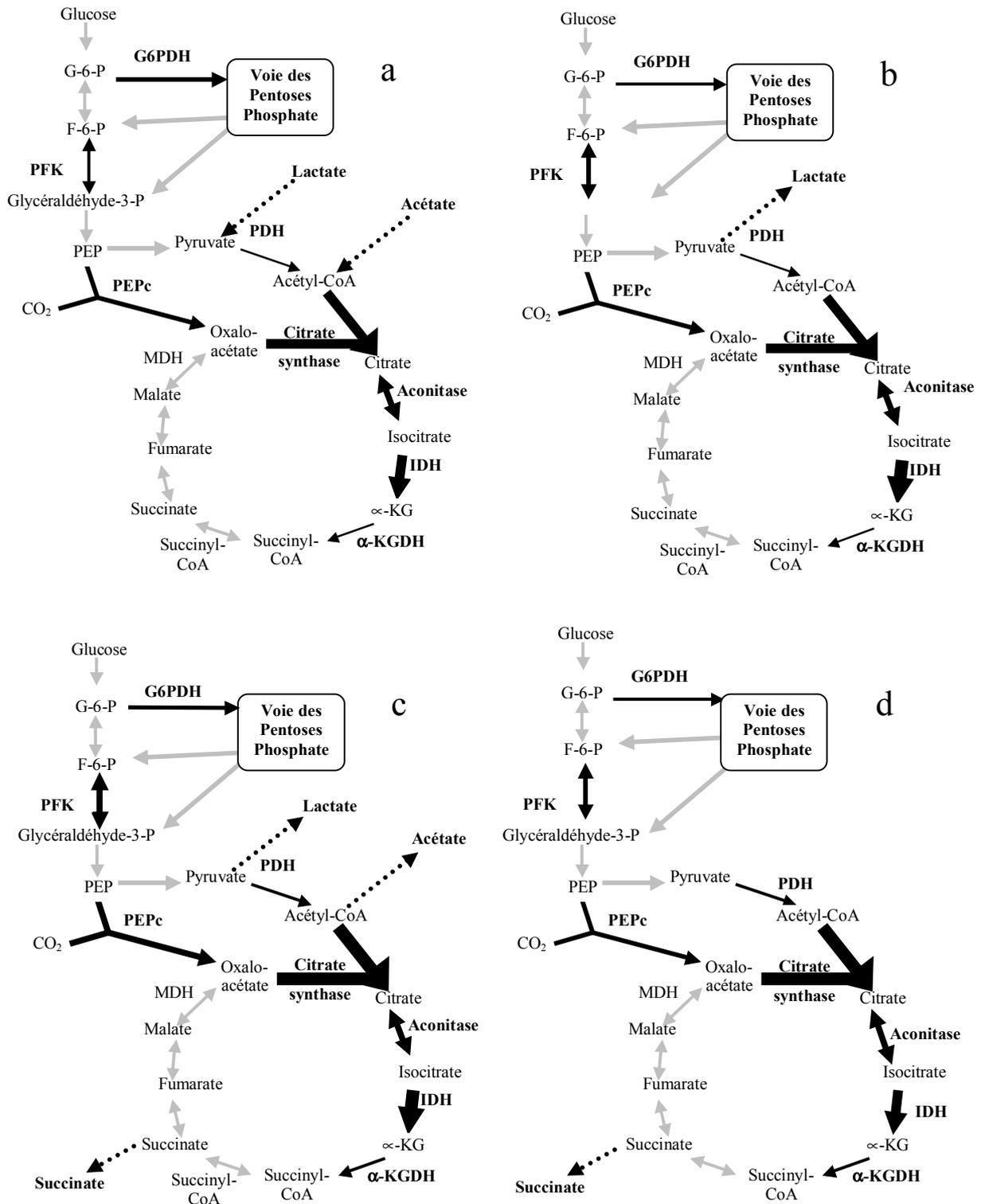


Figure 80 : Evolution des activités spécifiques mesurées au cours du temps lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* en réacteur en mode discontinu.

a : 5 h avant le déclenchement de la production, b : déclenchement de la production des pristinamycines (21 h), c : 6 h après le déclenchement. d : 12 h après le déclenchement.

Les flèches correspondant aux réactions catalysées par des enzymes dont les activités ont été mesurées sont représentées en noir. L'évolution de la grosseur des flèches représente l'évolution des activités spécifiques. Les pointillés représentent les entrées ou les sorties des acides organiques mesurés.

Les activités spécifiques de l'IDH et de la citrate synthase sont très élevées tout au long de la fermentation. Elles varient peu précédemment au déclenchement de la production des pristinamycines mais augmentent fortement au cours de la production.

L'activité spécifique de l'aconitase, bien qu'inférieure à celles de l'IDH et de la citrate synthase, est tout de même élevée et diminue de 171 à 131 mUE précédemment à la production des pristinamycines pour se stabiliser ensuite. Les évolutions de ces enzymes permettent de supposer que l'activité de l'aconitase pourrait constituer une limitation des flux de matière impliquant une limitation pour la production des pristinamycines.

Entre 21 h et 27 h, au moment de la production des pristinamycines, une augmentation plus ou moins importante mais générale des activités enzymatiques spécifiques mesurées a lieu.

La faible activité de la PDH pourrait conduire à une limitation en acétyl-CoA, cependant la consommation en acétate précédemment à la production des pristinamycines, pourrait permettre de compenser ce déficit et fournir de l'acétyl-CoA ou bien servir directement de précurseur pour la biosynthèse des pristinamycines.

L'excrétion d'acétate dans le milieu de culture intervient 6 h après le déclenchement de la production, lorsque la production des pristinamycines cesse. Les pristinamycines II, qui sont les pristinamycines majoritaires, résultent de la condensation de 7 unités acétate et d'analogues d'acides aminés. L'arrêt de la production des pristinamycines pourrait provoquer une accumulation d'acétate menant à l'excrétion observée.

Il est possible que la faible accumulation de succinate observée provienne de l'oxalo-acétate : la faible activité de la PDH et le besoin en acétate pour la synthèse des pristinamycines pouvant créer un déficit en acétyl-CoA et donc une plus faible activité de la citrate synthase.

Globalement, une augmentation du flux de matière dans la glycolyse est observée jusqu'à la fin de la production des pristinamycines et semble provoquer une augmentation du flux de matière dans la voie anaplérotique. La voie des pentoses phosphate, quant à elle, reste active tout au long de la culture et le flux de matière dans cette voie varie peu. Lors des cultures n'ayant pas permis la production des pristinamycines, une augmentation du flux dans la voie des pentoses phosphate avait lieu entre 14 h et 20 h, suivi d'une réorientation des flux dans la voie de la glycolyse. Néanmoins, la production de lactate et d'acétate observée laissait supposer que l'augmentation du flux de matière dans la glycolyse semblait n'être que partiellement compensée par l'activité de la PEPc.

De façon générale, lors des cultures n'ayant pas permis la production d'antibiotiques, les activités spécifiques mesurées augmentent au cours du temps. Lors de la culture avec production, la plupart des enzymes présentent une légère baisse d'activité durant les 5 h précédant le déclenchement de la production. Toutes ces activités spécifiques continuent d'augmenter lors de la production des pristinamycines et baissent une fois le titre maximal en pristinamycines atteint.

V.2.3. Vers une estimation des activités enzymatiques "in vivo"

Lors des dosages "in vitro" les enzymes sont sensibles aux variations du pH. Le pH intracellulaire de *S. pristinaespiralis* varie au cours du procédé de production des pristinamycines. Cette variation présente une amplitude de 1,5 unité pH (de 5,3 à 6,8). Afin d'estimer les variations des flux *in vivo*, les activités enzymatiques sont corrigées en fonction de la valeur du pH du tampon dans lequel est réalisé le dosage et en fonction du pourcentage d'activité à la valeur du pH intracellulaire au moment du dosage.

Le pH intracellulaire n'ayant pas été mesuré sur la même culture que celle ayant servi au dosage des activités spécifiques enzymatiques, les valeurs de pH_i sont indiquées avec comme référence le déclenchement de la production des pristinamycines.

Le tableau 25 rapporte les activités spécifiques mesurées *in vitro* des enzymes corrigées comme précédemment (chap. III.2.2.).

Tableau 25 : Activités enzymatiques spécifiques (mUE) corrigées au cours du procédé de production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Enzyme	Temps pH _i 16h 6,9 5 h avant le déclenchement		Temps pH _i 21h 6 déclenchement de la production		Temps pH _i 27h 6,7 6 h après le déclenchement		Temps pH _i 33h 6,6 12 h après le déclenchement	
	CitS	244		43		260		273
G6PDH	25		14		22		19	
Aco	76		8		40		50	
IDH	115		29		142		156	
PEPc	42		50		59		49	
PDH	1,2						9,8	
α-KGDH	2,8						6,7	
PFK	15		28		48		27	
Pristinamycines totales (mg.L ⁻¹)	0,0		0,0		70		70	

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (CitS) citrate synthase, (Aco) aconitase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α-KGDH) α-cétoglutarate déshydrogénase.

A partir de ces données, un schéma des activités enzymatiques peut être établi avec les valeurs des activités spécifiques corrigées par le pH (fig.81). De plus, afin d'avoir une meilleure vision de la répartition des flux, des rapports d'activités sont réalisés (tableau 26).

Tableau 26 : Rapports d'activités enzymatiques spécifiques corrigées, au cours du procédé de production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis*.

Rapport	Temps pHi 16h 6,9 5 h avant le déclenchement		Temps pHi 21h 6 déclenchement de la production		Temps pHi 27h 6,7 6 h après le déclenchement		Temps pHi 33h 6,6 12 h après le déclenchement	
	PFK/G6PDH	0,6		1,9		2,2		1,4
PFK/PDH	12,8						2,7	
PEPc/PDH	35						5	
IDH/KGDH	41,8						23,3	
CitS/Aco	3,2		5,7		6,5		5,5	
Aco/IDH	0,66		0,26		0,28		0,32	
Pristinamycines totales (mg.L ⁻¹)	0,0		0,0		70		70	

(G6PDH) glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PFK) phospho-fructo kinase, (PDH) pyruvate déshydrogénase, (PEPc) phosphoénol-pyruvate carboxylase, (CitS) citrate synthase, (Aco) aconitase, (IDH) isocitrate déshydrogénase et (α -KGDH) α -cétoglutarate déshydrogénase.

Les sens de variation des activités spécifiques après calcul des valeurs qu'elles auraient à la valeur de pHi au moment du dosage ne changent pas pour la majorité des enzymes à l'exception de la citrate synthase et de l'aconitase. Ces deux enzymes présentent une forte baisse d'activité à 21 h lorsque les activités sont corrigées, cependant le niveau d'activité de la citrate synthase reste élevée comparée aux autres.

Toutes les enzymes dosées, à l'exception de la PFK et de la PEPc, présentent une baisse de leur activité précédemment à la production des pristinamycines, suivie d'une augmentation de leur activité spécifique lors de la production des pristinamycines y compris pour la PFK et la PEPc.

Le rapport (PFK/G6PDH) représentant la répartition de flux entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate augmente précédemment à l'excrétion des pristinamycines (passant de 0,6 à 16 h à 1,9 à 21 h) et pourrait indiquer une augmentation du flux dans la voie de la glycolyse. Ce rapport reste ensuite élevé (2,2 puis 1,4).

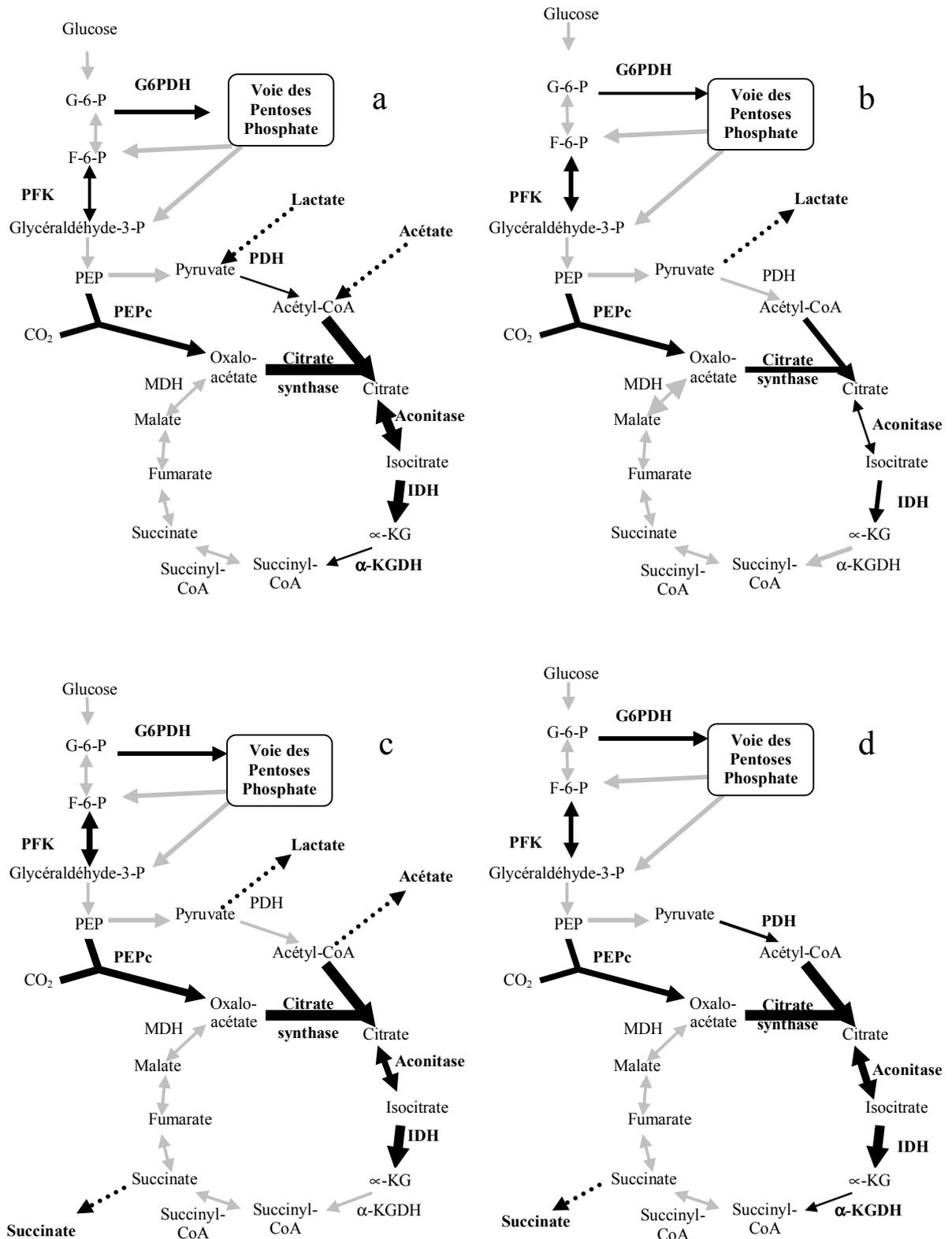


Figure 81 : Evolution des activités spécifiques corrigées de *S. pristinaespiralis* au cours d'une culture en mode discontinu.

a : 5 h avant le déclenchement de la production. b : déclenchement de la production. c : 6 h après le déclenchement de la production. d : 12 h après le déclenchement de la production.

Les flèches correspondant aux réactions catalysées par des enzymes dont les activités ont été mesurées sont représentées en noir. L'évolution de l'épaisseur des flèches représente l'évolution des activités spécifiques. Les flèches en pointillé représentent les consommations et les productions en acides organiques dosés.

Le rapport (PEPc/PDH) pourrait indiquer quelle voie sera empruntée préférentiellement pour alimenter le cycle de Krebs. Ce rapport est de 35 à 16 h de culture et chute à 5 à 33 h de culture pouvant indiquer une réorientation du flux vers la synthèse d'acétyl-CoA.

Les activités de la citrate synthase et de l'aconitase présentent une baisse importante à 21 h. Le rapport (CitS/Aco) augmente de 3,2 à 16 h à 5,7 à 21 h et 6,5 à 27 h, indiquant que l'activité de l'aconitase pourrait être limitante par rapport à celle de la citrate synthase.

V.3. Conclusions

La production de pristinamycines en réacteur en mode discontinu a pu être obtenue dans le réacteur Applikon de 5 L en appliquant les paramètres déterminés dans le chapitre précédent.

La production des pristinamycines intervient de façon précoce, au cours de la phase de croissance. Le déclenchement de la production des métabolites secondaires est généralement associé à une limitation d'un des substrats, or les analyses macrocinétiques réalisées n'ont pas permis la mise en évidence d'un facteur limitant qui serait à l'origine du déclenchement de la production.

Ce phénomène pourrait être lié à la morphologie cellulaire : si la souche forme des pelotes compactes, alors des limitations nutritionnelles partielles à l'intérieur de ces pelotes pourraient exister et créer les conditions favorables à la production d'antibiotiques.

Les observations morphologiques réalisées en fioles d'Erlenmeyer montrent une augmentation de la taille des pelotes lorsque la vitesse d'agitation augmente ainsi qu'une formation plus précoce de ces pelotes. Les quatre cultures en réacteur présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec une vitesse d'agitation de départ de 700 rpm. Les cultures précédentes étaient réalisées avec une agitation de départ de 250 rpm, cette dernière augmentant lorsque la teneur en oxygène dissous diminuait en-dessous de la valeur consigne. Il est donc très probable que lors des quatre cultures réalisées avec une vitesse d'agitation de 700 rpm les pelotes se forment plus rapidement. La production des pristinamycines au cours des cultures à 700 rpm pourrait donc être la conséquence de limitations nutritionnelles au sein de ces pelotes, plus importantes que dans les pelotes de la culture sans production avec une agitation de départ fixée à 250 rpm.

Le suivi des variations du potentiel d'oxydoréduction a confirmé les résultats obtenus lors des cultures en réacteurs en mode continu (Corvini, 2000), montrant l'existence d'une corrélation entre la production des pristinamycines et une chute brutale et importante des valeurs du potentiel d'oxydoréduction du milieu. Le dosage des pristinamycines se faisant hors-ligne, cette relation est très intéressante : le suivi en ligne du potentiel redox permet de savoir à quel moment a lieu la production des pristinamycines et permet ainsi de gérer au mieux la conduite de la culture. Par la suite, il serait intéressant de tester si l'ajout de molécules réductrices, provoquant la chute du potentiel d'oxydoréduction, induise également la production des pristinamycines.

Cette chute du potentiel d'oxydo-réduction pourrait être due à un effet protonophore de pristinamycines, provoquant une sortie d'ions d'H⁺. Cette sortie d'ions H⁺ pourrait également être responsable de la hausse du pH intracellulaire suite à l'excrétion des pristinamycines.

Le suivi du pH intracellulaire a fourni un profil similaire bien que décalé par rapport à ceux obtenus précédemment (Corvini *et al.*, 2000). De plus, une chute du pH intracellulaire est bien observée précédemment à la production des pristinamycines alors même que le métabolisme de la souche est différent puisque la production a lieu au cours de la phase de croissance.

Une des hypothèses concernant cette chute du pH intracellulaire était l'accumulation intracellulaire d'acides organiques, ces derniers étant excrétés de façon importante lors de la culture de référence. Lors des cultures réalisées selon le nouveau procédé de production, ces acides organiques sont excrétés en très faibles quantités, ce qui constitue une différence majeure avec la culture de référence. La chute du pH intracellulaire ne semble donc pas due aux acides organiques.

L'activité de la G6PDH est plus importante lorsque les cellules produisent des pristinamycines, le flux de matière dans la voie des pentoses phosphates semble donc plus important. Il en résulte que la répartition des flux de matière entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate est moins tranchée, les activités de la G6PDH et de la PFK étant du même ordre de grandeur. Le rapport (PFK/G6PDH) varie de 0,6 à 1,4 tout au long de la fermentation. Cinq heures avant la production des pristinamycines, la voie des pentoses phosphate semble donc plus sollicitée que la glycolyse. Lors de la culture de référence, une réorientation des flux vers la glycolyse a lieu précédemment à la production des pristinamycines avec cependant une légère augmentation du flux dans la voie des pentoses phosphate pendant la production des antibiotiques. En revanche, lors de cultures sans

production de pristinamycines le rapport (PFK/G6PDH) varie de 1,1 à 4,2. La voie glycolytique est donc prédominante sur la voie des pentoses phosphate.

L'activité généralement plus élevée de la voie des pentoses phosphate, lors des cultures ayant permis la production des pristinamycines, pourrait ainsi permettre une meilleure régénération des co-facteurs réduits de type NADPH nécessaires à la production des pristinamycines.

Au cours de ces cultures, l'activité de l'aconitase, bien que d'un niveau élevé, semblerait être limitante comparée à celles de la citrate synthase et de l'IDH, alors que lors des cultures n'ayant pas permis la production des pristinamycines, c'est la citrate synthase qui semblait limitante comparée aux deux autres, et qui aurait pu être à l'origine de la faible production de succinate observée.

Les enzymes PDH et α -KGDH présentent toujours des activités faibles. La PDH permet la synthèse de l'acétyl-CoA qui va servir à la biosynthèse des lipides, composés essentiels de la cellule. Cette faible activité mesurée, en regard des besoins nécessaires à la cellule, pose question.

La PDH, catalysant la production d'acétyl-CoA à partir du pyruvate est un complexe formé de trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase, la dihydrolipoamide acétyl-transférase et la dihydrolipoamide déshydrogénase. Cette dernière est une enzyme participant également à la formation du complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Cette unité commune participe au transfert des électrons vers la chaîne respiratoire (Schwinde *et al.*, 2001). Chez *C. glutamicum*, l'activité de ces deux enzymes (PDH et α -KGDH) ayant été trouvée dans la fraction soluble d'un extrait acellulaire en présence de glycérol, ainsi que dans la fraction contenant les débris membranaires (Uy, 2003), une hypothèse émise est que les complexes enzymatiques de la PDH et de α -KGDH seraient liés à la membrane. Ainsi, il est possible que les faibles activités mesurées soient liées à la difficulté de mesurer ces activités enzymatiques, difficulté due à leur localisation membranaire, et ne reflètent pas la réalité.

Les acides aminés ont été pris en compte dans les bilans mais n'ont pas été intégrés aux études des flux de matière, à cause de la méconnaissance du catabolisme de l'arginine chez *Streptomyces*.

Le carbone issu du glutamate entre dans le cycle de Krebs *via* l' α -cétoglutarate. Deux voies de synthèse mènent à l' α -cétoglutarate à partir du glutamate, l'une faisant intervenir la glutamate déshydrogénase (GDH) et l'autre faisant intervenir la glutamine synthétase (GS) et la

glutamate synthase (GOGAT). Le glutamate peut également être transformé en arginine et réciproquement (Cunin *et al.*, 1986). Le catabolisme de l'arginine peut conduire à la production d'ornithine et d'urée mais également à la production de succinate, l'un des intermédiaires du cycle de Krebs (Cunin *et al.*, 1986).

Les concentrations en succinate sont très inférieures à celles produites lors des cultures productrices en réacteur Chemap. De plus, la production d'ammonium observée lors de la consommation d'arginine indique que l'arginine pourrait également être employée comme source de carbone, contrairement aux cultures en réacteur Chemap. Le carbone issu de l'arginine pourrait ainsi entrer dans le cycle de Krebs *via* le succinate puisqu'il est très faiblement excrété dans le milieu de culture, mais également *via* le glutamate.

CONCLUSION GENERALE

Nos objectifs initiaux étaient de compléter les études enzymatiques du métabolisme central entreprises par Corvini (2000), afin d'approfondir les études de flux de matière en prenant en compte l'effet des variations du pH intracellulaire sur les activités enzymatiques. Le but était également de réaliser des bilans macrocinétiques et de mieux comprendre la corrélation entre la chute du potentiel d'oxydoréduction et le déclenchement de la production des pristinamycines.

Cette étude s'est heurtée à la grande difficulté de maîtrise du procédé de production des pristinamycines. En effet, **la production des pristinamycines présente une grande variabilité ainsi que des problèmes de reproductibilité**. Lors du changement de réacteur, dans les mêmes conditions de culture à l'exception de la géométrie du réacteur, la culture a permis une biomasse maximale inférieure à celle de la culture de référence et n'a pas permis de produire les pristinamycines. L'augmentation de la vitesse initiale d'agitation a permis de restituer une croissance et une biomasse similaire à celle de la culture de référence sans toutefois permettre la production des pristinamycines.

Après optimisation de la production en fioles d'Erlenmeyer, l'application des paramètres optimisés a permis d'obtenir une production de pristinamycines lors des cultures en réacteur. Cependant, le déclenchement de la production ainsi que les concentrations maximales en pristinamycines ont varié d'une culture à l'autre alors que les titres en biomasse sont similaires.

L'une des cultures précédemment réalisées au laboratoire (Corvini, 2000) et ayant produit des antibiotiques a été utilisée comme cultures de référence. Au cours de cette culture, les activités spécifiques de certaines enzymes du métabolisme central ont été mesurées ainsi que les variations du pH intracellulaire. Afin de compléter ces travaux antérieurs, les activités spécifiques ont été corrigées par les valeurs du pH intracellulaire. **L'introduction de l'influence du pH intracellulaire, sur les activités enzymatiques mesurées engendre peu de variations par rapport aux mesures brutes effectuées**. L'isocitrate déshydrogénase présente cependant une forte baisse d'activité précédemment à la production des pristinamycines lors de la production des acides organiques. En dépit de la plus faible activité de l'isocitrate déshydrogénase, comparée à l'activité de la PEPc lors de la production de

succinate et de lactate, cette activité est cependant élevée et ne semble donc pas être à l'origine de la production d'acides organiques. L'engorgement des flux conduisant à la production d'acides organiques pourrait être dû aux activités de la citrate synthase et/ou de l'aconitase, qui n'ont pas été dosées, ou encore à la pyruvate déshydrogénase qui présente une faible activité.

Une étude du métabolisme de *S. pristinaespiralis* dans les conditions de culture sans production a ensuite été réalisée. Au cours de ces cultures, la séquence de consommation des substrats est identique à celle observée lors de la culture de référence ayant produit. Le glutamate est d'abord consommé, puis, lorsqu'il est épuisé, le glucose et l'arginine sont utilisés concomitamment. **La vitesse spécifique de consommation du glucose est cependant plus élevée que lors de la culture de référence.** Ce substrat carboné semble de plus emprunter la voie de la glycolyse préférentiellement à celle des pentoses-phosphate.

Afin de tenter de restaurer la production des pristinamycines, des expériences portant sur les effets de la vitesse d'agitation de la culture, la composition du milieu synthétique ainsi que l'influence de la préculture ont été réalisées. **L'augmentation de la vitesse d'agitation en fioles d'Erlenmeyer permet une production plus précoce des pristinamycines.** Les structures de type pelote semblent également apparaître plus tôt. Il semble donc qu'il y ait une corrélation entre la morphologie de la souche et la production des pristinamycines. **Lors des cultures en bioréacteur** dans les conditions sans production de pristinamycines, **l'augmentation de la vitesse d'agitation permet d'augmenter la quantité de biomasse produite** mais ne permet pas de restituer la production des antibiotiques.

L'état physiologique de la préculture en milieu complexe influence fortement la production des pristinamycines. Deux états différents semblent capables de permettre la production en milieu synthétique : **la phase exponentielle de croissance, permettant une production systématique**, et le début de la phase stationnaire, permettant un meilleur titre en pristinamycines mais une fréquence de production plus faible. De plus, il semble qu'il existe un ou des éléments se trouvant dans le milieu de préculture au moment du repiquage qui favorisent la production des pristinamycines.

Ces études ont permis de définir des paramètres de culture permettant de restaurer la production des pristinamycines. Les conditions optimisées pour la production obtenues en fioles d'Erlenmeyer ont ensuite été transposées aux cultures en réacteur.

Lors de ces cultures en réacteur, la **production des pristinamycines se déclenche de façon précoce, pendant la phase de croissance et alors qu'il ne semble pas exister de limitations nutritionnelles**. Ce phénomène, non encore observé chez *Streptomyces pristinaespiralis* sur milieu MPS2, pourrait être lié à la morphologie. La production d'antibiotiques en absence de limitations nutritionnelles a déjà été observée chez *S. coelicolor* dans le cas de la production d'actinorhodine (Doull et Vining, 1990). Cette biosynthèse semble être obtenue suite à une diminution du taux de croissance, même si les facteurs supposés limitants sont en excès. Cette production pourrait être liée à la morphologie de *S. coelicolor*, qui forme des pelotes denses à l'intérieur desquelles il existerait des limitations nutritionnelles.

L'étude physiologique de la souche produisant dans ces nouvelles conditions a alors été effectuée. Dans toutes les cultures réalisées, productrices ou non, l'arginine et le glucose sont consommés simultanément. Lors des études précédentes, il en avait été déduit que l'arginine était utilisée comme source d'azote uniquement. Cependant au cours de deux des cultures réalisées à partir d'un inoculum âgé de 20 h une production d'ammonium a pu être observée, coïncidant avec la vitesse spécifique de consommation maximale de l'arginine et alors que le glutamate était épuisé dans le milieu. Cet ammonium pourrait donc provenir de l'arginine qui ne serait donc pas consommée uniquement pour son azote, celui-ci étant en partie dissipé sous forme d'ammonium. D'autre part, l'arginine peut, entre autres métabolites, conduire à du succinate. Or, dans cette même culture, le succinate n'est pas excrété dans le milieu aussi fortement que lors de la culture de référence. En supposant que ce succinate provienne bien de l'arginine, les faibles concentrations dosées ainsi que l'excrétion d'ammonium lors de la consommation d'arginine, laissent supposer que **l'arginine pourrait également être utilisée comme source de carbone par *S. pristinaespiralis***.

Lors de ces cultures, **les acides organiques sont excrétés en quantités beaucoup plus faibles** que dans la culture de référence, ce qui traduit un métabolisme différent.

Une étude des variations des activités enzymatiques au cours de la culture a également été réalisée et, les variations du pH intracellulaire étant importantes au cours du procédé de production des pristinamycines, cette étude a également été réalisée en intégrant les variations du pH intracellulaire aux activités enzymatiques.

Comme dans le cas de la culture de référence, une augmentation du flux de matière dans la voie des pentoses-phosphate est observée lors de la production des pristinamycines.

Il faut également noter que lors des cultures issues d'un inoculum âgé de 20 h, comme dans le cas des cultures précédentes, les activités mesurées de la PDH et de l' α -KGDH sont très faibles. Si ces faibles valeurs sont réelles et non pas liées aux difficultés de dosage de ces enzymes, alors la production d'acides organiques pourrait provenir d'un engorgement des flux provoqués par ces enzymes.

Une attention particulière a enfin été portée aux variations du potentiel d'oxydoréduction du milieu au cours de ces cultures. Au cours des cultures en réacteur sans production de pristinamycines, les valeurs du potentiel d'oxydoréduction sont proportionnelles à la teneur en oxygène dissous du milieu. Lors des cultures ayant permis la production des pristinamycines, **une chute brutale et importante du potentiel d'oxydoréduction est observée au moment de la production des pristinamycines**. Cette chute n'est pas due uniquement à la variation de la teneur en oxygène dissous du milieu et ne semble pas être due à la présence des pristinamycines. Cette chute pourrait être due à l'accumulation d'autres molécules, ou bien à l'effet protonophore des pristinamycines dont l'excrétion pourrait entraîner une sortie d'ions hydrogène dans le milieu de culture. Le suivi de la valeur du potentiel d'oxydoréduction du milieu constitue donc un bon outil pour le suivi de la production en ligne des pristinamycines, que ce soit en mode continu ou discontinu.

PERSPECTIVES

En dépit des deux thèses réalisées au laboratoire sur *S. pristinaespiralis*, le mécanisme de déclenchement de la production des pristinamycines n'est toujours pas élucidé. Différentes études peuvent être envisagées afin d'approfondir nos connaissances sur ce phénomène.

- **Influence du potentiel d'oxydoréduction sur la production des pristinamycines.**

Dans la mesure où des paramètres physico-chimiques peuvent intervenir sur la production des métabolites secondaires et notamment sur la production d'antibiotiques, des modifications du potentiel d'oxydoréduction provoquées artificiellement lors de cultures en réacteur pourraient permettre de déterminer si la chute du potentiel d'oxydoréduction est à l'origine de la production des pristinamycines.

- **Etude morphologique en bioréacteur**

Une étude de la morphologie des cellules lors des cultures en réacteur inoculées à partir d'une préculture âgée de 20 h permettrait de déterminer l'évolution des types de structures présentes au cours du temps. La production ayant lieu alors qu'il ne semble pas exister de limitation en substrat, l'étude de la morphologie permettrait de déterminer si *Streptomyces pristinaespiralis* forme des structures de type pelotes denses pouvant provoquer des limitations à la diffusion des substrats au sein de la pelote et ainsi expliquer la production des pristinamycines.

- **Etude de l'effet de l'agitation indépendamment de l'aération**

En couplant la régulation de la teneur en oxygène dans le réacteur à une entrée d'azote et d'oxygène, il est possible de faire varier la vitesse d'agitation sans modifier la teneur en oxygène du milieu et *vice versa*. Ce montage permettrait d'étudier indépendamment l'influence, sur la croissance de la souche mais également sur la production des antibiotiques, de la vitesse d'agitation et de la teneur en oxygène dissous. De plus, ce système permettrait d'étudier l'influence des forces de cisaillement (liées à l'agitation) sur la morphologie de la souche sans qu'il y ait d'interférence avec la teneur en oxygène.

- **Dosage des activités PDH et α -KGDH**

Les faibles activités de la PDH et de α -KGDH pourraient être à l'origine d'un engorgement des flux observé lors de la culture de référence. Cependant, la difficulté de dosage de ces deux enzymes, ayant une sous-unité commune, ainsi que les faibles activités systématiquement mesurées, permettent de se demander si ces dernières sont représentatives de la réalité. Une mesure de l'expression des gènes de biosynthèse de ces enzymes pourrait permettre d'évaluer les besoins de la cellule au cours du temps.

- **Affiner les schémas métaboliques : devenir des substrats**

Afin de compléter les schémas métaboliques, il serait intéressant de déterminer si l'arginine est utilisée ou non comme source de carbone. Soit par un dosage des enzymes impliquées dans le catabolisme de l'arginine, soit *via* l'utilisation d'un marquage de l'arginine. De plus,

un marquage du glucose et du glutamate pourrait permettre d'affiner l'étude des flux carbonés chez *S. pristinaespiralis*.

- **Affiner les bilans de matière**

Le dosage du CO₂ produit, ainsi que le dosage de l'azote et du carbone totaux présents dans le surnageant au cours des cultures permettraient d'affiner les bilans de recouvrement de matière.

De plus le dosage du glycérol, outre son intérêt pour le bilan de recouvrement de matière pourrait donner une information sur d'éventuelles limitations "localisées" au sein de pelotes en phosphate, puisque la production de glycérol est systématiquement observée lorsque le phosphate devient limitant (Voelker et Altaba, 2001).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbé J., Capmau M.L., Vinimian E. et Le Goffic F. (1982). Contribution à l'étude du mécanisme d'action des pristinamycines. *Eur. J. Med. Chem.* **17** (6) : 542-546.

Aharonowitz Y. et Demain A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14** (2) : 159-164.

Aharonowitz Y. et Friedrich C.G. (1980). Alanine dehydrogenase of the beta-lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* **125** (1-2) : 137-142.

Akashi K., Ikeda S., Shibai H., Kobayashi K. et Hirose Y. (1978). Determination of redox potential levels critical for cell respiration and suitable for L-leucine production. *Biotechnol. Bioeng.* **20** (1) : 27-41.

Alves A., Euverink G., Hektor H., Hessels G., van der Vlag J., Vrijbloed J., Hondmann D., Visser J. et Dijkhuizen L. (1994). Enzymes of glucose and methanol metabolism in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *J. Bacteriol.* **176**, 22: 6827-6835.

Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. et Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* **5** (2) : 109-114.

Aumercier M., Lacroix P., Capmau M.L. et Le Goffic F. (1985). Dérivés hydrosolubles du facteur A_I de pristinamycines, interaction avec le ribosome bactérien. *Path. Biol.* **33** (5 bis) : 497-501.

Aumercier M., Bouhallab S., Capmau M.L. et 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.

Avignone Rossa C., White J., Kuiper A., Postma P.W., Bibb M., et Teixeira de Mattos M.J. (2002). Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostat cultures of *Streptomyces lividans*. *Metab. Eng.* **4** (2) :138-150.

Bamas-Jacques N., Lorenzon S., Lacroix P., De Swetschin C. et 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. et Desnottes J.F. (1998). Recent developments in streptogramin research. *Curr. Pharm. Design.* **4** : 155-180.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J.,

Barrell B.G., Parkhill J. et Hopwood D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. **417** (6885) : 141-147.

Blanc V., Blanche, F., de Crecy-Lagard V., Crouzet J., Debussche L., Jacques N., Lacroix P., Thibaut D et Zagorec M. (1994). Polypeptides involved in streptogramins biosynthesis, nucleotide sequences coding for said polypeptides and used thereof. *Patent Cooperation 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. et 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. et Crouzet J. (1995 a). 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.

Blanc V., Salah-Bey K., Folcher M., et Thompson C.J. (1995 b). Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol. Microbiol.* **17** (5) : 989-999.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 1-2: 248-254.

Bramwell H., Nimmo H.G., Hunter I.S., et Coggins J.R. (1993). Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): purification of the enzyme, cloning of the *ppc* gene and over-expression of the protein in a streptomycete. *Biochem. J.* **293** (Pt 1) :131-136.

Brana A.F., Paiva N. et Demain A.L. (1986). Pathway and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligeris*. *J. Gen. Microbiol.* **132** : 1305-1317.

Brana A.F. et Demain A.L. (1988). Nitrogen control of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. In: *Nitrogen source control of microbial processes*. Ed. Sanchez-Esquivel. Boca Raton, FL : CRC Press. pp 99-119.

Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., et Vobis G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. *Biotechnologie des antibiotiques* (édition Masson) p33-70.

Bushell M.E. (1988). Growth, product formation and fermentation technology. Actinomycetes in biotechnology. 185-217.

Bushell M. (1989). The process physiology of secondary metabolite production. In: *Microbial products : new approaches*. (Baumberg S., Hunter I. and R. M.), pp. 95-120. Cambridge University Press: Cambridge.

Chakraborty R, Bibb M. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179** (18) : 5854-5861.

Chater K.F. et Merrick M.J. (1979). *Streptomyces*. Developmental biology of procaryotes. Parish J. H. ed., University of California Press : 93-114.

Chen H. C. et Wilde F. (1991). The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, (6) : 591-595.

Cheng Y.R., Fang A., et Demain A.L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** (6) : 1096-8.

Clark G.J., Langley D. et Bushell M.E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation : investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology.* **141** : 663-669.

Cochrane V. W., Peck H. D., Jr et Harrison A. (1953). The metabolism of species of *Streptomyces*. VII. The hexosemonophosphate shunt and associated reactions. *J. Bacteriol.* **66**, 1: 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. et Vannufel P. (1997). Inhibition of protein biosynthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemoth.* **39**, Suppl. A : 7-13.

Coggins J.R., Hunter I.S., Nimmo H.G. Bramwell H. Taylor R.D. Walker G.E. White P.J. et Wylie A. (1995). Deregulation of fluxes to precursors of secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*. Internal report, Dept. Biochem. And Genetic, Glasgow Univ., UK.

Corvini P.F.X. (2000). Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activité enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire. Thèse de doctorat, ENSAIA INPL, Nancy, France.

Corvini P.F.X., Gautier H., Rondags E., Vivier H., Goergen J.L. et Germain P. (2000). Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis. *Microbiology.* **146**. 2671-2678.

Corvini P.F.X., Vivier H., Germain P. et Goergen J.-L. (2001). Physiologie et métabolisme de *Streptomyces pristinaespiralis* au cours d'un procédé de production des pristinamycines. *Récents progrès en génie des Procédés.* **15** : 345-352.

Corvini P.F.X., Delaunay S., Maujean F., Rondags E., Vivier H., Goergen J.-L. et Germain P. (2004). Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. *Enzyme Microb. Technol.* **34**, 2: 101-107.

- Crécy-Lagard V., Blanc V., Gil P., Naudin L., Lorenzon S., Famechon A., Bamas-Jacques N., Crouzet J. et Thibaut D. (1997 a).** Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* : molecular characterisation of the first two structural peptide synthase genes. *J. Bacteriol.* **179** (3) : 705-713.
- Crécy-Lagard V., Saurin W., Thibaut D., Gil P., Naudin L., Crouzet J. et Blanc V. (1997 b).** Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae* : molecular characterisation of the last structural peptide synthase gene. *Antimicrob. Agent Chemother.* **41** (9) : 1904-1909.
- Cunin R., Glansdorff N., Pierard A. et Stalon V. (1986).** Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50** (3) : 314-352.
- Curdova E., Jechova V., Zima J. et Vanek Z. (1989).** The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *J. Basic Microbiol.* **6** : 341-346.
- Daae E. B. et Ison A.P. (1999).** Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans*. *Metab. Eng.* **1** (2) : 153-165.
- Daza A., Martin J.F., Dominguez A. et Gil J. A. (1989).** Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 9, 2483-2491.
- Delaunay S., Rondags E. et Germain P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. *Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique.* J 6 008 1-12.
- Demain A.L. (1982).** Catabolite regulation in industrial microbiology. In : Overproduction of microbial products. Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z. eds., Academic Press, London. pp 3-19.
- Demain A.L., Aharanowitz Y. et Martin J.F. (1983).** Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. In : Vining (Ed.) Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. Addison-Wesley, London, pp 49-67.
- Demain A.L. et Zhang J. (1998).** Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Crit. Rev. Biotechnol.* **18** (4) : 283-294. Review.
- Dekleva, M. et Strohl, W. (1987).** Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 12, 1129-1132.
- Dekleva M.L. et Strohl W.R. (1988 a).** Biosynthesis of epsilon-rhodomyacinone from glucose by *Streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. *Can. J. Microbiol.* **34** (11) : 1235-1240.
- Dekleva M.L. et Strohl W.R. (1988 b).** Activity of phosphoenolpyruvate carboxylase of an anthracycline-producing streptomycete. *Can. J. Microbiol.* **34** (11) : 1241-1246.

- Doull J.L. et Vining L.C. (1990).** Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 4: 449-454.
- Drouin J.-F. (1996).** Analyse d'image en biotechnologie. Quantification de la morphologie de micro-organismes filamenteux au cours de fermentations et suivi de la croissance de cellules animales sur microporteurs au cours de cultures. Thèse de doctorat, ENSAIA INPL, Nancy, France.
- Dunstan G.H., Avignone-Rossa C., Langley D. et Bushell M.E. (2000).** The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 7, 502-510.
- el-Enshasy H.A., Farid M.A. et el-Sayed e.-S.A. (2000).** Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* **40**, 5-6, 333-342.
- Elibol M. (2002).** Product shifting by controlling medium pH in immobilised *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture. *Process Biochem.* **37** (12) : 1381-1386.
- Folcher M., Gaillard H., Nguyen L.T., Nguyen K.T., Lacroix P., Bamas-Jacques N., Rinkel M., Thompson C.J. (2001).** Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **276** (47) : 44297-44306.
- Gesheva V., Ivanova V. et Gesheva R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* **160**, 3, 243-248.
- Godel H., Seitz P. et Verhoef M. (1992).** Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-CI precolumn derivatization. *LC GC Int.* **5**, 44-49.
- Hesketh A., Sun J., Bibb M. (2001).** Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39** (1) : 136-144.
- Hitchman M.L. (1978).** Measurement of dissolved oxygen. New-York, John Wiley & Sons, *Wiley Interscience*. pp 132.
- Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A. et Oliver S.G. (1989).** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31** : 272-277.
- Hodgson D.A. (2000).** Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 47-238.
- Horinouchi S. et Beppu T. (1992).** Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46** : 377-398.
- Hostalek Z., Tinterova M., Jechova V., Blumauerova M., Suchy J. et Vanek Z. (1969).** Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 4, 539-548.

- James P.D., Edwards C. et Dawson M. (1991).** The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.* **137** (Pt 7) : 1715-20.
- Jetten M.S., Gubler M.E., Lee S.H., Sinskey A.J. (1994).** Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (7) : 2501-2507.
- Jolles G., Terlain B. et Thomas J.P. (1965).** Metabolic investigations on pristinamycin. *Nature.* **207** : 199-200.
- Jonsbu E., Ellingsen T.E. et Nielsen J. (2000).** Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. *J. Antibiot.* **53** (12) : 1354-1362.
- Jonsbu E., Christensen B., et Nielsen J. (2001).** Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** : 93-100.
- Jonsbu, E., McIntyre, M. et Nielsen, J. (2002).** The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J Biotechnol.* **95** (2) : 133-44.
- Jüsten P., Paul G.C., Nienow A.W et Thomas .G.R. (1998 a).** Dependence of *Penicillium chrysogenum* Growth, Morphology, Vacuolation, and Productivity in Fed-Batch Fermentations on Impeller Type and Agitation Intensity. *Biotechnol. Bioeng.* **59** (6) : 762-775.
- Jüsten P., Paul G.C., Nienow A.W. et Thomas C.R. (1998 b).** A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Eng.* **18** : 7 - 16.
- Kendrick K.E., Ensign J.C. (1983).** Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.* **155** (1) : 357-366
- Khokhlov A.S. et Tovarova I.I. (1979).** Autoregulator from *Streptomyces griseus*. In : Regulation of secondary product and plant hormone metabolism. Luckner M., Schreiber K. eds. Pergamon Press, Oxford. pp 133–145.
- Kim E. S., Hong H.J., Choi C.Y. et Cohen S.N. (2001).** Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. *J. Bacteriol.* **183** (7) : 2198-203.
- 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. et Yamada Y. (1997).** Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 6986–6993.
- Lacroix P., Capmau M.L. et Le Goffic F. (1984).** Pristinamycin accumulation by *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot.* **37** (10) : 1246-1252.

- Lamsaïf D. (1992).** Effets des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse INPL. Nancy, France.
- Largeron M. et Fleury M.B., 1992.** Acid base properties of pristinamycin I_A and related compounds. *J. Pharm. sci.* Vol.81, N°6, 565-568.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. *Edition Masson* : 1-70.
- Leblond P., Demuyter P., Moutier L., Laakel M., Decaris B. et Simonet J.M. (1989).** Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Bacteriol.* **171** (1) : 419-423.
- Lebrihi, A., Lefebvre G., et Germain P. (1987).** Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26** :130-135.
- Lebrihi A., Lamsaif D., Lefebvre G. et Germain P. (1992).** Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 3, 382-387.
- Lee M.S., Kojima I. et Demain A.L. (1997).** Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19** (2) : 83-86.
- Lefèvre J.W., Glass T.E., Kolpak M.X., Kingston D.G.I. et 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.
- Ling K.H., Paetkau V., Marcus F. et Lardy H.A. (1966).** Phosphofructokinase. I. Skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **9** : 425-429.
- Lissac J. et Avril J.L. (1977).** Synergistines, vancomycine et polymyxines. Antibiotiques antibactériens (II) *R.P.* **27** (45) : 2959-2964.
- Locci R. (1989).** *Streptomyces* and related genera. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4.* Ed. Williamset Wilkins. pp. 2451-2508.
- Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1995).** Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.* **31** (5) 304-311.
- Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1996 a).** Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 1-2: 204-211.
- Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1996 b).** Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Process Biochem.* **31** (1) : 13-20.

- Lubbe C., Demain A.L. et 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.
- Majumdar M.K. et Majumdar S.K. (1971).** Synthesis of neomycin by washed mycelium of *Streptomyces fradiae* and some physiological considerations. *Folia Microbiol.* **16** (4) : 285-292.
- Martin J.F. (1977).** Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* **6** : 105-127.
- Martin J.F. et Demain A.L. (1976).** Control by phosphate of candicidin production. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **71** (4) : 1103-1109.
- Martin J.F. et Demain A.L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* **44** : 230-251.
- Mauss P., Drouin J.F., Pons M.N., Vivier H., Germain P., Louvel L. et Vanhoutte B. (1997).** Location of respiration activity in filamentous bacteria by image analysis. *Biotechnol. Tech.* **11** : 813-817.
- Mukhtar T.A., Koteva K.P., Hughes D.W. et Wright G.D. (2001).** Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. *Biochemistry.* **40** : 8877-8886.
- Murchison A. (2002).** Quinupristin-dalfopristin : a streptogramin antibiotic. *Antibiotics review.* **9** (5) : 176-177.
- Naeimpoor F. et Mavituna F. (2000).** Metabolic Flux Analysis in *Streptomyces coelicolor* under Various Nutrient Limitations. *Metab. Eng.* **2**, (2) : 140-148.
- Namwat W, Kamioka Y, Kinoshita H, Yamada Y, Nihira T. (2002).** Characterization of virginiamycin S biosynthetic genes from *Streptomyces virginiae*. *Gene.* **20**;286(2) : 283-290.
- Neuzil J., Novotna J., Behal V. et Hostalek Z. (1986).** Inhibition studies of glucose-6-phosphate dehydrogenase from tetracycline-producing *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8** (5) : 375-378.
- Ng J. et Gosbell I.B. (2005).** Successful oral pristinamycin therapy for osteoarticular infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other *Staphylococcus* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **55** (6) : 1008-1012.
- Novella I.S., Barbes C. et Sanchez J. (1992).** Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **38** (8) : 769-773.
- Obanye A.I.C., Hobbs G., Gardner D.C.J. et 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.

- Oh D.K., Kim S.Y. et Kim J.H. (1998).** Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnol. Bioeng.* **58** (4) : 440-444.
- Ohta N., Park Y.S., Yahiro K. et Okabe M. (1995).** Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.* **79**, (5): 443-448.
- Okanishi M. et Hotta K. (1980).** Regulation of antibiotics production in microorganisms. K. Sakaguchi & M. Okanashi eds., Academic press, NY. *Molec. Breed. Gen. Appl. Microorg.* 9-28.
- Omura S., Tanaka Y., Mamada H., Masuma R. (1984).** Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* **37** (5) : 494-502.
- Omura S., Tanaka Y., Kitao C., Tanaka H., et Iwai Y. (1980).** Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18** (5) : 691-5.
- Papagianni M. (2004).** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* **22** (3) : 189-259. Review.
- Paquet V. (1990).** Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.
- Paquet V., Goma G., Soucaille P. (1992).** Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. Lett.* **14** (11) :1065-1070.
- Parfait R., de Bethune M.P. et Cocito C. (1978).** A spectrofluorimetric study of the interaction between virginiamycin S and bacterial ribosomes. *Mol. Gen. Genet.* **166**, 1, 45-51.
- 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. et Bouanchaud D.H. (1985).** Relations structure-activité de dérivés semi-synthétiques du constituant PI_A de la pristinamycine. *Path. Biol.* **33** : 493-496.
- Pons M.N., Drouin J.F., Louvel L., Vanhoutte B., Vivier H. et Germain P. (1998).** Physiological investigations by image analysis. *J. Biotechnol.* **65** : 3-14.
- Porse B.T., et Garrett R.A. (1999).** Sites of interaction of streptogramin A and antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23S rRNA and the synergisme of their inhibitory mechanisms. *J. Mol. Biol.* **286** : 375-387.
- Preud'homme J., Belloc A., Charpentie Y. et 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. et Belloc A. (1968). Pristinamycine: isolement, caractérisation et identification des constituants. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **2** : 585-591.

Rollmann B. et Rondelet J. (1973). Transformation en milieu acide du facteur M de la virginiamycine. Détermination de paramètres cinétiques. *Ann pharm fr* **31** (6) : 451-456.

Rhone-Poulenc SA (1961). Procédé de préparation d'un antibiotique par une nouvelle souche de *Streptomyces*. Brevet français n° 1-301-857.

Rhone Poulenc SA (1965). patent specification 998,195.

Rhone-Poulenc-Rorer SA (1996). Streptogramines and method for preparing same by mutasynthesis. WO 96/01901.

Rollins M.J., Jensen S.E. et Westlake W.S. (1988). Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *J. ind. microbiol.* **3** : 357-364.

Rondags E., Halliday E. et 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.

Roubos J.A., Krabben P., Luiten R.G., Verbruggen H.B., Heijnen J.J. (2001). A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Prog.* **17**, 2, 336-347.

Salas J.S., Quiros L.M. et Hardisson C. (1984). Pathway of glucose catabolism during germination of *Streptomyces* spores. *FEMS Microbiol. Lett.* **22** : 229-233.

Samra Z., Ofer O. et Shmueli H. (2005). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin, teicoplanin, linezolid, pristinamycin and other antibiotics. *Isr. Med. Assoc. J.* **7** (3) : 148-150.

Schwartz D. et Kaspar S., Kienzlen G., Muschko K., et Wohlleben W. (1999). Inactivation of the tricarboxylic acid cycle aconitase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 impairs morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* **181**, 22, 7131-5.

Schwinde J.W., Hertz P.F., Sahn H., Eikmanns B.J., et Guyonvarch A. (2001). Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology.* **147**: 2223 - 2231.

Sezonov G., Blanc V., Bamas-Jacques N., Friedmann A., Pernodet J.L., et Guérineau M. (1997). Complete conversion of antibiotic precursor to pristinamycin II A by overexpression of *Streptomyces pristinaespiralis* biosynthetic gene. *Nat. Biotechnol.* **15** : 349-354.

Sheu D.C., Duan K.J., Jou S.R., Chen Y.C. et Chen C.W. (2003). Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. *Biotechnol. Lett.* **25**, 24: 2065-2069.

- Shimotohno K.W., Imai S., Murakami T. et Seto H. (1990).** Purification and characterization of citrate synthase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 and comparison of its properties with those of 2-phosphinomethylmalic acid synthase. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2: 463-70.
- Shioya S., Morikawa M., Kajihara Y. et Shimizu H. (1999).** Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**, (2) : 164-169.
- Srere P. A. (1969).** Citrate synthase. *Methods Enzymol.* **13** : 3-6.
- Sukharevich M.E., Iakovleva E.P., Borisova O.G. et Sukharevich V.I. (1998).** Effect of aeration and redox potential on the biosynthesis of the antibiotic imbricin. *Antibiotiki i Khimioterapiia = Antibiotics And Chemoterapy [Sic] / Ministerstvo Meditsinskoi i Mikrobiologicheskoi Promyshlennosti SSSR.* **43**, (12) : 12-15.
- Sukharevich, V. I., Iakovleva, E. P., Shvetsova, N. N. et Medvedeva, N. G. (1978).** Acitivity of the oxidoreductases of *Actinomyces levoris* strain No. 28 cultured on a medium with varying redox potential values. *Antibiotiki.* **23**, (10) : 875-879.
- Surowitz K.G. et Pfister R.M. (1985).** Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 702-706.
- Takebe, H., Matsunaga, M., Hiruta, O., Satoh, A. et Tanaka, H. (1991).** Relationship between sugar consumption and tricarboxylic acid cycle enzyme activity in a high bialaphos-producing strain. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, (2) : 110-113.
- Tamura S., Park Y., Toriyama M. et Okabe M. (1997).** Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, (6) : 523-528.
- Tenson T., Lovmar M. et Ehrenberg M. (2003).** The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J. Mol. Biol.* **330**, (5) : 1005-1014.
- Thibaut D., Ratet N., Bisch D., Faucher D., Debussche L. et 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. et Blanche F. (1997).** Purification of peptide synthetases involved in pristinamycin I biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179** (3) : 697-704.
- Uy D. (2003).** Etude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit. Thèse de Doctorat ENSAIA. INPL., Nancy, France.
- Vannuffel P. et Cocito C. (1996).** Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs.* **51** (suppl.1) : 20-30.

- Vekshin G.A. et Malkov M.A. (1986).** Oxidation-reduction status of the culture medium during the biosynthesis of amphotericin B. *Antibiotiki i Meditsinskaia Biotekhnologiia = Antibiotics And Medical Biotechnology / Ministerstvo Meditsinskoi Promyshlennosti SSSR.* **31**, (7) : 522-524.
- Viollier, P. H., Minas, W., Dale, G. E., Folcher, M. et Thompson, C. J. (2001 a).** Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, (10) : 3184-3192.
- Viollier P.H., Nguyen K.T., Minas W., Folcher M., Dale G.E. et Thompson C.J. (2001 b).** Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **183**,(10) : 3193-3203.
- Visser J., Kester H., Jeyaseelan K. et Topp R. (1982).** Pyruvate dehydrogenase complex from *Bacillus*. *Methods Enzymol.* **89**, Part D, 399-407.
- Vlasov, V.I. (1996).** Effect of redox potential of culture broth on oxytetracycline biosynthesis. *Antibiotiki i Khimioterapiia = Antibiotics And Chemoterapy [Sic] / Ministerstvo Meditsinskoi i Mikrobiologicheskoi Promyshlennosti SSSR.* **41**, (4) : 23-29.
- Voelker F. et Altaba S. (2001).** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristnamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology.* **147** : 2447-2459.
- Vu-Trong K., Bhawapathanapun S. et Gray P.P. (1980).** Metabolic regulation in tylosin producing *S. fradiae* : regulatory role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylonolide precursors. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **7** : 519-525
- Walker M.S. et Walker J.B. (1971).** Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidinodeoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino)phosphate. *J. Biol. Chem.* **246** (22) : 7034-7040.
- Wallace K.K., Payne G.F. et Speedie M.K. (1990).** Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. *J. Ind. Microbiol.* **6** (1) : 43-48.
- Wang L, Vining LC. (2003).** Control of growth, secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 by jadW(1), a member of the afsA family of gamma-butyrolactone regulatory genes. *Microbiology.* **149** (Pt 8) : 1991-2004.
- Weinberg D. (1978).** Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.* **23** (6) : 496-504.
- Yamada Y. (1999).** Autoregulatory factors and regulation of antibiotic production in *Streptomyces*. In *Microbial Signaling and Communication* (Society for General Microbiology Symposium no. 57), pp. 177–196. Edited by R.R. England, G. Hobbs, N.J. Bainton & D. McL. Roberts. Cambridge: Cambridge University Press.
- Yamada Y., Sugamura K., Kondo K., Yanagimoto M. et Okada H. (1987).** The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* (Tokyo). **40**(4):496-504.

Yamada Y. et Nihira T. (1998). Microbial hormones and microbial chemical ecology. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 8, pp. 377–413. Edited by D. H. R. Barton & K. Nakanishi. Oxford: Elsevier.

Annexe 1 : Préparation du milieu ICS

La préparation du milieu ICS se fait en deux étapes : tout d'abord la préparation du cornsteep, puis, la préparation du milieu complet.

Le corn steep est préparé en solution à $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ et autoclavé 20 minutes à 120°C .

Cette solution est ensuite centrifugée puis le surnageant est passé sur filtre plissé. Le filtrat est alors utilisé pour la préparation du milieu ICS :

cornsteep en solution : 40 % (V/V)

saccharose : $15,0 \text{ g.L}^{-1}$

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $10,0 \text{ g.L}^{-1}$

KH_2PO_4 : $1,0 \text{ g.L}^{-1}$

NaCl : $3,0 \text{ g.L}^{-1}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$: $0,2 \text{ g.L}^{-1}$

Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution de NaOH 30%

CaCO_3 : $1,25 \text{ g.L}^{-1}$.

Le milieu est réparti à raison de 40 mL par fiole d'Erlenmeyer chicanée de 250 mL. La stérilisation se fait par autoclavage, 20 minutes à 120°C .

Annexe 2 : Préparation du milieu de culture synthétique MPS2

Afin d'éviter les réactions de Maillard, le glucose est préparé séparément et concentré quatre fois soit : 120 g.L^{-1} .

Afin de faciliter la dissolution du glucose, l'eau distillée est chauffée avant d'ajouter le glucose. Le volume est ensuite ajusté. La solution de glucose est autoclavée 20 minutes à 120°C .

Le reste du milieu est préparé concentré de la façon suivante :

acide malonique : 10 g.L^{-1}

Le pH de la solution est ajusté à 6,0 avec une solution de NaOH 30 %.

Les autres composants du milieu sont ensuite ajoutés :

L-arginine : $4,00 \text{ g.L}^{-1}$

L-glutamate : $2,00 \text{ g.L}^{-1}$,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$: $0,40 \text{ g.L}^{-1}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$: $0,02 \text{ g.L}^{-1}$

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$: $0,73 \text{ g.L}^{-1}$

MOPS : $26,66 \text{ g.L}^{-1}$

Le pH est alors ajusté à 6,8 par l'ajout d'une solution de NaOH 30 %.

Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 minutes à 120°C .

Les sels sont préparés en solutions concentrées :

K_2HPO_4 : 375 g.L^{-1}

CaCl_2 : 200 g.L^{-1}

Ces solutions sont stérilisées sur filtre Millex® $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore) et ajoutées au reste du milieu stérilement et séparément pour éviter la précipitation des sels.

Le milieu entier est reconstitué en additionnant 1 volume de glucose à 3 volumes du reste du milieu en fiole d'Erlenmeyer chicanée. Chaque sel est ajouté à 0,2 % (V/V), en homogénéisant entre chaque ajout.

Lors de la préparation d'un réacteur, le milieu est préparé sans MOPS, et le $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ est ajouté au milieu après ajustement du volume final. Enfin, 1 mL de polypropylène glycol est ajouté dans le milieu avant l'autoclavage.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean-François CAVIN, Professeur, ENSBANA, Université de Bourgogne, Dijon

Monsieur Armel GYUONVARCH, Professeur, IGM, Université Paris-Sud, Orsay

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame SAFFROY Sophie

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 février 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé :

Au cours de ce travail, il est apparu que la production des pristinamycines par *S. pristinaespiralis* présentait une grande variabilité ainsi que des problèmes de reproductibilité. En effet, lors de la réalisation d'une culture selon un protocole précédemment établi, mais dans un réacteur de géométrie différente, la production de pristinamycines n'était plus observée. Suite à des études sur l'influence de la vitesse d'agitation, de la composition du milieu synthétique et de l'état physiologique de l'inoculum, un nouveau procédé de production en réacteur en mode discontinu a été mis au point. De façon surprenante, au cours de celui-ci, la production des pristinamycines se déclenche lors de la phase de croissance et en absence de limitations nutritionnelles apparentes. La vitesse de consommation du glucose est plus élevée que lors des cultures antérieures à ces travaux, et les acides organiques tels que le lactate et le succinate sont excrétés en très faibles quantités. Lors de ces cultures, le potentiel d'oxydoréduction du milieu chute brutalement lors du déclenchement de la production, ce qui peut constituer un indicateur utile pour le suivi des cultures. Une étude des variations des activités enzymatiques du métabolisme central ainsi qu'un suivi des variations du pH intracellulaire (pHi) au cours de la culture ont également été réalisés. Les activités enzymatiques mesurées ont été corrigées selon les variations du pHi. Il ressort de cette étude microcinétique que la voie des pentoses-phosphate semble être une voie importante pour la synthèse des pristinamycines. Cette observation est en accord avec son activité régénératrice de co-facteurs réduits (NADPH) utilisés lors de la biosynthèse de ces antibiotiques.

Title : Study of the carbonated metabolism of *Streptomyces pristinaespiralis*.

Abstract :

During this study, pristinamycins production showed variability and reproduction troubles. When a culture was made following the previous experimental procedures but using a different bioreactor, no pristinamycins production was observed. After experimentations on agitation speed, medium composition and inoculum age effect, a new procedure for batch reactor cultures was set. Surprisingly, in these conditions, pristinamycins production occurred during growth phase and without apparent nutritional limitation. Glucose consumption is high, and organic acids as succinic acid and lactic acid were poorly excreted. During these cultures, the redox potential decreased while the pristinamycins production occurred. This could be useful for cultures monitoring. Enzymatic activities of the central metabolism and intracellular pH (pHi) were also assayed during these cultures. Taking into account the pHi for the specific activities led to few differences from the assayed values. The pentoses-phosphate pathway seemed to be important for pristinamycins synthesis. This is in accordance with its reduced co-factors regeneration activity, such as NADPH, which are necessary for the pristinamycins production pathway.

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Mots-clés : *Streptomyces pristinaespiralis*, pristinamycines, physiologie microbienne, métabolisme, potentiel d'oxydoréduction, fermentation discontinue, pH intracellulaire, enzyme intracellulaire

Laboratoire Biocatalyse-Bioprocédés. ENSAIA-INPL
2, avenue de la Forêt de Haye. BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy. France