



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 de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

[M] 1992 LAAKEL, M.

THESE

présentée par

Mohamed LAAKEL

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité:

Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet:

**BIOSYNTHESE DE LA SPIRAMYCINE PAR *Streptomyces ambofaciens*:
REGULATION DE LA BIOSYNTHESE ET CARACTERISATION
DE L'ACETATE KINASE ET DES SYSTEMES FOURNISSEURS
DU MALONYL-CoA**

Soutenue publiquement le 07 juillet 1992, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury:

Président: Mr P. GERMAIN

Rapporteurs: Mr G. DUMENIL
Mr J. J. SANGLIERExamineurs: Mr G. LEFEBVRE
Mr F. SCHNEIDER
Mr J.L. SIMON

À Naïma

À mes parents

À ma famille

À mes amis

Je dédie cette thèse.



AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Industrielle (ENSAIA-INPL), dirigé par le Professeur P. GERMAIN.

Je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici toute ma profonde gratitude pour son accueil bienveillant et pour la formation scientifique que j'ai pu acquérir dans son laboratoire. Je tiens ici à lui adresser mes vifs remerciements et ma sincère reconnaissance pour ses précieux conseils, pour l'intérêt qu'il porte à ce sujet et pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée. Je suis honoré qu'il ait accepté de présider le Jury de cette thèse.

Ce travail a été dirigé par Monsieur F. SCHNEIDER, Maître de Conférences à l'Université de Nancy 1, que je tiens à remercier pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et avoir su me conseiller tout au long de cette recherche. Je suis particulièrement touché par sa gentillesse tant dans le domaine scientifique que dans le domaine humain.

J'exprime mes remerciements à Monsieur J. J. SANGLIER, Chef de Groupe Biotechnologie (Sandoz- SUISSE) et chargé de cours, Microbiologie Appliquée, à l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, rapporteur de cette thèse, qui m'a fait le grand honneur de juger mon travail.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Monsieur G. DUMENIL, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille 11 (faculté de Pharmacie), d'avoir accepté la lourde charge d'un rapporteur et d'avoir à juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur G. LEFEBVRE, Professeur de Microbiologie alimentaire à l'ENSAIA, pour avoir accepté d'être membre de ce Jury et pour sa collaboration scientifique à ce sujet.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur J. L. SIMON, animateur scientifique du service "Recherche et développement dans le domaine des procédés biochimiques",

centre de recherche en biotechnologie à Rhône Poulenc-Rorer (Vitry-Sur-Seine) en acceptant de faire partie de ce Jury.

Je ne saurais oublié Monsieur A. LEBRIH, Maître de Conférences à l'ENSAIA, qui, m'a permis grâce à une collaboration très fructueuse et à son savoir-faire dans ce domaine, de contribuer à la réalisation d'une partie décisive de ce travail. Il a été mon soutien pendant les moments difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de tous mes remerciements et mon amitié sincères pour avoir su allier à sa compétence une grande gentillesse.

J'attache une importance particulière à remercier mes camarades ainsi que le personnel des laboratoires de Microbiologie Industrielle et Alimentaire pour l'ambiance amicale et chaleureuse qu'ils ont su créer. (La liste serait trop longue pour mentionner les noms; qu'ils m'en excusent !).

ABBREVIATIONS

AK	:	acétate kinase
ACC	:	acétyl-CoA carboxylase
OADH	:	oxaloacétate déshydrogénase
PDH	:	pyruvate déshydrogénase
CIVDH	:	céto-isovalérate déshydrogénase
OADC	:	oxaloacétate décarboxylase
PDC	:	pyruvate décarboxylase
HPLC	:	chromatographie liquide à haute performance
AS	:	activité spécifique
AT	:	activité totale
PT	:	protéines totales
CoA	:	coenzyme-A
J	:	jours
min	:	minutes
h	:	heures
μl	:	microlitres
μmoles	:	micromoles
nmoles	:	nanomoles
mM	:	millimolaires
nm	:	nanomètres
λ	:	longueur d'onde
Tr	:	temps de rétention
D.E.A.E	:	diéthylaminoéthyl
NH ₄ Cl	:	chlorure d'ammonium
KHCO ₃	:	bicarbonate de potassium
DTT	:	1,4-dithiol-DL-thréitol
pCMB	:	parachloromercuribenzoate
NEM	:	N-éthylmaléimide
NAD ⁺	:	nicotinamide dinucléotide oxydée
NADH	:	nicotinamide dinucléotide réduite
ATP	:	adénosine triphosphate
MgCl ₂	:	chlorure de magnésium
GSH	:	gluthation réduit
BSA	:	sérum albumine bovine
Acétyl-CoA	:	acétyl-coenzyme-A
Malonyl-CoA	:	malonyl-coenzyme-A

TABLE DES
MATIERES

	Pages
I. Introduction	10
II. Revue bibliographique	18
III. Matériel et méthodes	48
IV. Résultats	65
IV. 1. Acétate kinase	65
IV. 1. 1. Régulation de l'acétate kinase	65
IV. 1. 1. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur la production de spiramycine et la production d'acides gras	65
IV. 1. 1. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'acétate kinase	69
IV. 1. 1. 3. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur la production de spiramycine	72
IV. 1. 1. 4. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité spécifique de l'acétate kinase	77
IV. 1. 2. Acyl-kinase en phase exponentielle de croissance	79
IV. 1. 2. 1. Purification partielle de l'activité produite en phase exponentielle de croissance	79
IV.1.2.1.1. Préparation de l'extrait acellulaire	79
IV.1.2.1.2. Ultracentrifugation et traitement au sulfate de streptomycine	80
IV.1.2.1.3. Précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium	80
IV.1.2.1.4. Ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure 10 000	80
IV.1.2.1.5. Filtration sur gel de Séphacryl S-200	81
IV.1.2.1.6. Chromatographie sur colonne de D.E.A.E Séphacel	81
IV.1.2.1.7. Bilan de la purification	81
IV. 1. 2. 2. Caractérisation partielle en phase exponentielle de croissance	81
IV.1.2.2.1. Spécificité de l'acétate kinase vis-à-vis de certains substrats	85
IV.1.2.2.2. Paramètres cinétiques de l'enzyme	85
IV.1.2.2.3. Effet de certains ions divalents sur l'enzyme..	87
IV.1.2.2.4. Effet de la température	90
IV.1.2.2.5. Activateurs et inhibiteurs divers	90

IV.1.2.2.6. Estimation de la masse moléculaire	93
IV.1.2.2.7. Identification du mécanisme de la réaction de l'acétate kinase	94
IV. 1. 3. Acyl-kinase en phase stationnaire de croissance	98
IV. 1. 3. 1. Purification partielle en phase stationnaire.....	98
IV. 1. 3. 2. Caractérisation partielle en phase stationnaire....	100
IV. 1. 4. Discussion et conclusions	102
IV. 2. Formation du malonyl-CoA	107
IV. 2. 1. Mise au point de la méthode de dosage de certaines enzymes par HPLC	108
IV. 2. 1. 1. Dosage de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC).....	110
IV. 2. 1. 2. Dosage de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH), de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la céto-isovalérate déshydrogénase (CIVDH)	116
IV. 2. 1. 3. Autres techniques d'identification du produit de la réaction (malonyl-CoA)	121
IV.2.1.3.1. Chromatographie sur couche mince	121
IV.2.1.3.2. Analyse des spectres des acyl-CoA en HPLC	122
IV. 2. 1. 4. Conclusion	133
IV. 2. 2. Acétyl-CoA carboxylase	133
IV. 2. 2. 1. Stabilité de l'enzyme	134
IV. 2. 2. 2. Régulation de l'acétyl-CoA carboxylase	136
IV.2.2.2.1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'ACC	136
IV.2.2.2.2. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité spécifique de l'ACC	138
IV. 2. 2. 3. Purification partielle de l'ACC	140
IV. 2. 2. 4. Caractérisation partielle de l'ACC	140
IV.2.2.4.1. Paramètres cinétiques de l'enzyme	140
IV.2.2.4.2. Effet du citrate et de certains cations mono-valents sur l'activité de l'enzyme	143
IV.2.2.4.3. Effet de la température	146
IV. 2. 3. Pyruvate déshydrogénase	146
IV. 2. 3. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de la pyruvate décarboxylase (PDC)	148
IV. 2. 3. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de la pyruvate déshydrogénase (PDH).....	148

IV. 2. 4. Oxaloacétate déshydrogénase	151
IV. 2. 4. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'oxaloacétate décarboxylase (OADC).....	151
IV. 2. 4. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH)	151
IV. 2. 5. Discussion et conclusions	155
V. Conclusion générale et perspectives	164
VI. Références bibliographiques	168

I - INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La spiramycine, antibiotique produit par *Streptomyces ambofaciens*, appartient au groupe des antibiotiques macrolides (fig.1).

Les macrolides sont constitués d'un macrocycle lactonique (partie aglycone ou platénolide) auquel sont liés des sucres aminés et/ou des désoxysucres. Ils sont actifs sur les bactéries à gram positif et agissent au niveau des ribosomes. Ils agissent également au niveau des ribosomes mitochondriaux et chloroplastiques de cellules eucaryotes.

Selon le nombre d'atomes du cycle de la partie aglycone, les macrolides sont classés en macrolides à 12, 14 et 16 membres, pour les plus connus.

Parmi les nombreux macrolides découverts pendant les 30 dernières années, plusieurs sont produits industriellement: oléandomycine et érythromycine (macrolides à 14 membres); spiramycine, josamycine, midécamycine et tylosine (macrolides à 16 membres).

La biosynthèse du cycle lactonique s'effectue par condensation d'unités acyl-activées. L'identification de l'origine des atomes de carbone des cycles lactoniques de certains macrolides montre que cette partie a comme précurseurs une ou plusieurs unités d'acides gras à courtes chaînes: acétate, propionate et butyrate activés. Ainsi, l'érythromycine est produite après condensation d'unités propionates; la spiramycine et la tylosine ont comme précurseurs les acides gras à 2, 3 et 4 atomes de carbone.

Toute addition dans les milieux de culture de substrats favorisant la production de ces précurseurs de la biosynthèse du platénolide, favorise la production de l'antibiotique, ce qui montre que la disponibilité en ces précurseurs acyl-activés est une des étapes principales du contrôle de la production de l'antibiotique.

Ces acides gras activés jouent un rôle d'intermédiaires entre les métabolismes primaire et secondaire. Ils sont les produits finaux du catabolisme de certaines voies du métabolisme primaire et servent de précurseurs pour la biosynthèse des macrolides (métabolisme secondaire).

Le métabolisme primaire englobe l'ensemble des voies cataboliques, amphiboliques et anaboliques nécessaires à la synthèse de la biomasse cellulaire et à la production de l'énergie demandée pour la croissance et la maintenance. Dans des conditions

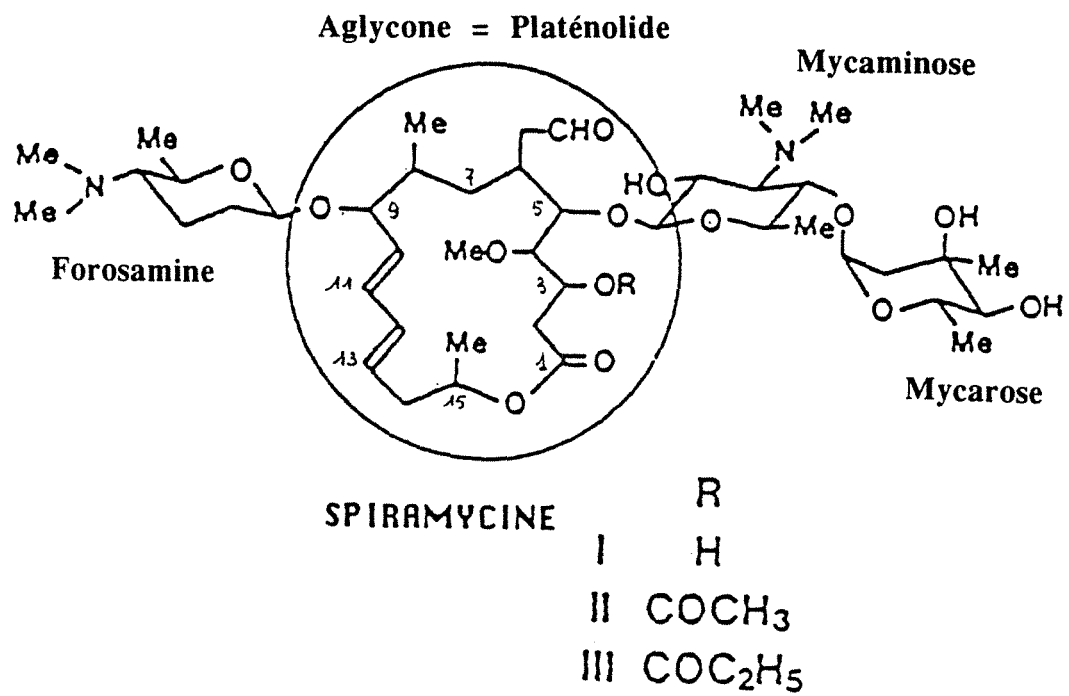


Figure 1 : Structure chimique de la spiramycine.

de culture déterminées, les métabolites primaires sont donc indispensables à l'organisme.

Par opposition, le métabolisme secondaire ne semble remplir aucune fonction nécessaire à la croissance (Dumenil et Sanglier, 1989). Il existe une relation entre la croissance et la production de métabolites secondaires. La régulation du métabolisme secondaire chez les microorganismes semble comprendre à la fois des contrôles nutritionnels et un contrôle par la vitesse de croissance.

Les relations entre métabolisme primaire et secondaire étant une des étapes-clés pour la production des métabolites secondaires, le laboratoire de microbiologie industrielle (INPL) a développé depuis quelques années des recherches sur ces relations, choisissant comme objet expérimental *Streptomyces ambofaciens* et la production de spiramycine. Le choix de ce matériel est dû aux relations de travail avec Rhône Poulenc-Rorer Santé (Vitry sur Seine), Rhône-Poulenc étant le premier producteur mondial de spiramycine.

Si la production industrielle de spiramycine est déjà ancienne, la connaissance de la biochimie et de la régulation de la biosynthèse est beaucoup moins avancée que celle portant sur d'autres macrolides. Le métabolisme primaire même de cette espèce est très peu étudié. Aussi, devant l'importance de la disponibilité en précurseurs acyl-activés pour la production de spiramycine, le laboratoire s'est donné comme premier objectif l'étude des voies conduisant à ces précurseurs, tant lors de la phase de croissance que lors de la phase de production de l'antibiotique.

Les acides gras activés, précurseurs, peuvent provenir du catabolisme d'acides gras à longues chaînes, de l'activation d'acides à courtes chaînes, voire de la glycolyse (fig 2). En ce qui concerne les acides aminés, les études du laboratoire portent sur le catabolisme de la valine, de l'isoleucine et de la lysine, et sur le rôle régulateur de l'ammonium (fig 3). Ces travaux sur le métabolisme azoté appliqués à la production de spiramycine sont complétés par des études sur les différents systèmes d'assimilation de l'ammonium par *S. ambofaciens*. Le métabolisme des acides gras est étudié selon deux approches : catabolisme d'acides gras par β -oxydation, utilisant l'hexanoate comme modèle, activation des acides gras à courtes chaînes. L'étude de l'influence des acides gras à courtes chaînes sur la production de spiramycine est rapportée par Khaoua et coll. (1992).

Les travaux qui font l'objet de cette thèse portent sur l'étude des enzymes d'activation des acides gras à courtes chaînes. Deux

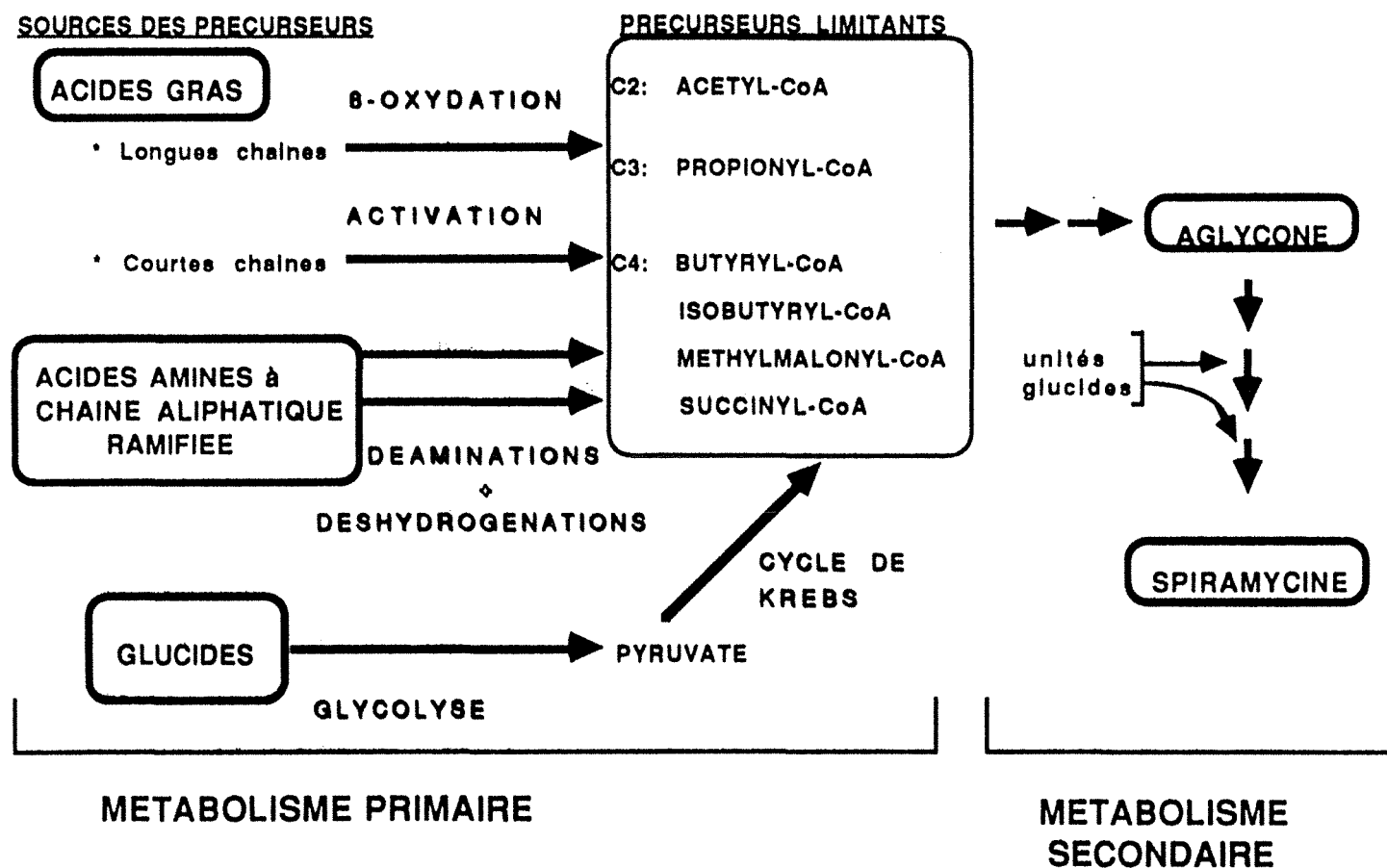


Figure 2 : **ARTICULATION ENTRE LES METABOLISMES PRIMAIRE ET SECONDAIRE**

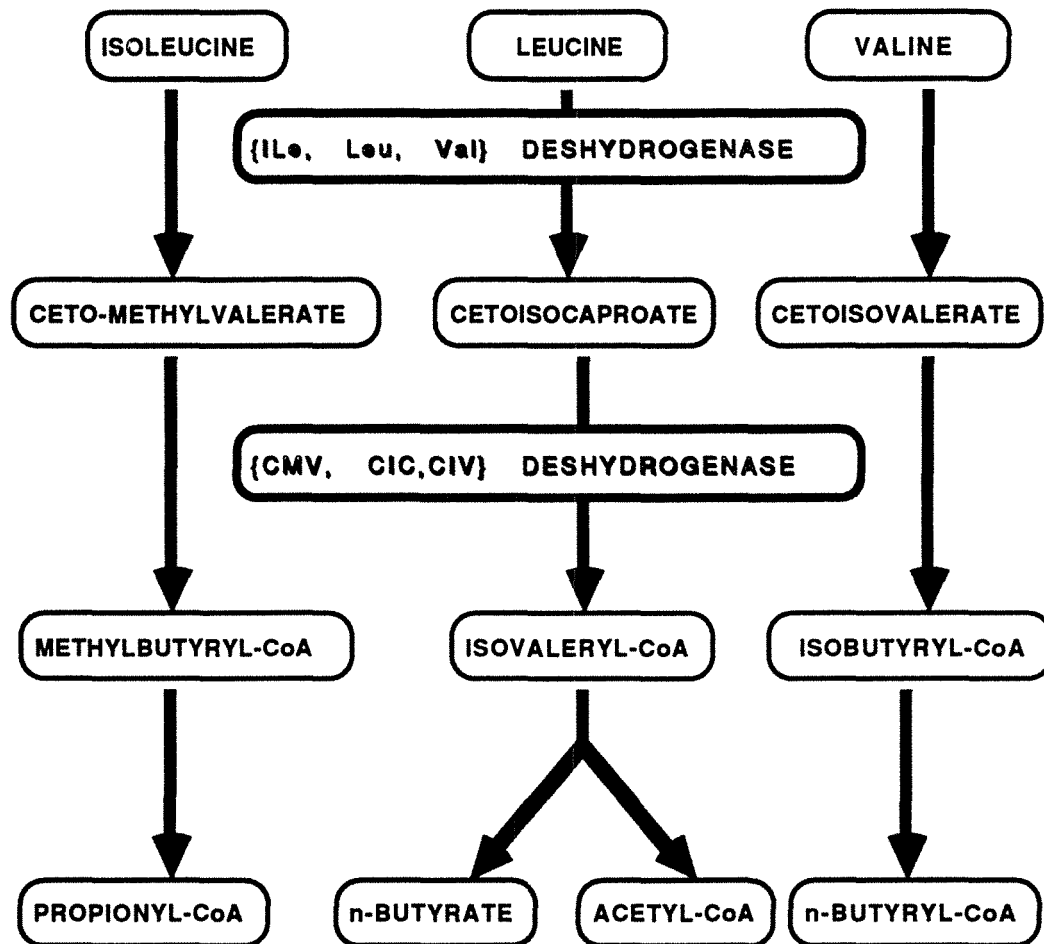


Figure 3 :

CATABOLISME DE LA VALINE,
DE LA LEUCINE ET DE L'ISOLEUCINE

systèmes d'activation conduisant aux acyl-CoA interviennent, le système des acyl-synthétases et celui des acyl-kinases couplées aux acyl-phosphotransférases. Il a été montré, par dosage des activités enzymatiques de ces systèmes lors des phases de croissance et de production de l'antibiotique, que le système des acyl-synthétases n'était présent que lors de la croissance (Khaoua, 1990), et que le système des acyl-kinases et acyl-phosphotransférases présentait deux pics d'activités: l'un pendant la croissance, l'autre pendant la phase de production de l'antibiotique.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier plus précisément le système des kinases pendant les deux phases, croissance et production, afin de déterminer par une approche enzymologique s'il s'agit du même système enzymatique lors de ces deux phases.

En plus des systèmes d'activation (kinases ou synthétases), des systèmes enzymatiques (carboxylases et carboxyltransférases) sont nécessaires pour fournir les substrats au système polykétide synthétase (fig 4). Nous nous sommes intéressés à ces systèmes, particulièrement à l'identification des voies conduisant au malonyl-CoA.

Cette étude orientée vers l'enzymologie s'intéresse donc aux relations entre métabolisme primaire et secondaire. L'objectif est de conduire à une meilleure connaissance des voies fournissant les précurseurs acyl-activés nécessaires à la synthèse de la partie aglycone de la spiramycine.

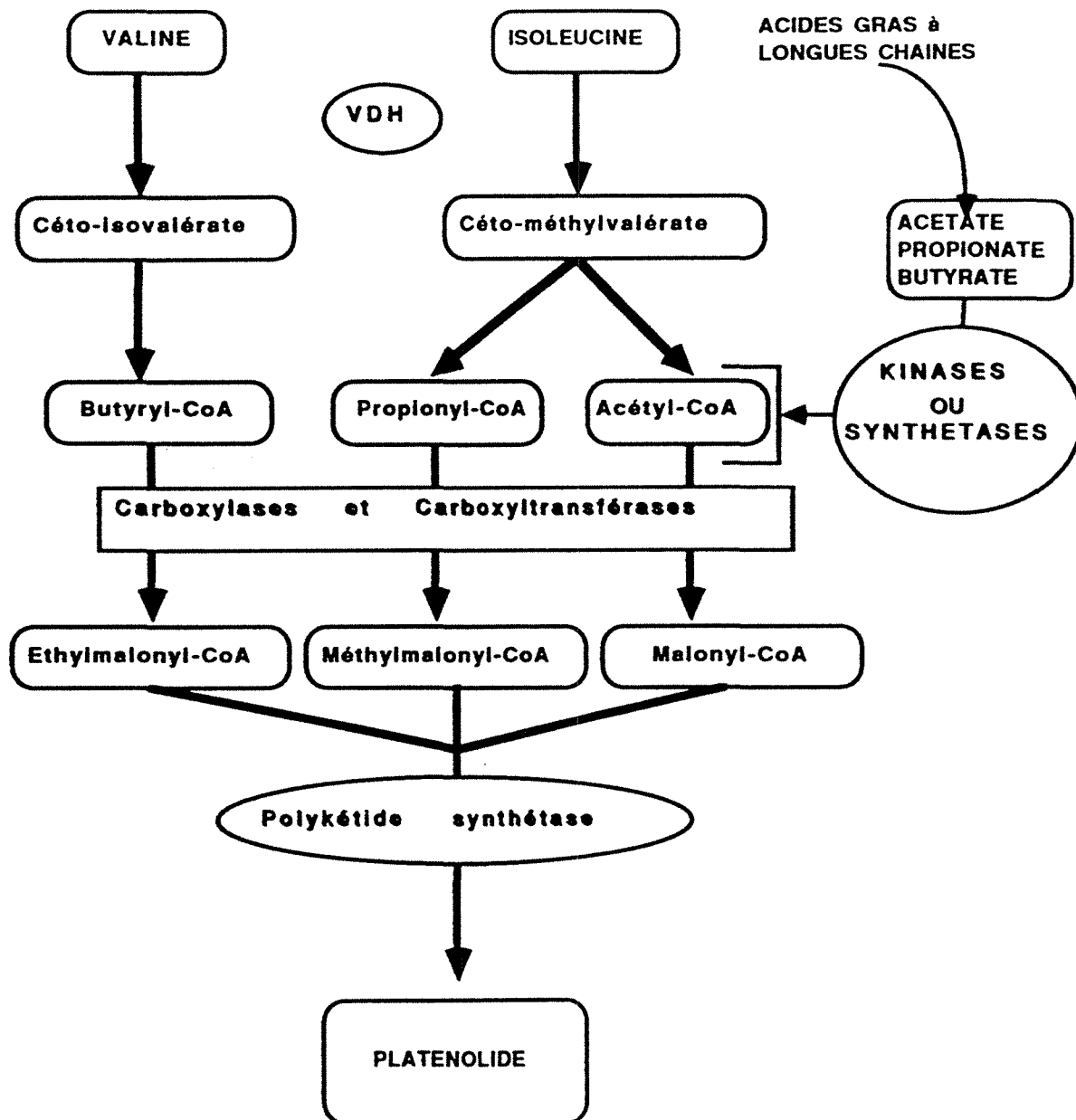


Figure 4 : Voies globales de la synthèse du platénolide

III - REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

II. Revue bibliographique

II.1. Présentation de la bactérie utilisée: *Streptomyces ambofaciens*.

C'est une bactérie filamenteuse de la microflore du sol. Les *Streptomyces* sont des eubactéries mycéliennes qui appartiennent au groupe des Actinomycètes. Ce sont des bactéries gram⁺, immobiles, aérobies et sporulantes. La morphologie de leurs colonies évoque celle des colonies des champignons.

Le cycle de développement sur milieu solide commence par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire ramifié et partiellement cloisonné. Sa croissance est radiale. Puis, un mycélium aérien et souterrain se développent. L'extrémité des hyphes aériens se différencie en chapelets de spores (fig 5, Hopwood et Sermonti, 1962).

Les antibiotiques produits par les *Streptomyces* constituent un groupe important de composés chimiquement divers. La plupart de ces antibiotiques sont complexes. Ils sont synthétisés à partir d'intermédiaires modifiés du métabolisme primaire, qui sont ensuite assemblés en structures complexes, sous l'action d'enzymes spécifiques qui ne s'expriment que dans certaines conditions physiologiques bien définies.

Généralement, ces conditions impliquent une limitation nutritive et sont associées au passage en phase stationnaire des cultures.

La transformation, de la population de cellules en croissance à celles productrices de l'antibiotique, constitue par conséquent un type de différenciation cellulaire analogue à la différenciation morphologique des spores et du mycélium aérien. Ainsi, l'étude de la biosynthèse des antibiotiques constitue un bon système d'investigation des mécanismes de la régulation génétique intervenant au cours de la différenciation cellulaire.

Les *Streptomyces* présentent un intérêt industriel très important, de part leur production de métabolites secondaires, dont les antibiotiques. Ces métabolites secondaires sont produits lors de la phase de ralentissement de croissance et pendant la phase stationnaire. Leur production traduit une transition entre métabolisme primaire et secondaire, aussi les *Streptomyces* peuvent-ils constituer un bon système d'études des différenciations physiologiques.

Streptomyces ambofaciens est productrice de spiramycine, antibiotique du groupe des macrolides et de la congocidine

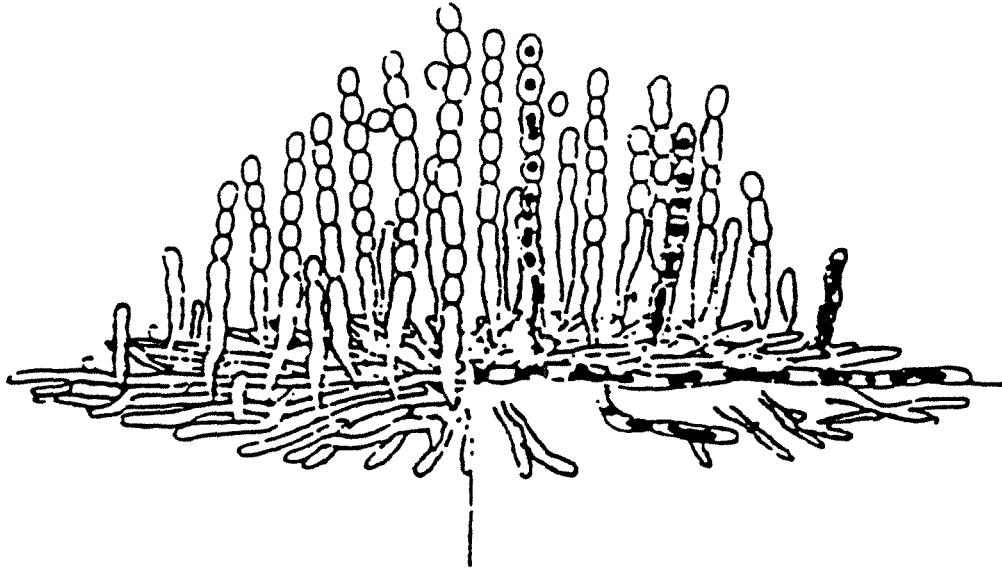


Figure 5 : Représentation d'une colonie de *Streptomyces* poussant sur un milieu gélosé.
(d'après Hopwood et Sermonti, 1963)

(Netropsine). Nous ne nous intéressons ici qu'à la production de spiramycine.

Jusqu'ici, les études sur *Streptomyces ambofaciens* et la production de spiramycine ont été d'ordre génétique essentiellement. On a cherché à localiser les gènes intervenant spécifiquement dans la biosynthèse d'enzymes du métabolisme secondaire et on a montré que les plasmides, lorsqu'ils existent, jouent un rôle important dans la biosynthèse des macrolides (Omura et coll., 1979a).

II.2. Les macrolides

II.2.1. Généralités

II.2.1.1. Historique

Le terme de macrolide désigne spécialement un groupe d'antibiotiques basiques et lipophiles, dont la structure chimique est constituée d'un noyau lactone macrocyclique et de sucres aminés et/ou de désoxysucres (Woodward, 1957).

Depuis 30 ans, un certain nombre d'antibiotiques macrolides tels que l'érythromycine, la leucomycine, la tylosine, la spiramycine etc ..., ont été découverts et produits industriellement.

Les progrès des méthodes analytiques, l'utilisation des éléments radioactifs marqués (^3H , ^{14}C), du ^{13}C en résonance magnétique nucléaire (RMN), l'utilisation des mutants de biosynthèse, d'agents inhibiteurs et les apports récents de la biologie moléculaire ont fait qu'à l'heure actuelle les différentes voies de biosynthèses des macrolides ont été élucidées pour la plupart.

Le marché mondial des antibiotiques représente pour 1986 une valeur de l'ordre de 60 milliards de francs, soit environ 13% du marché pharmaceutique. Parmi ces antibiotiques, les macrolides représentaient 8,1% en 1986 (Larpent et Sanglier, 1989).

II.2.1.2. Mode d'action et utilisation thérapeutiques

Les antibiotiques macrolides sont efficaces contre les bactéries gram⁺, les mycoplasmes et les bactéries gram⁻ cocci comme la *Neisseria*.

Leur moindre efficacité contre la plupart des gram⁻ (*E. coli* par exemple) est due à leur incapacité à traverser facilement la paroi

bactérienne. Contre les mycoplasmes, l'activité des macrolides est particulièrement importante, alors que ces microorganismes, qui provoquent de sérieuses affections des organes respiratoires, sont insensibles à l'action des β -lactames et des aminoglycosides. Ainsi, les macrolides sont choisis comme des produits adéquats contre ce genre d'infection.

Les études sur le mode d'action de l'érythromycine montrent que les antibiotiques inhibent la synthèse protéique chez les bactéries (Omura et Tanaka, 1983). L'érythromycine se lie spécifiquement, avec un rapport 1/1, aux ribosomes 50S d'*E. coli*, et provoque l'inhibition du transfert peptidique. Le même mécanisme est suggéré dans le cas des macrolides à 16 membres (Tago et Nagano, 1970; Vazquez, 1967).

Les antibiotiques macrolides montrent une faible toxicité sur des patients traités avec une forte dose et durant une période de deux semaines (Omura et Tanaka, 1983).

III.2.1.3. Classification des différents groupes

Bien que les macrolides aient été classés en se basant sur les caractéristiques de leurs spectres d'absorption (Hütter et coll., 1961), la classification basée sur la structure chimique reste encore la plus utilisée.

En effet, ces macrolides sont classés selon le nombre d'atomes du squelette du macrocycle lactonique, en macrolides à 12, 14 et 16 membres, pour les plus connus et les plus typiques.

Sur la base de la biosynthèse de l'aglycone, les macrolides peuvent être divisés en 3 groupes.

a/ L'aglycone des macrolides du premier groupe est biosynthétisé par condensation d'unités propionates. Ce sont surtout les macrolides à 14 membres tels que l'érythromycine.

b/ L'aglycone des macrolides du second groupe est biosynthétisé par condensation d'unités acétates et propionates. Ce second groupe rassemble une variété des macrolides à 12, 14 et 16 membres tels que la méthymycine, la pikromycine et la magnamycine.

c/ L'aglycone des macrolides du troisième groupe est biosynthétisé par condensation d'unités acétates, propionates et butyrates. Ce dernier groupe contient la majorité des macrolides à 16 membres tels que la tylosine, la spiramycine, la leucomycine, la rosamycine etc... .

Ce troisième groupe peut être subdivisé à son tour en sous-groupes, selon la nature et la variété de leurs sucres ainsi que des fonctions portées par leur aglycone (Corcoran, 1981). Omura et Nakagawa (1981) distinguent 4 sous-groupes (fig 6).

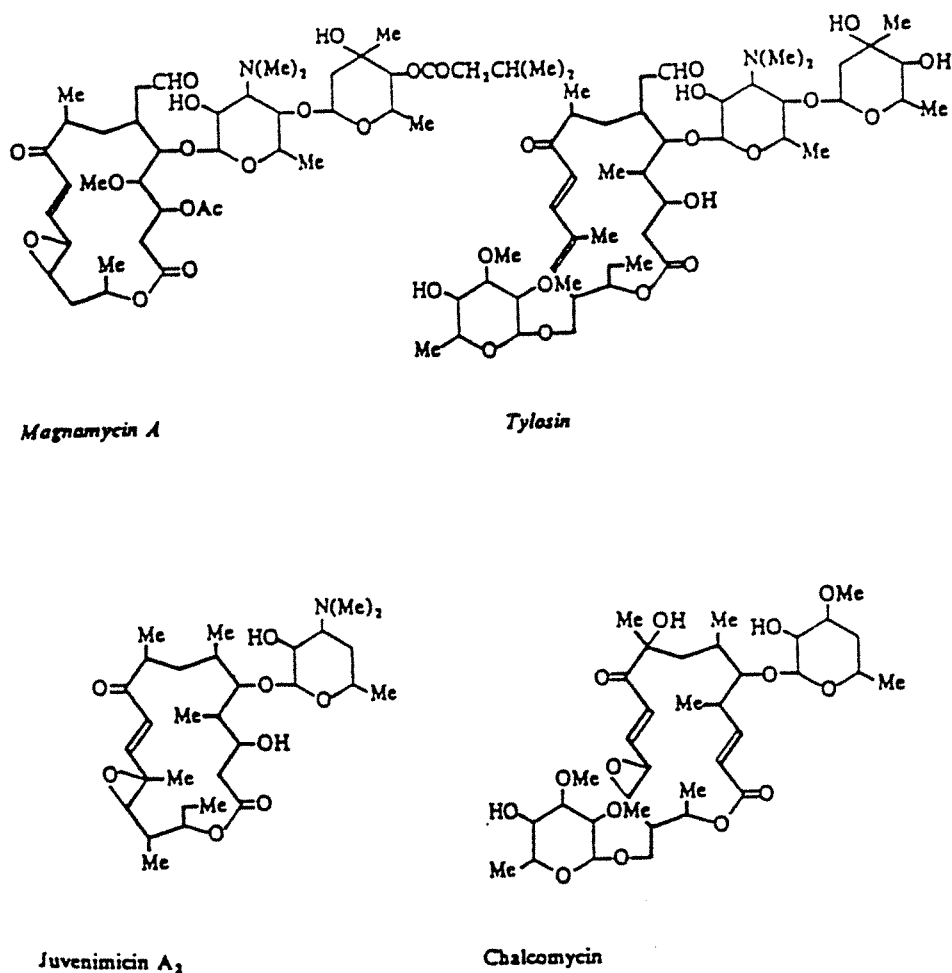


Figure 6 : Classification des macrolides à 16 membres basée sur la nature du noyau lactonique.
(d'après Omura et Nakagawa, 1981)

- _ Le sous-groupe c_1 est représenté par la magnamycine et la leucomycine et comprend, entre autres, la spiramycine et la midécamycine.
- _ Le sous-groupe c_2 est représenté par la tylosine.
- _ Le sous-groupe c_3 est représenté par la juvénimycine A_2 .
- _ Le sous-groupe c_4 comprend la chalcomycine, la neutramycine et l'aldagamycine.

II.2.2. Biosynthèse des macrolides

II.2.2.1. Aspects généraux

La biosynthèse des macrolides s'effectue en trois étapes: la formation de l'aglycone, la biosynthèse des sucres et les réactions terminales qui incluent l'attachement des sucres et de fines modifications des intermédiaires du macrolide.

En général, le squelette lactonique de l'antibiotique macrolide (partie aglycone) prend naissance grâce à la condensation des petites molécules et en particulier les unités acétate, propionate et butyrate.

L'intervention de ces petites molécules a été démontrée par utilisation de précurseurs marqués au ^{13}C et RMN. Ainsi, *Streptomyces flavocromagenes* utilise pour la biosynthèse de l'aglycone une molécule d'acétate et six de propionates (Omura et coll., 1976).

En plus des études par traceurs isotopiques, de simples additions de précurseurs facilitant la production d'antibiotique indiquent la participation de ces précurseurs dans la production de l'aglycone. Raczynska-Bojanowska et coll. (1976) ont stimulé la production de l'érythromycine chez *S. erythreus* par addition de propionate ou de propanol.

Une autre technique utilisée pour l'étude de la synthèse de l'aglycone a été l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que la céruléine. Cette molécule inhibe spécialement l'enzyme condensante ("condensing-enzyme") impliquée dans la condensation de l'acyl-ACP avec le malonyl-CoA au cours de la biosynthèse des acides gras (Greenspan et coll., 1977; Nomura et coll., 1972; Omura et coll., 1976). La céruléine empêche la production d'autres métabolites que les acides gras: leucomycine (Takeshima et coll., 1977) et tylosine (Omura et coll., 1976). L'addition des composés lactoniques à des milieux de fermentation de *Streptomyces* en présence de céruléine permet la synthèse des antibiotiques. La céruléine n'a pas d'effet sur le métabolisme des sucres, et semble agir uniquement sur la synthèse de l'aglycone. Ceci suggère un mécanisme de condensation des précurseurs semblable à celui de la synthèse des acides gras.

Les études sur la synthèse de la partie "sucres" sont très limitées. Il a été montré que le D-glucose était un précurseur essentiel, mais les étapes séquentielles de transformation des sucres et leur attachement ne sont pas connus. Leur rôle est toutefois essentiel dans l'entité antibiotique. D'après les travaux réalisés par Corcoran (1971) sur leur mode d'action antibactérienne, il ressort que la nature des sucres et leurs positions sur le noyau lactonique joue effectivement un rôle primordial sur leurs activités biologiques.

La dernière étape de la biosynthèse des antibiotiques macrolides s'effectue par l'intermédiaire des réactions terminales. Il s'agit tout d'abord de la formation des liaisons glycosidiques entre l'aglycone et les dérivés de sucres, puis sur le cycle lactonique, de réactions d'oxydations, de réductions et d'acylations, conduisant finalement aux antibiotiques macrolides actifs (Neuzil et Hostalek, 1986).

Pour illustrer cela, nous avons choisi de nous focaliser sur la biosynthèse de trois antibiotiques macrolides: l'érythromycine (macrolide à 14 membres), la spiramycine et la tylosine (macrolides à 16 membres). Ces macrolides sont commercialement importants, utilisables dans la médecine vétérinaire, dans la nutrition animale et dernièrement dans la médecine humaine.

II.2.2.2. Macrolide à 14 membres: érythromycine

L'érythromycine est un antibiotique macrolide, ayant une structure lactonique à 14 membres et deux sucres dont l'un contient un groupe diméthylamine basique (fig 7).

L'érythromycine A est le principal antibiotique, il est utilisé cliniquement pour traiter les infections causées par les gram⁺. La molécule lactonique de base est l'érythronolide B. Sur cette molécule se greffent deux sucres, le cladinose et le désosamine. Ce dernier est le même chez toutes les érythromycines. Les différentes érythromycines se distinguent par des fonctions situées sur deux parties du cycle lactonique (R₁ et R₃) et deux parties du cladinose (R₂ et R₄). Les érythromycines B, C et D sont moins actives que la A sur les bactéries gram⁺ et ne sont pas utilisées en clinique. Les érythromycines E et F dont les structures ont été établies par Martin et coll. (1975) possèdent une faible activité antibactérienne.

Les différentes étapes et voies de biosynthèse de l'érythromycine sont résumées dans les figures 8 a et b.

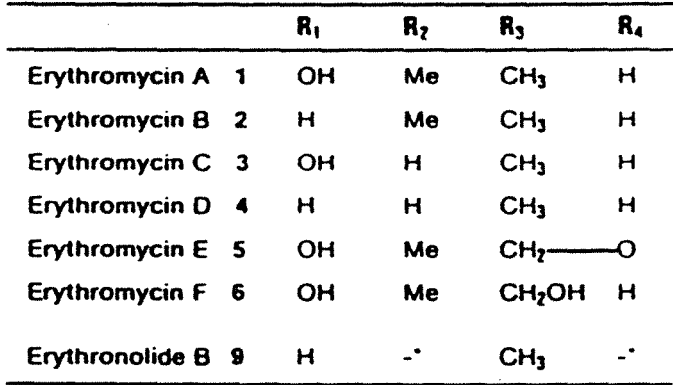
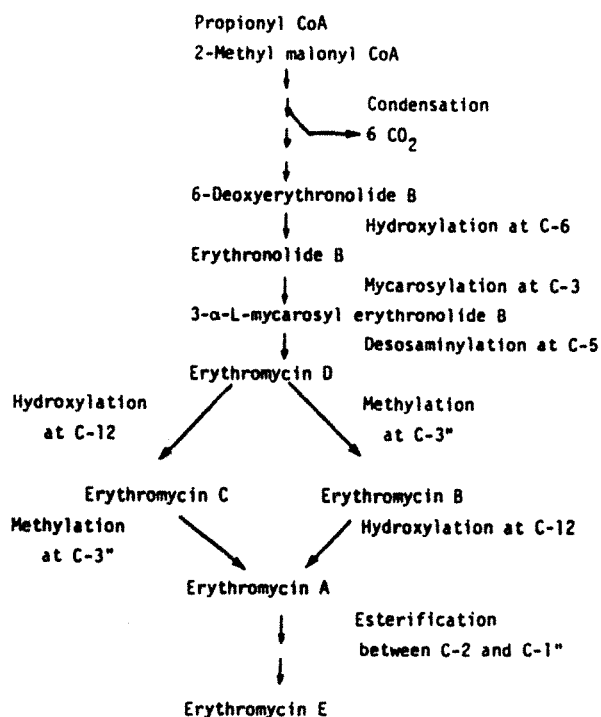


Figure 7 : Structures chimiques des principales érythromycines, macrolides à 14 membres.

(a)



(b)

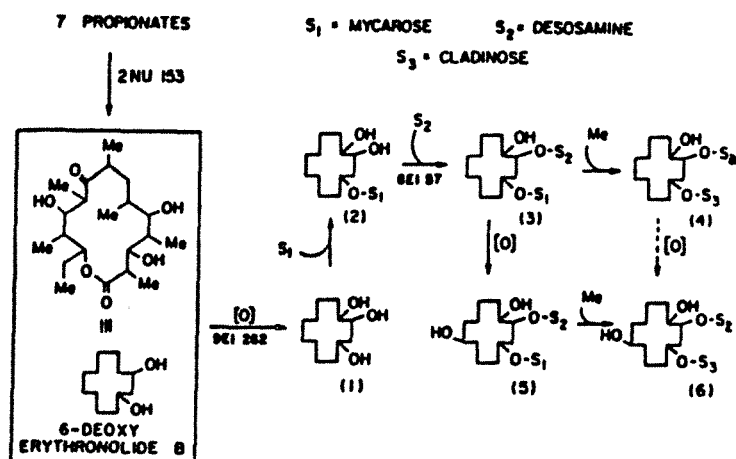


Figure 8 : Voies de biosynthèse de l'érythromycine.

(a) : d'après Martin et coll., 1975.

(b) : Les étapes bloquées possibles chez *S. erythreus* dans le cas des mutants 2NU 153, 9E1 262 et 8E1 57 sont indiquées. Les composés obtenus sont: (1) érythronolide B, (2) 3-O-mycarosyl-érythronolide B, (3) érythromycine D, (4) érythromycine B, (5) érythromycine C et (6) érythromycine A.

- Biosynthèse de l'aglycone: formation de l'érythronolide B.

L'érythronolide B est un excellent modèle de la biogenèse de l'aglycone à 14 membres. En se basant sur les études des précurseurs marqués, il a été trouvé que l'aglycone de l'érythromycine prend naissance à partir d'une condensation séquentielle d'une molécule de propionyl-CoA et 6 molécules de méthylmalonyl-CoA. (Masamune et coll., 1977).

- Biosynthèse des sucres de l'érythromycine

Vanek et Majer (1967) suppose que le glucose entre en réaction en se liant avec le désoxythymidine diphosphate (dTDP). Ensuite, le dTDP est libéré et le L-mycarose est attaché à l'érythronolide B. A ce niveau, la conversion de L-mycarose en L-cladinose s'effectue (Corcoran, 1975).

- Réactions terminales

La première réaction terminale est la glycosylation de l'érythronolide B avec le L-mycarose, donnant ainsi lieu à 3-mycarosylérythronolide B. L'étape suivante implique la glycosylation sur le C-5 avec la D-désosamine formant ainsi l'érythromycine D (Martin et coll., 1966).

- Enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'érythromycine

Une unité propionate et six de méthylmalonate entrent dans le squelette du noyau sous leurs formes actives. L'activation du propionate s'effectue en deux étapes, la première implique la formation du propionyl-phosphate catalysée par l'acétate kinase (Ruczaj et coll., 1969). Chez *S. erythreus*, l'activation du propionate s'accompagne par une augmentation de la synthèse de l'érythromycine (Raczynska-Bojanowska et coll., 1970). La carboxylation du propionyl-CoA est catalysée par la propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3) (Raczynska-Bojanowska et coll., 1976). Hunaiti et Kolattukudy (1984a, b) ont étudié deux autres enzymes impliquées dans le métabolisme des précurseurs de l'érythronolide, la méthylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) et la malonyl-CoA décarboxylase (EC 4.1.1.9). La C₆ érythronolide hydroxylase représente un complexe enzymatique responsable de l'oxydation de 6-désoxyérythronolide B. La dernière étape, concernant la O-méthylation en 3" du L-mycarose en L-cladinose (conversion de

l'érythromycine C en A) est catalysée par l'érythromycine C méthyltransférase (Corcoran et McAlpine, 1971; Corcoran, 1975).

II.2.2.3. Macrolides à 16 membres

* Tylosine

La tylosine a été initialement décrite par McGuire et coll. (1961). Sa structure est constituée d'un cycle lactonique à 16 membres (tylactone) et de trois dérivés de sucres : un sucre aminé, le mycaminose et deux sucres neutres, le mycarose et le mycinose (fig 9). Le noyau lactonique est caractérisé par une fonction aldéhyde greffée en position 6 du cycle (C-20) et un système de doubles liaisons conjuguées (de C-9 à C-13) associé à une fonction cétone. Le système conjugué, qui a une absorbance maximale à 282 nm, est très important pour la détection et la quantification de la tylosine et de ses dérivés.

La configuration de la tylosine a été récemment confirmée par Jones et coll., 1982. La tylosine est produite commercialement par *Streptomyces fradiae* (ATCC 19609; NRRL 2702). Sa production par *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen et coll., 1964) et par *S. rimosus* (Pape et Brillinger, 1973) a été aussi rapportée.

La tylosine est exclusivement utilisée en médecine vétérinaire contre les infections causées par les bactéries gram⁺ et en nutrition animale comme facteur de croissance. Son activité est due à l'inhibition de la synthèse protéique par un mécanisme impliquant les liaisons de l'antibiotique aux ribosomes (Higashide, 1984).

La biosynthèse de la tylosine peut être divisée en deux grandes parties: d'abord la formation du protylonolide, puis sa conversion en tylosine. Au cours de cette dernière partie, des réactions d'oxydation et de réduction s'effectuent en association avec l'attachement des trois sucres sur le cycle lactonique.

Chez *S. fradiae*, une paire de mutants co-synthétiques, les souches 261 et NP-10, a été obtenue (fig 10) (Omura et coll., 1980). Cultivés séparément, ces mutants ne produisent pas de tylosine; en culture mixte, ils la produisent. Il a été montré que la souche 261, bloquée au niveau de la biosynthèse du mycaminose, accumule le protylonolide. Cette lactone est convertie en tylosine par l'autre mutant NP-10 qui lui, est déficient vis-à-vis de la formation de protylonolide. Ainsi, ces expériences mettent en évidence les deux grandes étapes impliquées dans la biosynthèse de la tylosine.

Sur les figures 11 a et b sont résumées les différentes étapes de la biosynthèse de la tylosine.

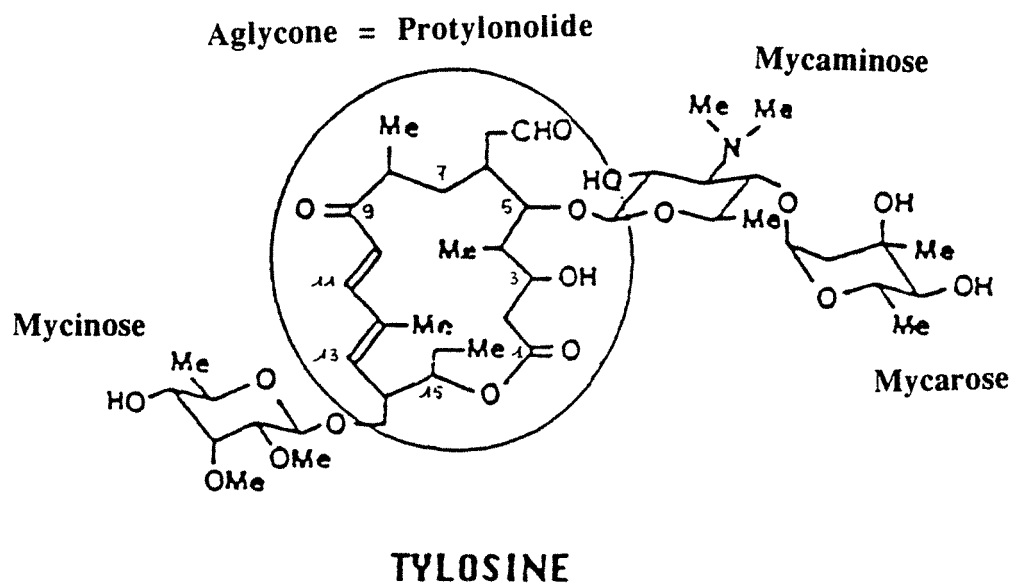


Figure 9 : Structure chimique de la tylosine.

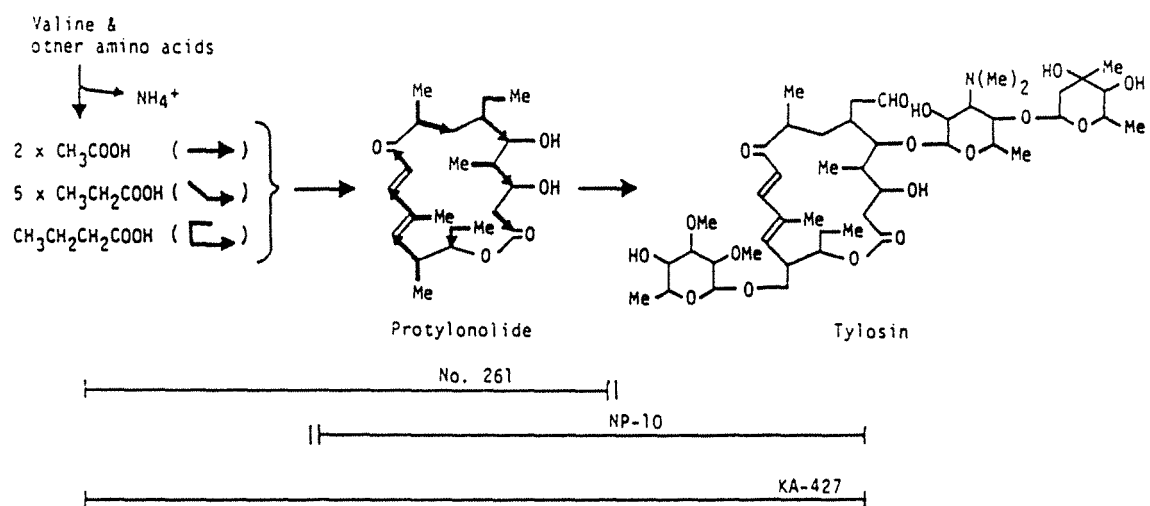
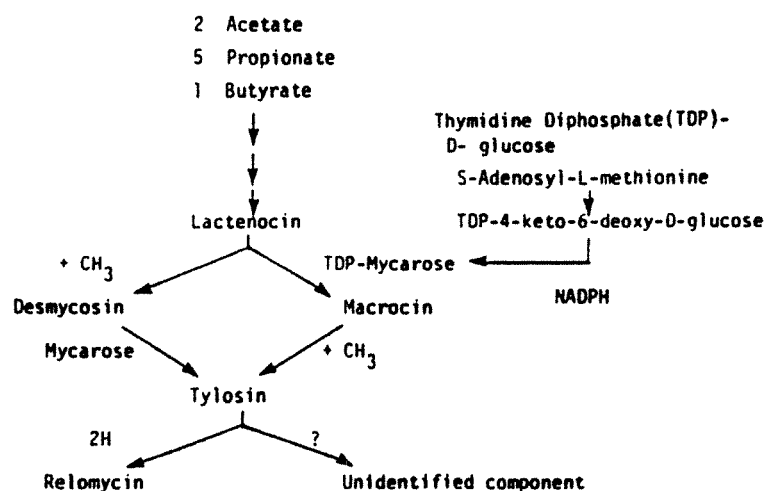


Figure 10 : Biosynthèse de la tylosine par *Streptomyces fradiae* KA-427 et les mutants co-synthétiques 261 et NP-10.

(a)



(b)

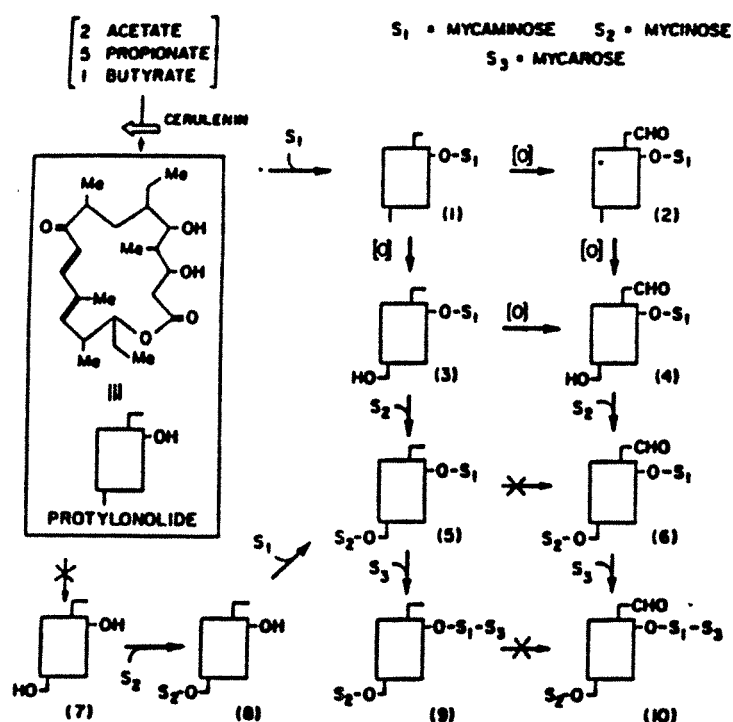


Figure 11 : Voies de biosynthèse de la tylosine.

(a) : Schéma de biosynthèse de la tylosine proposé par Omura et coll., 1975a.

(b) : Etapes possibles de biosynthèse chez *S. fradiae*. Les composés obtenus sont: (1) 5-O-mycaminosylprotylonolide, (2) dééoxycira-mycine A, (3) 20-déoxy-5-O-mycaminosylrelonolide, (4) 5-O-mycaminosyl-tylonolide, (5) 20-déoxy-demycarosylrelomycine, (6) demycarosyltylosine, (7) 23-hydroxyprotylonolide, (8) 20-déoxy-23-O-mycinosylrelonolide, (9) 20-déoxyrelomycine et (10) tylosine. (d'après Omura et coll., 1982)

Biosynthèse de l'aglycone

L'étude de l'incorporation des précurseurs radioactifs dans la tylosine indique que le protylonolide est formé par condensation de cinq propionates, deux acétates et un butyrate (Omura et coll., 1975b; 1977). Des travaux de O'hagan et coll. (1983) montrent que toutes les fonctions cétone de la tylosine dérivent du C₁ de l'acétate, du propionate ou du butyrate. Ces auteurs ont étudié l'incorporation de ces molécules marquées (¹³C, ¹⁸O) dans la tylactone. Ils suggèrent que la biosynthèse du protylonolide est semblable à celle de l'érythronolide de l'érythromycine.

La formation de la tylactone est le résultat de deux oxydations dont la première aboutit à la formation du groupement aldéhyde à partir du méthyl en position C₂₀. La deuxième oxydation correspond à l'hydroxylation du méthyl en position C₂₃.

Biosynthèse des dérivés de sucres et glycosidation

Rien n'est publié sur la biosynthèse des dérivés de sucres. En ce qui concerne les étapes de glycosidation du cycle lactonique, Baltz et coll.(1983), ont caractérisé plusieurs mutants bloqués dans la biosynthèse de tylosine, analysé les produits intermédiaires formés et proposé un schéma rapporté en figure 12.

Enzymes intervenant dans la biosynthèse de la tylosine

L'aglycone de la tylosine, le protylonolide, serait synthétisé sous le contrôle de la protylonolide synthétase qui est un complexe enzymatique correspondant à celui des acides gras synthétases. Cette hypothèse est confortée par plusieurs expériences utilisant la céruléine, inhibiteur de cette enzyme, et bloquant la production de tylosine (D'Agnolo et coll., 1973; Greenspan et coll., 1977) .

L'acétyl-CoA, le propionyl-CoA et le méthylmalonyl-CoA sont formés par action de la propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.3.1) et de la méthylmalonyl-CoA carboxyltransférase (EC 2.1.3.1). Ces enzymes ont été étudiées dans des cultures de *S. fradiae* productrice de la tylosine (Vu-Trong et coll., 1980, 1981). Leurs activités spécifiques sont maximales pendant la synthèse de la tylosine.

La glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.2) a été détectée chez *S. fradiae* (Bhuwapathanapun et Gray, 1981). Cette enzyme semble jouer un rôle dans la formation de l'aglycone, par l'intermédiaire du succinyl-CoA, précurseur à la fois du méthylmalonyl-CoA et du propionyl-CoA. Ceci pourrait rendre compte également de l'implication de certaines enzymes du cycle glyoxylique, ainsi que

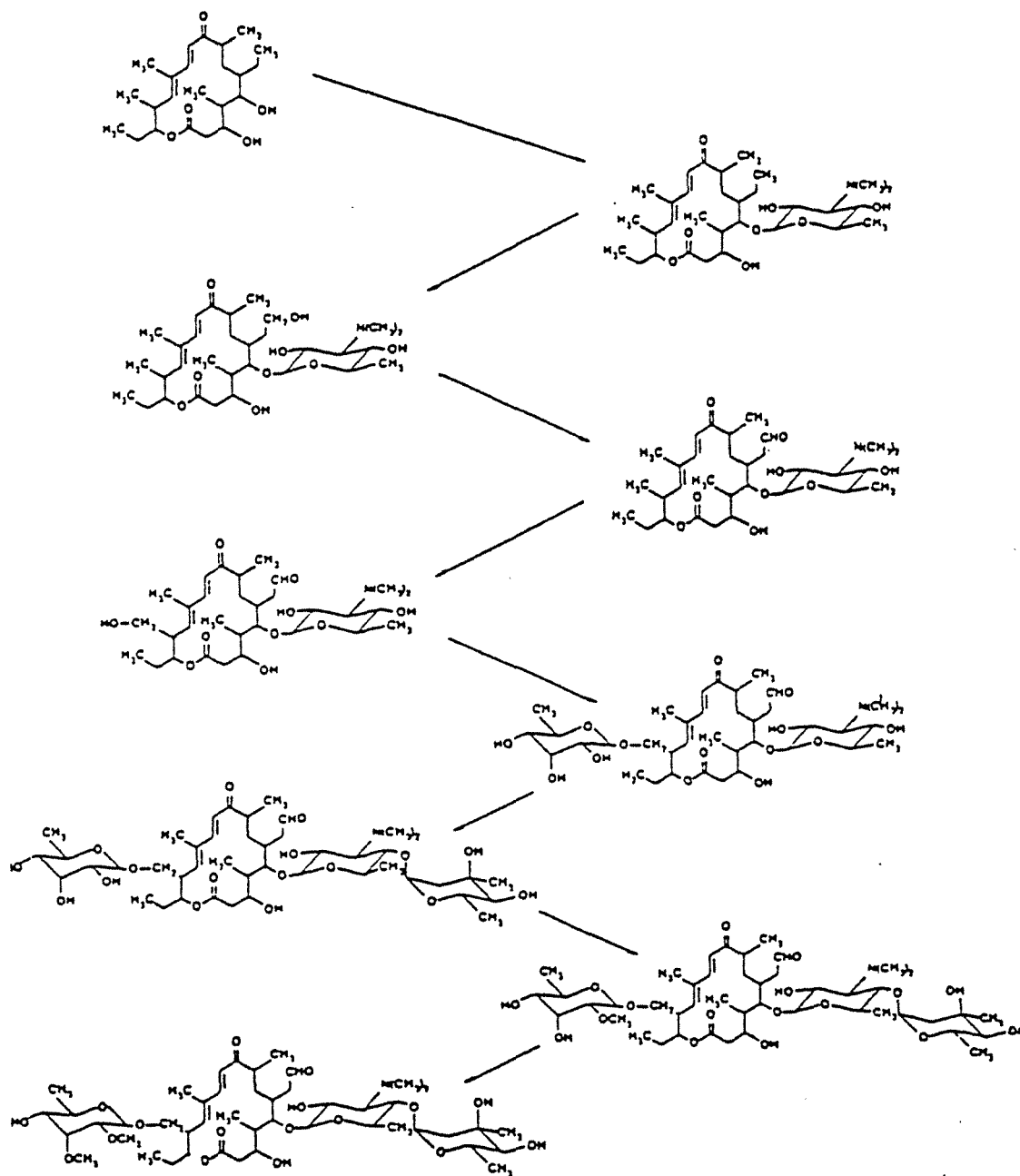


Figure 12 : Voie préférentielle de la conversion de la tylostone en tylosine.

Tylosone --> O-mycaminosyltylosone --> 23-désoxy-20-déhydro-O-mycaminosyltylonolide --> 23-désoxy-O-mycaminosyltylonolide --> --> --> O-mycaminosyltylonolide --> --> --> diméthylacténocine --> --> --> diméthylmacrocin --> --> --> macrocin --> --> --> tylosine. (d'après Baltz et coll., 1983)

de celles du cycle tricarboxylique comme la citrate synthétase dans cette synthèse de l'aglycone.

Plusieurs autres enzymes interviennent spécifiquement dans la biosynthèse de la tylosine, entre autres, les 20 et 23-hydroxylases qui jouent un rôle important dans l'oxydation du noyau lactonique de la tylosine (Omura et coll., 1982; 1984b).

* Spiramycine

La spiramycine a été découverte en 1954 dans une culture de *S. ambofaciens* isolé d'un prélèvement de sol effectué dans la région de Péronne (FRANCE) (Pinneret-Sindico, 1954).

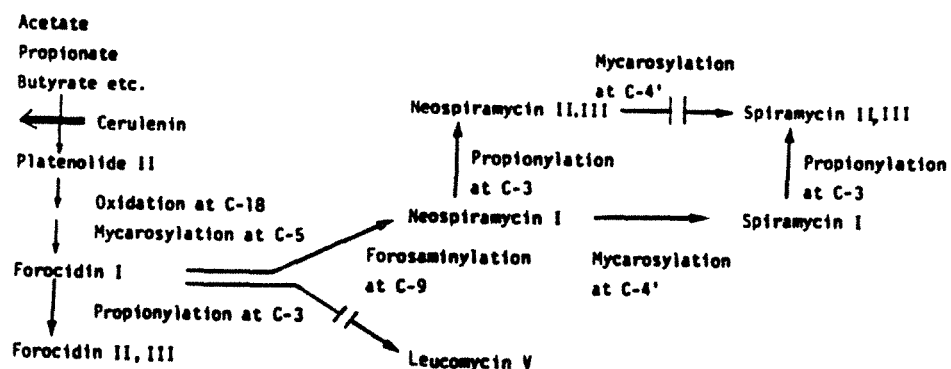
La spiramycine possède un noyau lactonique à 16 membres dont la structure montre une grande analogie avec celle de la tylosine de *S. fradiae*. Cette structure est constituée, entre autres, d'une fonction aldéhyde nécessaire à l'activité antibiotique et de trois sucres accrochés au macrocycle lactonique à savoir le mycaminose (sucre aminé), le mycarose (désoxysucre) et la forosamine. Sur cet aglycone, platénolide, on note également la présence d'un groupement acétyl, propionyl ou butyryl conduisant, respectivement, à la formation des spiramycines I, II ou III (fig 1).

Les figures 13 a et b résument les différentes étapes de la biosynthèse de spiramycine.

Comme dans le cas des autres macrolides, la biosynthèse de spiramycine s'effectue en passant par l'étape de la formation de l'aglycone (platénolide), la biosynthèse de dérivés de sucres, et des réactions terminales faisant intervenir certaines enzymes particulières comme la 3-hydroxylacylase.

Le groupement aglycone de la spiramycine est identique à celui de la leucomycine. Ce dernier a fait l'objet de plusieurs études. En effet, des précurseurs marqués ont été utilisés afin de déterminer les précurseurs de la leucomycine (Omura et coll., 1975 a, b ; 1977). Les auteurs ont analysé par RMN la leucomycine ayant incorporé du (^{13}C) acétate. Les résultats obtenus montrent que les carbones 1, 2, 9, 16, 20 et 21 ont l'acétate comme précurseur direct. Par ailleurs, un faible enrichissement par le (^{13}C) acétate est noté dans le cas des carbones 6, 7, 8, 18 et 19. L'acétate serait donc le précurseur indirect de ces cinq carbones par l'intermédiaire du propionate (C_7 , C_8 , C_{19}) ou du butyrate (C_6 et C_{18}). Le travail effectué par Furumai et coll. (1975) montre que le groupement formyl du macrocycle lactonique de la leucomycine dérive du butyrate. Ces auteurs concluent que l'aglycone de la leucomycine ainsi que celui de la spiramycine ont comme précurseurs cinq unités acétate, une unité propionate et une unité butyrate. Seule l'origine des carbones en position 2 et 3 reste inconnue (fig 14).

(a)



(b)

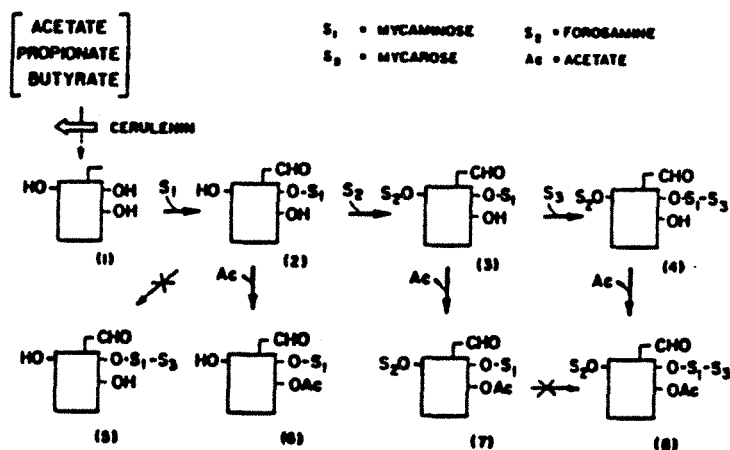


Figure 13 : Voies de biosynthèse de spiramycine.

(a) : d'après Omura et coll., 1979a.

(b) : Etapes de biosynthèse chez *S. ambofaciens*. Les composés obtenus sont: (1) platénolide II, (2) forocidine I, (3) néospiramycine I, (4) spiramycine I, (5) leucomycine V, (6) forocidine II, (7) néospiramycine II et spiramycine II.

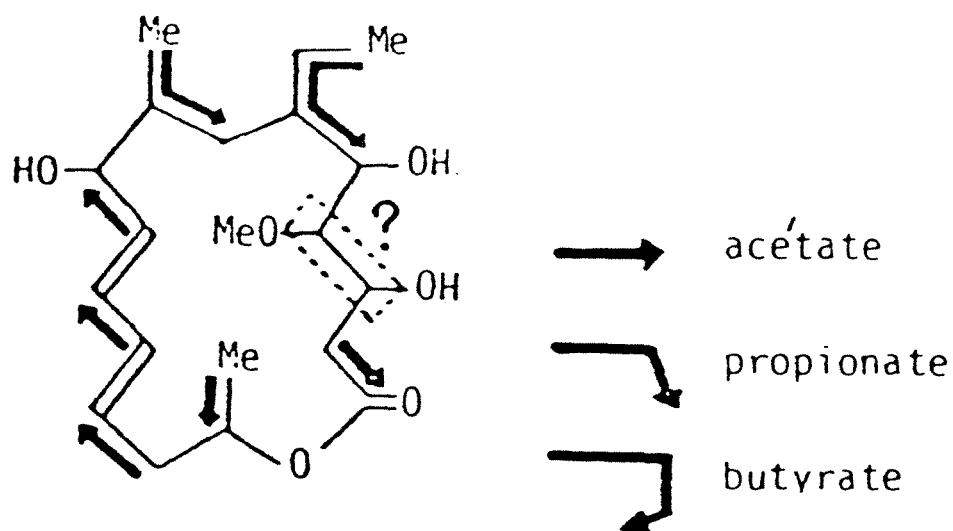


Figure 14 : Origine de la structure du platénolide (noyau lactonique = aglycone).

Par ailleurs, la biosynthèse de la leucomycine et de la spiramycine est inhibée par la céruléine (Omura et Takeshima, 1974; Takeshima et coll., 1977). La céruléine agit en amont du platénolide. Le mécanisme de condensation d'unités acyls activées, semblable à celui de la synthèse des acides gras, est probablement mis en oeuvre. Omura et coll. (1979b) ont également utilisé cette céruléine afin d'étudier l'ordre de l'attachement des sucres au niveau du platénolide et celui de l'acylation du groupement hydroxyl en position C₃ de ce macrocycle.

L'activité de la spiramycine I 3-hydroxylacylase, enzyme catalysant les réactions terminales de la biosynthèse de la spiramycine, a été détectée dans l'extrait acellulaire de *S. ambofaciens*. Cette enzyme semble être responsable du transfert de l'acétyl et du propionyl sur le cycle lactonique de la spiramycine, conduisant respectivement à la spiramycine II et III (Kitao et coll., 1979; Omura et coll., 1979a, b). Cette enzyme a été purifiée 33 fois. Elle possède un groupement -SH. Elle a une spécificité assez large mais son substrat préféré est la spiramycine I. Cette acylase peut être induite par le glucose; cette induction est annulée par le butyrate (Kitao et coll., 1979).

II.2.2.4. Régulation de la biosynthèse des macrolides

Les différentes étapes des voies biosynthétiques des macrolides sont assez bien établies; cependant, les mécanismes de régulation des activités des enzymes impliquées dans ces étapes restent peu connus. Dans le but d'augmenter le rendement de biosynthèse des antibiotiques, il est très important de connaître ces mécanismes de régulation pour pouvoir espérer modifier les étapes clés de la voie de biosynthèse des macrolides.

Le progrès dans la compréhension de la biosynthèse des macrolides et sa régulation ont été tardifs en regard de l'importance de ces molécules. Beaucoup d'observations empiriques sur les facteurs nutritionnels et les conditions physico-chimiques affectant la biosynthèse de ces antibiotiques ont été décrites, mais elles ont peu aidé à la compréhension des mécanismes de la biosynthèse des macrolides.

Bien que l'érythromycine ait été le macrolide le plus étudié, il y a peu d'études sur la régulation de biosynthèse. Stark et coll. (1961) ont étudié les facteurs nutritionnels contrôlant la production de l'érythromycine en notant que la production de l'antibiotique sur un milieu synthétique commençait seulement après épuisement totale de la source d'azote et que cette production était très élevée lorsque la leucine ou la valine étaient utilisées comme source de carbone et d'azote.

Dépassant ce stade global d'analyse d'effets de certains facteurs nutritionnels, de nombreux travaux ont cherché à établir des corrélations entre certaines activités enzymatiques et la production de l'antibiotique. Il a été montré que la propionyl-CoA carboxylase chez *S. erythreus* atteint son maximum d'activité pendant la phase de la production de l'érythromycine (Raczynska-Bojanowska et coll., 1970; Corcoran, 1981). Par addition au milieu de croissance de propanol (Stark et coll., 1961) ou de citrate, cette activité enzymatique se voit augmentée, mais elle diminue par l'addition d'acétate et de pyruvate (Raczynska-Bojanowska et coll., 1970). Le niveau de la propionate kinase est également élevé au moment de la phase active de la formation de l'antibiotique. D'après Hunaiti et Kolattukudy (1984a), l'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase et la vitesse de la production de l'érythromycine A évoluent simultanément chez *S. erythreus*. Plusieurs étapes des voies biosynthétiques de l'érythromycine A sont inhibées par leurs propres produits, ainsi in vivo, l'érythronolide B inhibe sa propre formation (Spizek et coll., 1966).

En ce qui concerne la biosynthèse des macrolides à 16 membres, les études des régulations ont porté essentiellement sur la tylosine. Tout d'abord, les travaux ont tenté d'apprécier les effets régulateurs des sources d'énergie et des sources d'azote, effets classiques dans la synthèse de nombreux antibiotiques (Martin et Demain, 1980). La régulation par la charge énergétique a été appréciée par Vu-Trong et coll. (1980, 1981). L'excès de glucose dans les milieux permet d'accroître le pool intracellulaire des dérivés adénylés pendant la phase de production de l'antibiotique. L'excès de glucose entraîne une chute de la production de tylosine, et une chute des activités des enzymes méthylmalonyl-CoA carboxyltransférase et propionyl-CoA carboxylase. Ces résultats suggèrent que la concentration intracellulaire et/ou le pool des dérivés adénylés pourraient être des effecteurs intracellulaires qui contrôlèrent la biosynthèse de la tylosine chez *S. fradiae*.

Des travaux récents sur la régulation de la biosynthèse de la tylosine par l'ammonium (Vu-Trong et Gray, 1987) montrent que ce dernier, ajouté lors de la trophophase, exerce un effet négatif sur la production du macrolide. Parallèlement à cette chute de la biosynthèse de la tylosine, on note la diminution de différentes activités enzymatiques. La biosynthèse du macrocycle lactonique semble être la cible de l'action de l'ammonium (Masuma et coll., 1983; Omura et coll., 1984a; Tanaka et coll., 1986). D'autre part, il semble que le catabolisme de certains acides aminés comme la valine, l'isoleucine et la thréonine, précurseurs du protylonolide, soit

inhibé et réprimé par l'ammonium (Omura et coll., 1983; Vancura et coll., 1986).

II.3. Relation entre la biosynthèse de l'aglycone des macrolides et celle des acides gras saturés

Corcoran and Chick (1964) et Corcoran (1965) ont trouvé que le mycélium des *Streptomyces*, et en particulier de *S. erythreus*, possédait des acides gras typiques des lipides bactériens. L'acide palmitique est l'acide gras saturé le plus abondant.

Corcoran (1974, 1981) a émis des hypothèses sur les mécanismes biochimiques qui affecteraient la période d'accumulation de l'érythronolide et sur la relation entre ce processus et la biosynthèse des acides gras saturés tel que l'acide palmitique. Il a montré que la biogénèse normale de l'érythronolide impliquait à la fois le propionate et le 2-méthylmalonate en tant que précurseurs. La figure 15 indique que le propionate est utilisé seulement pour l'unité C₃ terminale, et que les autres six unités dérivent plus directement du 2-méthylmalonate. Ces substrats seraient activés sous forme d'esters du Coenzyme-A.

Bien que la structure de l'érythronolide ne soit pas similaire à celle du palmitate, les mécanismes proposés pour leurs biosynthèses sont analogues. La formation du palmitate est rappelée dans la figure 16. Dans ce cas, une unité d'acétate activée initie la synthèse, qui est complétée par l'addition successive de sept unités malonates activées.

Comme nous l'avons vu auparavant (paragraphe II.2.2), la biosynthèse des macrolides débute par la condensation des unités acétyl-CoA, malonyl-CoA et méthylmalonyl-CoA. Les intermédiaires ainsi formés subissent différentes modifications telles que hydroxylations, oxydations, réductions, méthylations, cyclisations, etc... . La diversité de ces modifications explique la variété des groupes d'antibiotiques. Cependant, on note que les premières réactions dans cette voie de biosynthèse, sont communes à tous les macrolides. Cette biosynthèse est inhibée par le même composé, la cérulénine ou 2,3-époxy-4-oxo-6,10-dodéca-liénoylamide, antibiotique produit par *Cephalosporium caerulens* (Roberts et Leadlay, 1983). Cet antibiotique est aussi un inhibiteur de la biosynthèse des acides gras à longues chaînes chez les levures et les

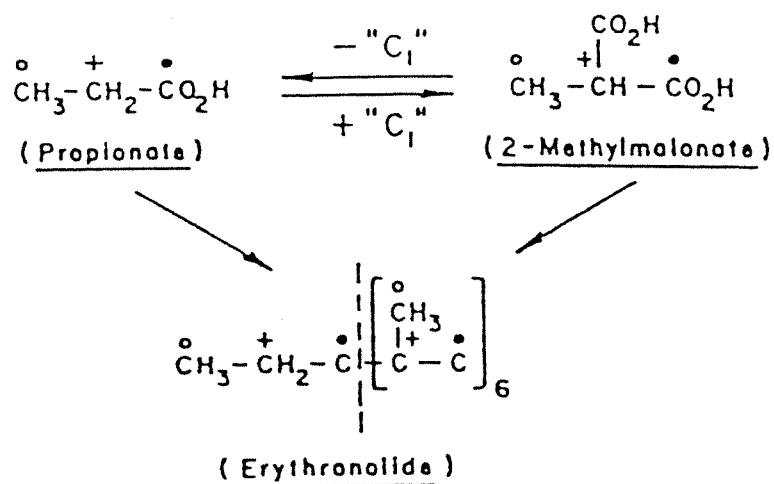


Figure 15 : Incorporation, du propionate et du 2-méthyl-malonate marqués, dans l'érythronolide synthétisé par *S. erythreus*.

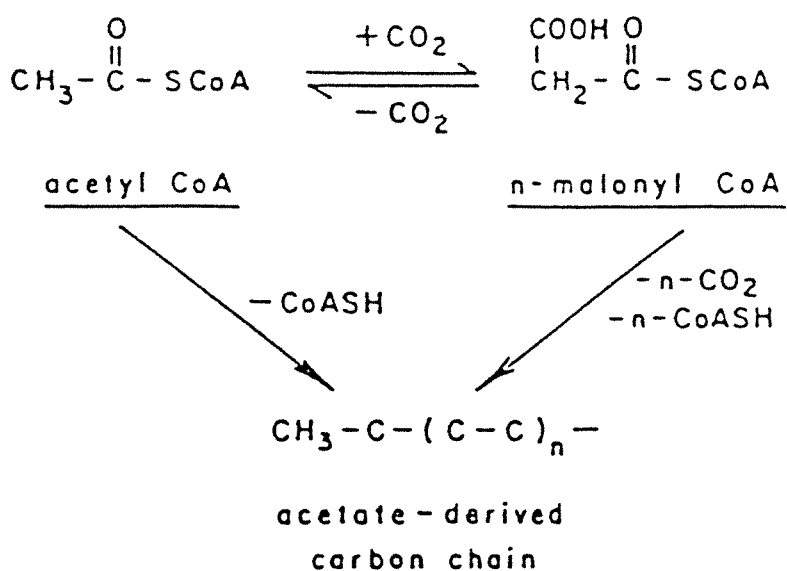


Figure 16 : Biosynthèse du palmitate.
(d'après Corcoran, 1965)

bactéries. Il agit au niveau de la β -céto-acyl thioester synthétase (Vance et coll., 1972) (fig 17).

Cette inhibition commune suggère une analogie entre la biosynthèse des acides gras et celle des macrolides (fig 18). En effet, les deux voies sont initiées par la décarboxylation du groupement malonyl et son acylation par un résidu acyl. Les groupements acyl et malonyl sont transférés, respectivement, par une acétyltransférase et malonyltransférase sur le groupement prosthétique (phosphopantéthéine) de la protéine transporteuse de groupement acyl ou ACP (acyl carrier protein) (Kobuke et Yoshida, 1978).

Il y a quelques différences essentielles entre ces synthèses. Au cours de la biosynthèse des acides gras saturés l'addition de chaque unité est suivie par une β -cétoacyl réduction, une déshydratation et une énoyl réduction. Ce cycle (réduction-déshydratation-réduction) est totalement ou partiellement absent lors de la biosynthèse des macrolides. La nature des unités de base de ces deux synthèses est différente. Les acides gras sont exclusivement synthétisés à partir d'unités acétyl ou propionyl après décarboxylation, par contre, les macrolides résultent d'assemblage des groupements acétyl, propionyl, malonyl, méthylmalonyl et éthylmalonyl.

L'aglycone de la tylosine, le protylonolide, serait synthétisé sous contrôle de la protylonolide synthétase (aglycone synthétase), complexe enzymatique correspondant à celui des acides gras synthétase.

L'érythronolide synthétase catalyse la condensation successive, "tête-à-queue", de six molécules de méthylmalonyl-CoA sur une unité propionyl-CoA initial, pour aboutir au 6-désoxyérythronolide B. Cette aglycone synthétase est analogue à l'acide gras synthétase (Rossi and Corcoran, 1973). L'érythronolide synthétase de *S. erythreus* a été étudiée (fig 19) par l'utilisation de (^3H)-tétrahydrocérulénine (Roberts et Leadlay, 1983; 1984). L'incubation de l'extrait acellulaire obtenu en phase exponentielle, en présence de cet inhibiteur spécifique, révèle l'existence d'un polypeptide marqué de 10 000 daltons. Quand cet extrait acellulaire est préparé à partir d'une culture en début de phase de production de l'érythromycine, un deuxième polypeptide marqué de 35 000 daltons apparaît. Il a la même mobilité électrophorétique que la β -cétoacyl ACP synthétase d'*E. coli* (Roberts et Leadlay, 1983). L'analogie entre l'acide gras synthétase et l'aglycone synthétase est si étroite que certains auteurs pensent que cette dernière enzyme serait le résultat d'une mutation des gènes codant pour la première (Dutton, 1988).

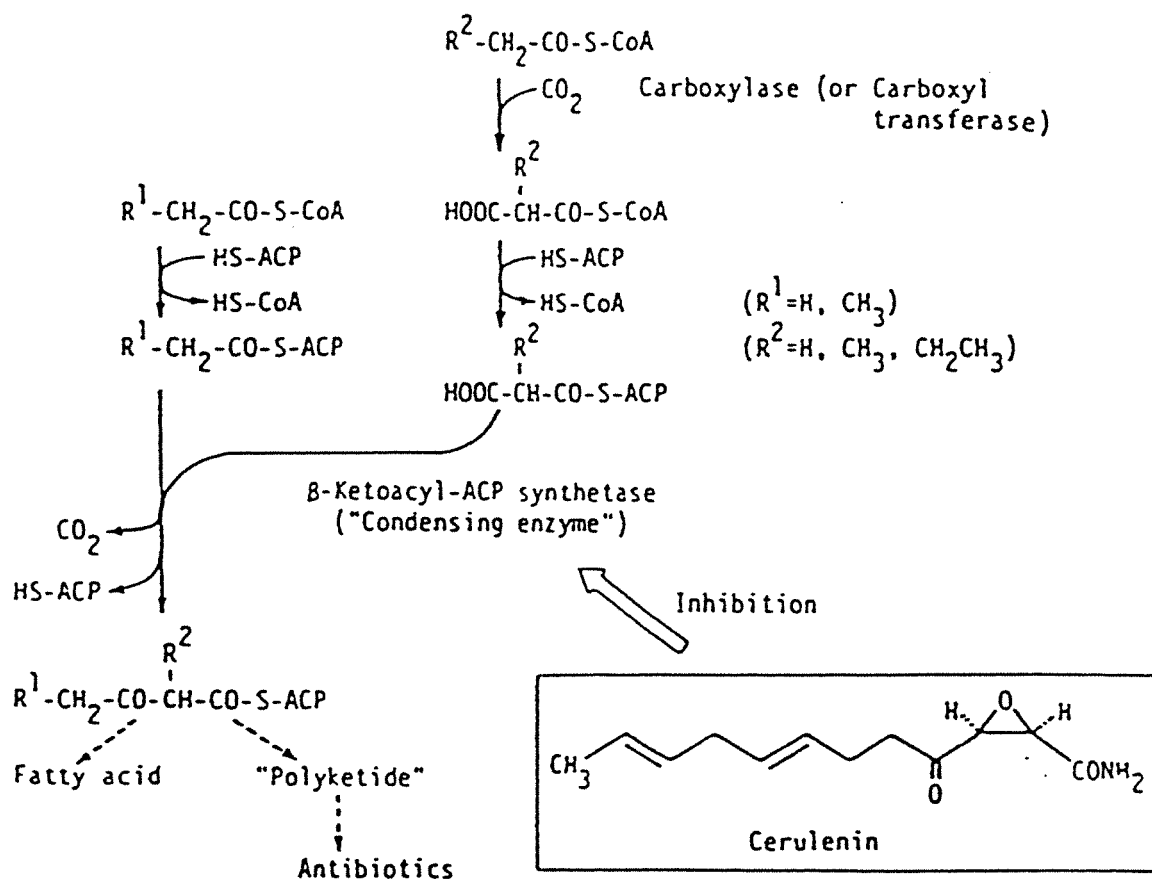


Figure 17 : Cible de l'inhibition par la cérulénine.
(d'après Omura, 1976)

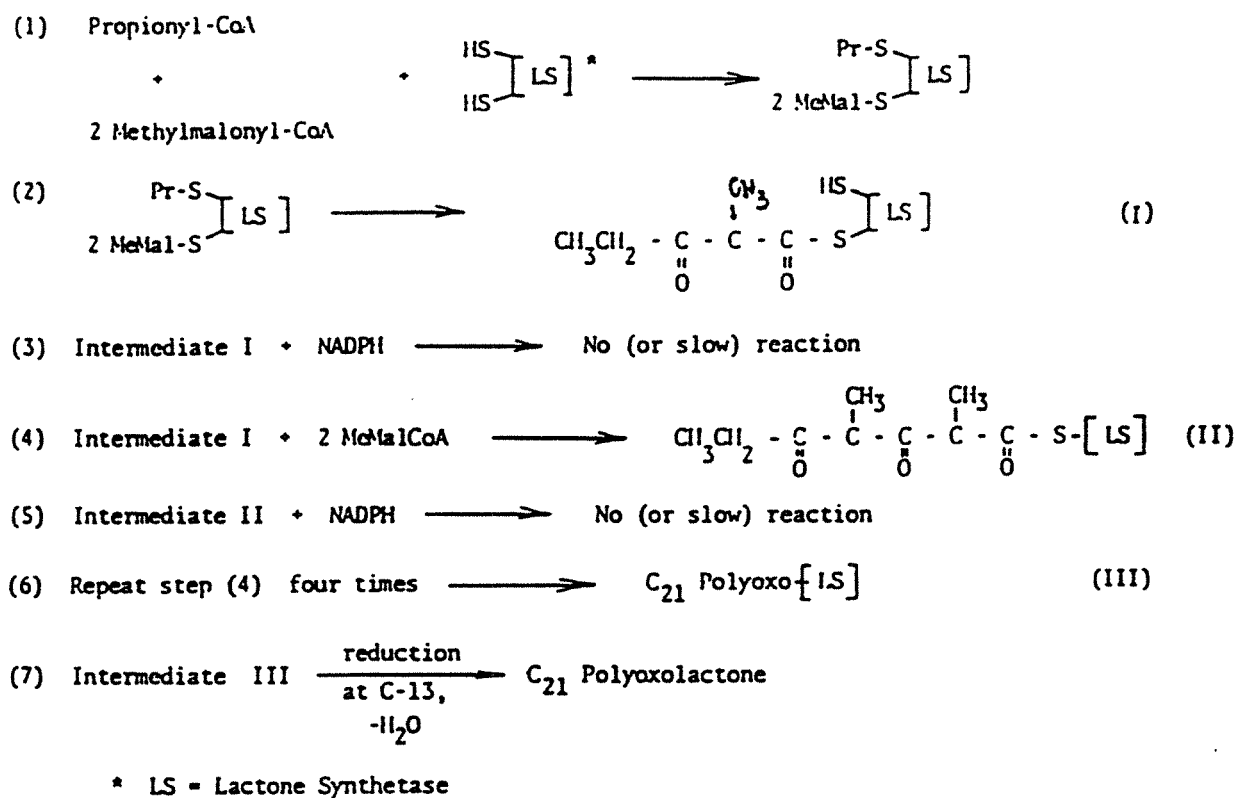


Figure 18 : Premières étapes de la biosynthèse de l'érythromycine.
(d'après Corcoran, 1974)

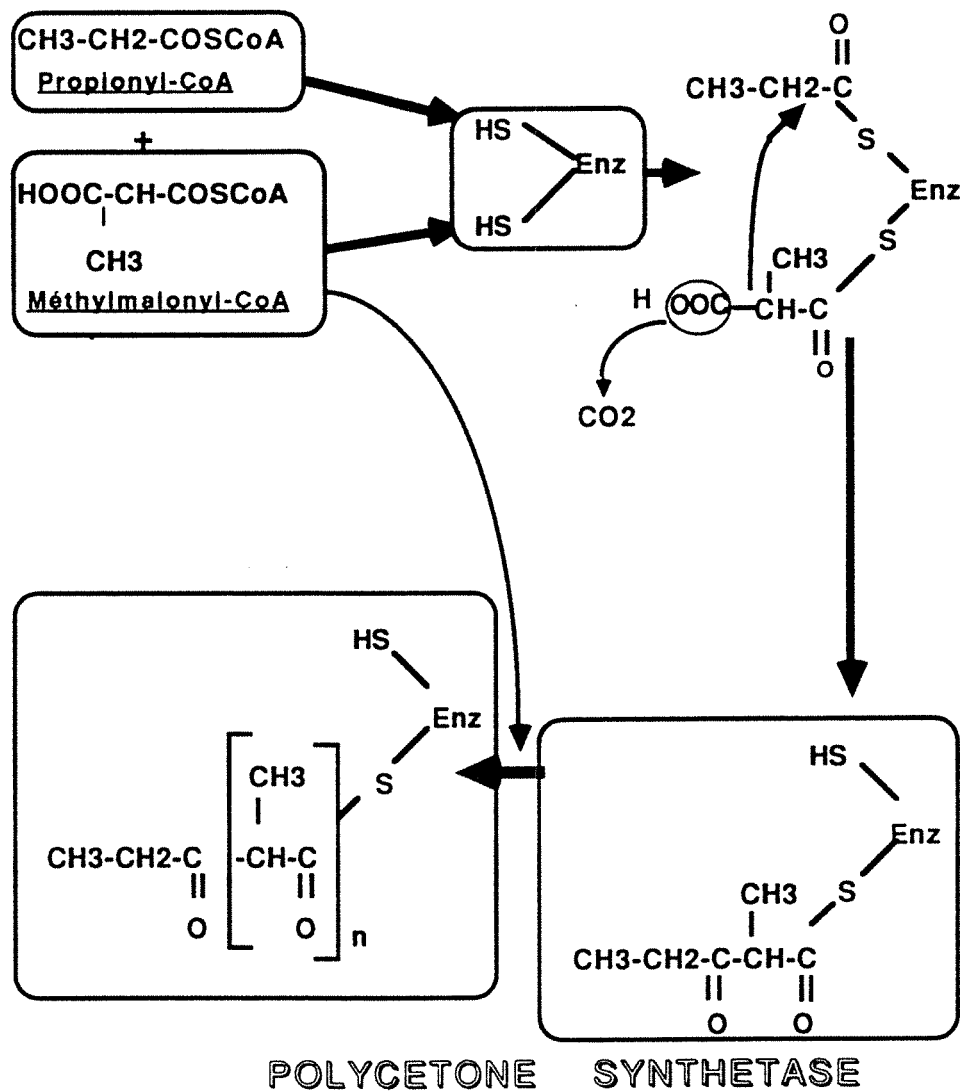


Figure 19 : Mécanisme d'action de l'érythronolide synthétase de *S. erythraeus*.

Corcoran (1981) a observé, pendant la phase exponentielle de *S. erythreus*, lorsque la cellule a besoin de la synthèse d'acides gras en vue d'assurer le développement de la membrane cellulaire, une étroite corrélation entre les activités acétate kinase et acétyl-CoA carboxylase. L'activité synthétase varie avec le besoin en acides gras. Un faible besoin en acides gras coïncide avec une faible activité synthétasique, ce qui pourrait être dû soit à une diminution de la quantité de synthétase, soit à une réduction d'apport des unités acétyl- et malonyl-CoA. Buckner et Kolattukudy (1975) expliquent cette baisse des produits formés, à la fois par la réduction de la synthèse de l'acétyl-CoA et par un développement élevé de l'activité malonyl-CoA décarboxylase.

Par ailleurs, une faible accumulation de l'érythronolide pourrait être causée par une relative absence des deux substrats précurseurs, le propionyl et le 2-méthylmalonyl-CoA, due d'une part à une faible activité propionate kinase et propionyl-CoA carboxylase (Raczynska-Bojanowska et coll., 1973), et d'autre part à la présence de 2-méthylmalonyl-CoA décarboxylase qui est à son activité maximale. Lorsque l'acétyl- et le malonyl-CoA sont à concentration élevée et le 2-méthylmalonyl-CoA à concentration faible, le produit majeur serait un acide gras tel que l'acide palmitique. Inversement, lorsque l'acétyl- et le malonyl-CoA sont à concentration faible et que le propionyl- et le méthylmalonyl-CoA sont à concentration élevée, alors le produit majeur de la même synthétase serait l'érythronolide. Il en résulte que la biosynthèse des acides gras saturés et de l'érythronolide chez *S. erythreus* se réalise sous contrôle d'un seul complexe protéique, la synthétase, qui a des activités multiples et dont les produits de la réaction sont régulés par les concentrations des substrats (Corcoran, 1981).

Les substrats, précurseurs directs des parties aglycones des macrolides proviennent, soit du catabolisme des acides gras à longues chaînes, soit de celui de certains acides aminés, soit de la glycolyse. Ils peuvent aussi dériver de certains intermédiaires du cycle du Krebs. Ils sont donc à la fois des produits finaux de certaines voies du métabolisme primaire et des précurseurs de la biosynthèse des macrolides. Ainsi, ils occupent une position charnière entre les métabolismes primaire et secondaire.

Leur incorporation au niveau des macrolides s'effectue sous forme de malonyl-CoA, de méthylmalonyl-CoA et moins souvent d'éthylmalonyl-CoA (fig 20). L'activité de la condensation étant liée à la concentration des substrats, les activités des enzymes conduisant aux substrats activés sont essentielles. Deux types d'enzymes-clés sont impliquées dans ces étapes initiales; les acyls-kinases couplées aux acyl-phosphotransférases, et les carboxylases, qui conduisent respectivement de l'acétyl-, propionyl- ou butyryl-CoA au malonyl-, méthylmalonyl- ou éthylmalonyl-CoA.

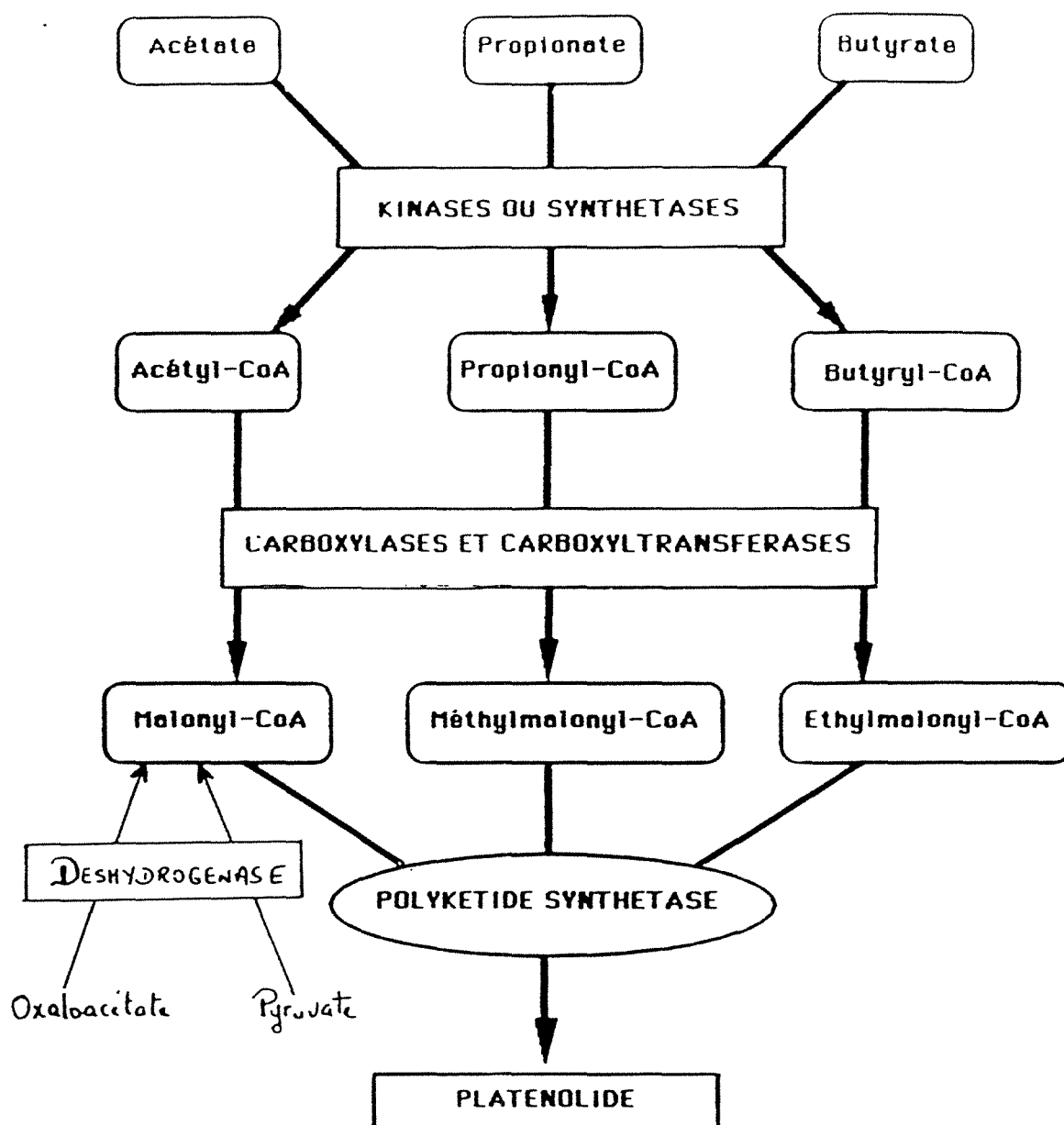


Figure 20 : Incorporation des précurseurs au niveau de l'aglycone par l'intermédiaire de certaines enzymes clés.

III - MATERIEL
ET METHODES

III. Matériel et méthodes

III.1. Microorganismes et produits chimiques

Les enzymes, les coenzymes et l'albumine bovine ont été fournis par Boehringer (RFA), les autres produits par Merck (RFA), Sigma (Etats Unis) et Fluka (Suisse).

III.1.1. Souches de microorganismes

-*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23 877

-*Bacillus subtilis* ATCC 6 633

III.1.2. Produits chimiques pour milieux de culture

- Carbonate de calcium: CaCO_3 ; Merck
- Chlorure d'ammonium: NH_4Cl ; Fluka
- Chlorure de sodium: NaCl ; Prolabo
- Chlorure de calcium: $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$;
- Chlorure de cobalt: $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$; Merck
- Hydrogénophosphate de potassium: KH_2PO_4 ; Fluka
- Sulfate de manganèse: MnSO_4 ; Merck
- Sulfate de magnésium: $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; Merck
- Dextrines blanches; Prolabo
- Peptone Bio-trypticase; bioMérieux
- Extrait de levure; bioMérieux
- Extrait de viande; bioMérieux
- Gélose bacto-agar; bioMérieux
- Gélose nutritive; bioMérieux
- Bactotryptone; bioMérieux
- D-glucose; Fluka
- Glycérol; Merck
- Triton X-100; Sigma
- Acide morpholinopropanesulfonique: MOPS; Fluka

III.1.3. Réactifs d'analyse

- Sulfate de fer: $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; Merck
- Sulfate de zinc: ZnSO_4 ; Prolabo
- Sulfate de cuivre: $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$; Merck
- Sulfite de Sodium; Merck
- Sulfate d'ammonium; Fluka
- Sulfate d'ammonium ferrique; Merck

- Sulfate de streptomycine; Boehringer
- Tartrate double de Na et K: $C_4H_4KNaO_6, 4H_2O$; Merck
- Hydroxyde de potassium: KOH; Prolabo
- Ferricyanure de potassium: $Fe(CN)_6K_3$; Merck
- $FeCl_3$; Merck
- Acétyl-phosphate; Sigma
- Acétate de potassium; Fluka
- DTT (1,4-Dithio-DL-thréitol); Fluka
- NaOH; Fluka
- $KHCO_3$; Merck
- Duponol (Lauryl sulfate de sodium); Sigma
- Mercaptoéthanol; Fluka
- Acide pyruvique; Merck
- Acide oxaloacétique; Fluka
- Acide propionique; Merck
- Acide butyrique; Aldrich-chimie
- Acide isobutyrique; Sigma
- Acide sulfurique concentré; Fluka
- Acétonitrile; Merck
- Ethanol; Carlo-Erba
- Méthanol; Carlo-Erba
- Butanol; Prolabo
- Réactif de Folin; Merck
- Hydroxylamine; Merck
- Tris-HCl; Fluka
- Tampon phosphate; Fluka
- Albumine bovine; Boehringer
- Nicotinamide dinucléotide oxydée: NAD^+ ; Boehringer
- Coenzyme A; Sigma
- Acétyl-CoA; Sigma
- Malonyl-CoA; Sigma
- Nicotinamide dinucléotide réduite: NADH; Boehringer
- Adénosine triphosphate: ATP; Boehringer
- Thiamine pyrophosphate: TPP; Boehringer
- L-valine; Fluka
- Cystéine hydrochloride; Serva
- Acide trichloroacétique: TCA; Merck
- Chlorure de manganèse: $MnCl_2, 4 H_2O$; Merck
- Chlorure de magnésium: $MgCl_2, 6 H_2O$; Merck
- Spiramycine (Rhône-Poulenc)
- Résine DEAE séphacel; Pharmacia-LKB
- Ultrogel ACA 44; Pharmacia-LKB
- Gel séphacryl S-200; Pharmacia-LKB

III.2. Appareillages

- Agitateur giratoire pour cultures (Braun)
- Centrifugeuses (Janetzki T32B; Sigma) Modèle 3MK
- Chromatographe HPLC (Waters)
- Chromatographe HPLC (Spectra Focus)
- Colorimètre (Chemtrix type 24)
- Chromatographe en phase gazeuse (Intersmat IGC 121F)
- Sonicateur (Ultrasonics INC, modèle W 225R)
- Ultracentrifugeuse (Beckman L 550 OB)
- Spectrophotomètre UV-visible (Philips PU 8.600)
- Electrode à NH_3 (Ingold, type 15 230 3000)
- pH-mètre (Corning-EEL modèle 109)
- Etuves à 37 °C (Thermosi SR 2000) & à 105 °C
- Bain-marie (Bioblock scientific; polystat I ref. 33194 220V)
- Balance (Mettler E. Mettler)

III.3. Milieux de culture

III.3.1. Milieu de conservation et de sporulation de *S. ambofaciens* (milieu HT)

- Extrait de levure----- 1 g
- Extrait de viande----- 1 g
- Bactotryptone----- 2 g
- CoCl_2 , 6 H_2O ----- 20 mg
- Bacto-agar----- 20 g
- Dextrines blanches----- 10 g
- Eau distillée----- 1000 ml
- pH: 7

III.3.2. Milieu synthétique type

- Dextrines blanches----- 30 g
- Chlorure d'ammonium ----- 50 mM
- MgSO_4 ----- 15 mg
- KH_2PO_4 ----- 2 g
- CaCO_3 ----- 5 g
- MOPS----- 20 g
- CoCl_2 ----- 0,3 mg
- Eau distillée----- 1000 ml

La nature et la concentration de la source de carbone, ainsi que celles de la source d'azote peuvent être modifiées selon le but des expériences. Ce milieu synthétique sert également comme milieu de préculture.

III.3.3. milieu nutritif utilisé pour *B. subtilis*.

-Gélose nutritive-----	8 g
-Peptone-----	10 g
-Extrait de viande-----	3 g
-Extrait de levure-----	3 g
-D-glucose-----	8 g
-KH ₂ PO ₄ -----	100 mM
-Eau distillée-----	1000 ml
-pH 7	

III.4. Stérilisation

Les milieux sont stérilisés pendant 20 min à 120 °C . Afin d'éviter la réaction de Maillard (éviter la caramélisation de certains substrats) ainsi que la précipitation de sels minéraux, on sépare le milieu, en trois parties que l'on mélange seulement après stérilisation:

- Source de carbone
- NH₄Cl, MgSO₄, ZnSO₄
- KH₂PO₄, CaCO₃, NaCl, CoCl₂

III.5. Conduite des cultures

III.5.1. Conservation des souches

III.5.1.1. Conservation de *S. ambofaciens*

S. ambofaciens est fournie sous forme lyophilisée dans des ampoules stériles et scellées. La souche est régénérée sur milieu de préculture. Elle est conservée de deux manières différentes: soit par lyophilisation du mycélium, soit par conservation des spores dans une solution stérile de glycérol à 20 % à -20 °C.

III.5.1.1.1. Production des spores de *S. ambofaciens*

Des tubes inclinés contenant le milieu de sporulation sont ensemencés, puis incubés pendant deux semaines. Les spores et fragments de mycelium sont raclés avec un fil de platine et transférés dans un tube contenant 10 ml de tampon stérile Tris

(hydroxyméthyl) aminoéthane 50 mM; pH: 7,2; Triton X-100 (0,1 ml.l⁻¹) et 15 g.l⁻¹ de billes de verre de 2,5 mm de diamètre. La suspension est agitée au vortex pendant deux minutes, puis filtrée deux fois sur coton hydrophile en lavant à chaque fois avec 5 ml du tampon stérile cité précédemment. Le filtrat est centrifugé à 15 000 x g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois avec 8 ml de tampon (Tris-HCl 50 mM, pH: 7,2). Les spores lavées sont resuspendues dans une solution stérile de glycérol à 20 % et conservées à -20 °C.

III.5.1.1.2. Lyophilisation

Après incubation pendant 48 h, on mélange 1 ml de lait écrémé à 107,5 g.l⁻¹ avec 1 ml de suspension de mycélium, dans des tubes à hémolyse. Ceux-ci sont ensuite cotonnés, couverts de parafilm, perforés et congelés dans un mélange de carboglace et d'acétone à -70 °C, pendant 15 secondes et d'une façon homogène. Les tubes sont placés ensuite dans le lyophilisateur, puis sont conservés au congélateur, à l'abri de l'humidité.

III.5.1. 2. Conservation de *Bacillus subtilis*

Cette bactérie a été utilisée comme germe-cible pour le dosage de la spiramycine produite, par méthode antibiographique sur milieu solide. La méthode de conservation et le milieu de sporulation, ont été indiqués par Rhône-Poulenc Santé. Le milieu de sporulation comprend :

-Peptone-----	6 g
-Extrait de viande-----	1,5 g
-Extrait de levure-----	3 g
-D-glucose-----	1 g
-KH ₂ PO ₄ -----	0,8 g
-MnSO ₄ (1 g.l ⁻¹)-----	1 ml
-Agar-----	25 g
-Eau distillée -----	1000 ml
-pH: 7,3	

Après 15 jours d'incubation à 30 °C, les spores sont récupérées dans de l'eau distillée stérile puis pasteurisées et conservées à 4 °C.

III.5.2. Propagation de *S. ambofaciens*

Environ 10⁸ spores sontensemencées (0,6% V/V), sous une hotte à flux laminaire, dans 50 ml de milieu de préculture; la

préculture est utilisée après 48 h d'incubation à 28 °C sous agitation (agitateur rotatif à 250 rpm).

III.5.3. Cultures de *Streptomyces ambofaciens* en milieu liquide

Les cultures liquides discontinues sont réalisées dans des Erlenmeyers de 200 à 500 ml contenant 20 % de leurs volumes totaux. Les cultures de production sont ensemencées avec des précultures âgées de 48 h de façon à obtenir une densité optique de 0,3. Ces cultures dans les Erlenmeyers sont placées sur un agitateur rotatif à 250 rpm dans une chambre thermostatée dont la température est maintenue à 28 °C.

Les prélèvements destinés au dosage des antibiotiques et des substrats résiduels sont filtrés puis stockés à -20 °C. La durée de la culture est en général de 8 jours.

III.6. Méthodes analytiques

III.6.1. Estimation de la biomasse produite

La concentration cellulaire peut être estimée par lecture de la densité optique (DO) à 660 nm. Cette méthode permet de suivre la croissance et d'évaluer la biomasse, à condition de dissocier le mycélium. Etant donné la taille des amas (pellets) formés lors du développement du mycélium, il se révèle nécessaire d'utiliser la méthode décrite par Lubbe et coll. (1985): 1 ml de la suspension cellulaire est mélangé avec 9 ml de HCl 28 mM; le tout est soniqué pendant 40 secondes à une puissance de 60 W (à cette puissance les cellules ne sont pas lysées). Pour établir la corrélation entre la DO et le poids sec cellulaire, on fait appel à un étalonnage préalable. La courbe étalon est obtenue à partir d'un échantillon dont la DO à 660 nm est mesurée à partir de plusieurs dilutions convenables. Le poids sec de cet échantillon est déterminé après filtration sous vide sur une membrane préalablement tarée. Le rapport poids sec / DO est de 0,5 (g.l⁻¹ / unité de DO).

III.6.2. Dosage des protéines

Le dosage est effectué par la méthode de Lowry et coll. (1951). La courbe d'étalonnage est obtenue à partir d'une étalon de sérum albumine bovine à des concentrations connues.

III.6.3. Dosage des ions ammonium

L'électrode à ammoniac permet de doser l'ammonium après transformation en ammoniac en milieu alcalin. L'ammoniac dissout dans l'échantillon diffuse à travers la membrane jusqu'à ce qu'il y ait équilibre des pressions partielles de part et d'autre de celle-ci.

L'échantillon à analyser est dilué de façon à obtenir des concentrations en ammonium entre 0,9 mg et 18 mg.l⁻¹ de NH₄⁺. 5 ml de l'échantillon ainsi dilué sont ajoutés à 5 ml de soude concentrée afin d'atteindre un pH de 12. L'électrode à ammonium liée à un voltmètre est introduite dans cette solution alcaline et la détermination d'un potentiel proportionnel à la concentration d'ammonium dans l'échantillon est effectuée à une température de 25 °C.

III. 6. 4. Dosage de la spiramycine

La spiramycine produite lors de la culture de *S. ambofaciens* est dosée habituellement par une méthode microbiologique. On mesure le diamètre de la zone d'inhibition provoquée par la spiramycine vis à vis de la croissance de *Bacillus subtilis* se développant dans une boîte de Pétri contenant du bouillon nutritif solide. La spiramycine fournie par Rhône-Poulenc Santé est utilisée comme standard (spiramycine témoin).

III.6.4.1. Mode opératoire

100 ml de bouillon nutritif liquéfié sontensemencés par 0,1 ml de la suspension de spores de *Bacillus subtilis*. Ce milieu est réparti en boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Après solidification, des disques stériles de 6 mm de diamètre préalablement imprégnés par 20 µl de chaque solution de spiramycine sont déposés à la surface du milieu gélosé. La concentration des solutions des témoins varie de 5 à 400 mg.l⁻¹. Les échantillons de culture bactérienne à doser sont obtenus après filtration de quelques millilitres de culture. La teneur en spiramycine de ces échantillons ne nécessite pas de dilution (20 µl déposés sur les disques). Les boîtes de Pétri sont placées au réfrigérateur pendant une nuit afin de laisser diffuser la spiramycine dans le milieu solide. Les boîtes sont ensuite placées en étuve à 37 °C pendant une dizaine d'heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et la relation entre le logarithme de la concentration en spiramycine et le diamètre de la zone d'inhibition établie. Cette relation est linéaire pour des concentrations de spiramycine allant de 8 à 250 mg.l⁻¹. Les concentrations en spiramycine inférieures à 5 mg.l⁻¹ ne donnent pas de zones d'inhibition détectables.

III. 6. 4. 2. Dosage de la spiramycine par HPLC

L'analyse de filtrats de culture par HPLC montre que la spiramycine produite par *S. ambofaciens* dans toutes nos conditions de culture est formée essentiellement de la spiramycine I. Celle-ci domine aussi dans la spiramycine témoin utilisée (cf fig 1).

L'équipement utilisé consiste en une pompe 590, un injecteur U6K, un détecteur 481 à longueur d'onde variable, un intégrateur 740 et une colonne C18 (Novapak). Tout l'équipement a été fourni par la Société Waters.

La phase stationnaire est conditionnée pendant 20 min avec un éluant contenant 80 % d'une solution à 1 % d'acide sulfurique concentré et 20 % d'acétonitrile. Le débit utilisé est de 1 ml/min. Lorsque l'équilibre est atteint, 20 μ l de l'échantillon sont injectés. La séparation s'effectue avec le même éluant que celui qui a servi à conditionner la phase stationnaire. La détection se fait à 238 nm. Les temps de rétention respectifs de la spiramycine I, II et III sont 5,2; 8,2 et 15,7 min.

III.6.5. Dosage des acides gras à courtes chaînes

L'acétate, le propionate, le butyrate et l'isobutyrate sont dosés par chromatographie en phase gazeuse dans un chromatographe INTERSMAT IGC 121 EL. L'appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un intégrateur-enregistreur INTERSMAT ICR IB. Le gaz vecteur est l'azote, sa pression d'entrée est de 3 bars à 180 °C. Il constitue la phase mobile. La phase stationnaire est contenue dans une colonne en verre pyrex, remplie de PORAPAK Q 80, 100 mesh, de diamètre 2 mm, de longueur 2 mètres. La température de l'injecteur et du détecteur est de 220 °C; la température du four a été fixée à 180 °C. Une solution (étalon externe) contenant toutes les substances à doser, en concentrations connues, sert à étalonner le chromatographe.

Injection: 2 μ l d'un mélange de 1 ml d'étalon externe (ou échantillon) + 200 μ l d'étalon interne.

Etalon interne: 4ml de méthanol + 6,2 ml de HCl complétés à 100 ml avec de l'eau distillée.

Etalon externe: Acétate à 2 g.l⁻¹ + propionate à 2 g.l⁻¹ + butyrate à 2 g.l⁻¹ + isobutyrate à 2g.l⁻¹. Ces composés sont exprimés en acide.

III.7. Méthodes de dosage des activités enzymatiques

III.7.1. Préparation des extraits acellulaires

Les cellules sont récoltées par centrifugation à 10 000 x g pendant 10 min dans une centrifugeuse réfrigérée à 4 °C. Elles sont lavées dans de l'eau distillée puis dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8, contenant 1 mM DTT. Elles sont utilisées immédiatement après suspension dans le tampon.

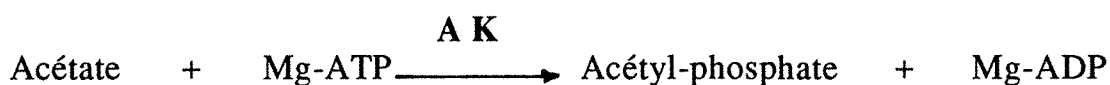
Les cellules sont désintégrées au sonicateur. La durée et la puissance de sonication ont été optimisées pour l'extraction du maximum d'activités enzymatiques; elles sont de 5 min et de 120 w, respectivement. Le refroidissement est assuré grâce à un cryostat permettant le maintien de l'extrait à une température de l'ordre de 4 °C. Après centrifugation à 14 000 x g pendant 30 min, le surnageant est utilisé immédiatement et constitue l'extrait brut.

III.7.2. Dosage de l'activité des kinases

(Selon Raczynska-Bojanowska et coll., 1973)

L'acétate kinase (EC 2.7.2.1) est une enzyme responsable de la phosphorylation de l'acétate en acétyl-phosphate. Elle peut aussi catalyser la réaction en sens inverse.

Réaction



Principe

L'acétate kinase transforme l'acétate en acétyl-phosphate en présence d'ATP. Par action de l'hydroxylamine, cet anhydride forme un acide hydroxamique révélé par les ions Fe^{3+} (coloration rouge). La mesure de l'absorption s'effectue à 540 nm (absorption maximale).

Essai standard

Concentrations dans le milieu réactionnel		Volume des solution-mères
Tris-HCl, pH 8 -----	20 mM	(0,3 ml)
Substrat(Acétate-K)-----	20 mM	(0,1 ml)
MgCl ₂ , H ₂ O-----	3,33 mM	(0,1 ml)
ATP-----	3,33 mM	(0,1 ml)

Hydroxylamine-----	230 mM	(0,15 ml)
KOH-----	230 mM	(0,15 ml)

Le volume final du milieu réactionnel est 1,5 ml.

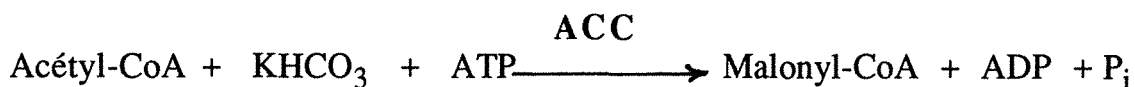
On ajuste le volume à 1,5 ml avec de l'eau distillée. La réaction démarre par l'ajout de 0,3 ml de l'extrait enzymatique. Après 10 min à une température de 40 °C, la réaction est arrêtée par ajout de 3 ml d'une solution 1,25 % de FeCl₃ solubilisé dans HCl 1 N.

L'activité enzymatique est déterminée par mesure de l'absorption à 540 nm, contre un blanc contenant tous les réactifs sauf le substrat. Elle est exprimée en μmoles d'acétyl-phosphate formées par min et par mg de protéines, en référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations déterminées d'acétyl-phosphate.

III.7.3. Dosage de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est une enzyme responsable de la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA.

Réaction



Principe

L'acétyl-CoA carboxylase catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Ce produit de la réaction est analysé et quantifié par HPLC. Cette méthode est basée sur le temps de rétention du produit, son spectre UV et son λ_{max} qui est de 254 nm. La mise au point de cette méthode ainsi que tous les détails nécessaires sont donnés dans le chapitre "Résultats".

Essai standard

Concentrations dans le milieu réactionnel		Volume des solution-mères
Tris-HCl, pH 8-----	62,5 mM	(50 μl)
Acétyl-CoA-----	0,20 mM	(50 μl)
KHCO ₃ -----	20,4 mM	(30 μl)
ATP-----	6,25 mM	(30 μl)
MgCl ₂ , H ₂ O-----	25,0 mM	(30 μl)

Le volume final du Milieu réactionnel est 240 μl.

La réaction démarre par ajout de l'extrait enzymatique (50 μl). Le mélange est incubé à 37 °C pendant 10 min. La réaction est

arrêtée par ajout d'une solution 10 % de TCA. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et utilisé ensuite pour les différentes analyses par HPLC.

Le blanc contient tous les réactifs, mais le TCA est ajouté au temps 0 min, avant l'addition de l'extrait enzymatique.

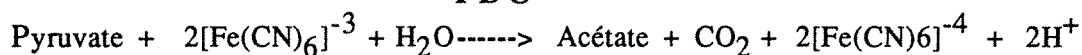
L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de malonyl-CoA formées par min et par mg de protéines, en référence à une analyse avec du malonyl-CoA commercial de concentrations déterminées.

III.7.4. Dosage de l'activité de la pyruvate décarboxylase

(Selon Reed et Williams, 1966)

Réaction

PDC



Principe

La méthode est basée sur la détermination colorimétrique du complexe du bleu de prusse de ferrocyanure produit par la décarboxylation oxydative du pyruvate. Le ferricyanure est l'accepteur d'électrons.

Essai standard

Concentrations dans le milieu réactionnel

Tampon phosphate pH 6-----	1 M
Thiamine pyrophosphate-----	2 mM
Sulfate de magnésium-----	3 mM
Pyruvate de potassium-----	80 mM
Ferricyanure de potassium-----	250 mM
Acide trichloroacétique (TCA)-----	10 % (W/V)
Duponol (Lauryl sulfate de sodium)-----	4 % (W/V)

Réactifs sulfate d'ammonium ferrique / Duponol

1,7 g de sulfate d'ammonium ferrique est dissous dans 10 ml d'eau distillée. Après filtration, cette solution est ajoutée à 20 ml d'une solution aqueuse de Duponol à 7,5 %. On ajoute alors 27 ml d'acide phosphorique à 85 % et on ajuste le mélange à 140 ml avec de l'eau distillée.

Milieu réactionnel

Le volume de solutions-mères des réactifs pour un volume final de 1,4 ml et les concentrations voulues:

0,15	ml-----	Tampon phosphate, pH 6
0,10	ml-----	Thiamine pyrophosphate
0,10	ml-----	Sulfate de magnésium
0,10	ml-----	Pyruvate de potassium
0,10	ml-----	Ferricyanure de potassium

On ajoute l'extrait enzymatique et on ajuste le volume à 1,4 ml avec de l'eau distillée. Le blanc contient tous les réactifs sauf l'extrait enzymatique. Le mélange est incubé à 30 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml de TCA à 10 %. Le mélange est centrifugé pendant 5 min ou filtré pour enlever les protéines dénaturées.

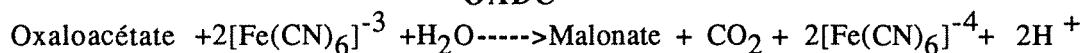
On ajoute 1 ml de TCA à 10 % et 0,1 ml de ferricyanure à 1 ml du milieu réactionnel recueilli après centrifugation ou filtration. On ajuste le volume à 2,4 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on ajoute 1 ml de Duponol à 4% et 0,5 ml du réactif de sulfate d'ammonium ferrique / Duponol. On mélange et on laisse reposer à température ambiante pendant 30 min. La densité optique est mesurée contre le blanc à 540 nm.

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de ferrocyanure formées par min et par mg de protéines, en référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations connues de ferrocyanure.

III.7.5. Dosage de l'activité de l'oxaloacétate décarboxylase (OADC)

Réaction

OADC



Le principe ainsi que le protocole réactionnel sont identiques à ceux du dosage de l'activité de la pyruvate décarboxylase cité ci-dessus, excepté le substrat qui est de l'oxaloacétate au lieu du pyruvate.

III.7.6. Dosage de l'activité de l'oxaloacétate déshydrogénase (OAH)

L'oxaloacétate déshydrogénase est un complexe multi-enzymatique responsable de la réduction de NAD^+ , de la décarboxylation de l'oxaloacétate et de la formation du malonyl-CoA.

Réaction**OADH**Principe

L'essai est basé sur la détermination et la quantification du malonyl-CoA par HPLC. La mise au point de la technique est décrite au chapitre "Résultats".

Essai standard

Concentrations dans le milieu réactionnel

Volume des solutions
mères

Tampon phosphate de potassium-----	0,5 M	(100 µl)
Chlorure de magnésium-----	10 mM	(100 µl)
NAD-----	0,1 M	(60 µl)
Cystéine hydrochloride (neutralisée)-----	30 mM	(100 µl)
Thiamine pyrophosphate-----	20 mM	(30 µl)
HS-CoA-----	3 mM	(60 µl)
Oxaloacétate-----	0,1 M	(30 µl)

Le volume final du milieu réactionnel est 750 µl.

La réaction est démarrée par ajout de l'extrait enzymatique (150 µl). Elle dure 10 min à 25 °C. Elle est stoppée par addition d'une solution 10 % de TCA. Le blanc contient tous les réactifs, le TCA étant ajouté avant l'extrait enzymatique. Après centrifugation, le surnageant obtenu sera utilisé pour les différentes analyses par HPLC.

L'activité enzymatique est exprimée en µmoles de malonyl-CoA formées par min et par mg de protéines, en référence à une analyse avec du malonyl-CoA commercial de concentrations déterminées.

III.7.7. Dosage de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH)

Le principe ainsi que le protocole réactionnel sont identiques à ceux du dosage de l'activité de l'oxaloacétate déshydrogénase cité ci-dessus, l'oxaloacétate étant remplacé ici par le pyruvate.

III.8. Méthodes de purification des enzymes

III.8.1. Précipitation fractionnée des protéines au sulfate ammonium

L'extrait enzymatique est traité au sulfate de streptomycine à 1 % pendant 30 min à 4 °C, puis centrifugé pendant 15 min à 20 000 x g. On écarte le culot contenant les sels de streptomycine des acides nucléiques précipités.

L'extrait protéique soluble ainsi obtenu est alors soumis à un fractionnement progressif au sulfate d'ammonium. Le sulfate d'ammonium est ajouté jusqu'à un certain pourcentage; chaque traitement dure 30 min à 4 °C en agitation douce; les protéines précipitées sont récoltées par centrifugation à 20 000 x g pendant 15 min. Les différents culots de précipitation sont resuspendus dans du tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8, puis ultrafiltrés sur membrane à seuil de coupure 10 000 pour éliminer en particulier le sel.

III.8.2. Chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel

Principe

Les résines du type D.E.A.E. sont des résines échangeuses d'anions grâce à la présence de groupements ammonium quaternaires.

Les radicaux diéthylaminoéthyl sont liés à la matrice (cellulose) par une liason éther.

La résine D.E.A.E. Séphacel a une structure microcristalline rigide et présente peu d'adsorptions non spécifiques ce qui permet une résolution et un rendement meilleur que ceux obtenus avec les échangeurs classiques.

Préparation de la résine

La D.E.A.E. Séphacel est fournie sous forme prégonflée, en suspension dans une solution de NaCl 0,5 M contenant 25 % d'éthanol et ne nécessite aucun prétraitement acide/base. Il suffit d'équilibrer l'échangeur dans le tampon de travail (Tris-HCl 100 mM de pH 8).

Puisque le tampon utilisé renferme le contre-ion d'origine (Cl^-), il suffit de placer la résine dans un excès de tampon et d'effectuer une série de lavages sur verre fritté, jusqu'à ce que le pH du filtrat soit identique au pH initial du tampon.

Préparation de la colonne

La capacité de la D.E.A.E. Sephacel étant relativement importante (environ 150 mg/ml pour la sérum albumine) il n'est

pas, en général, nécessaire de prévoir une colonne de grandes dimensions.

Nous avons utilisé une colonne de 1.2 cm x 16 cm (soit 18 ml de volume utile). La colonne est remplie avec une suspension épaisse de résine équilibrée dans le tampon, que l'on verse en une seule fois. La colonne est ensuite tassée en faisant circuler au moins deux volumes de tampon avec un débit qui doit être proche de celui prévu pour la chromatographie, c'est-à-dire environ 28 ml/heure. Les opérations sont menées à 4 °C.

Dépôt de l'extrait enzymatique et chromatographie

La préparation peut alors être déposée. L'élution débute par un lavage important (environ 5 fois le volume de la résine, avec le tampon Tris-HCl 100 mM de pH 8), puis se poursuit par un second lavage avec du tampon contenant du NaCl 0,1 M. Ensuite on applique un gradient croissant discontinu progressif de 0,1 M à 1 M, suivi d'un lavage final avec du NaCl 2 M.

L'élution des protéines est suivie par détection dans l' U.V. à 280 nm. Des fractions de 5 ml sont collectées et leur activité enzymatique testée dans les conditions de l'essai standard.

III.8.3. Filtration sur gel

III.8.3.1. AcA 44 Ultrogel

Principe

L'AcA 44 (Ultrogel) est un copolymère constitué de 4 % de polyacrylamide (Ac) et de 4 % d'agarose (A); le gel se présente sous forme de perles de 60 à 140 µm de diamètre. Il permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans la gamme de fractionnement comprise entre 10 000 et 130 000. Les molécules pénètrent plus ou moins profondément dans le gel suivant leur dimension et leur forme, de sorte que le temps de rétention des molécules est d'autant plus longue que leur taille est plus petite.

Préparation du gel, remplissage de la colonne

L'ultrogel est fourni sous forme hydratée, prêt à l'emploi. On prépare une suspension de gel à 40 % de Tris-HCl 100 mM de pH 8 que l'on dégaze dans une fiole à vide.

Le remplissage de la colonne se fait par gravitation en versant la suspension de gel en une seule fois. Nous avons utilisé une colonne de 1,5 cm x 95 cm, soit 167 ml de gel. Le gel est équilibré en faisant circuler 2 volumes de gel en tampon Tris-HCl 100 mM de pH 8 .

Pour obtenir une résolution satisfaisante, le volume de l'échantillon déposé doit être compris entre 0,5 et 4 % du volume du gel (soit pour la colonne utilisée entre 4 et 15 ml).

III.8.3.2. Séphacryl S-200

Principe

Le Séphacryl S-200 combine à la fois une structure à haute porosité et une excellente stabilité chimique et physique. C'est un gel de dextrane lié par des liaisons covalentes avec du N, N'-méthylène bisacrylamide pour donner un gel bien rigide. Ce gel se présente sous forme de perles de 40 à 105 μm de diamètre. Il permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans la gamme de fractionnement comprise entre 5000 et 250 000.

La préparation du gel et la confection de la colonne sont les mêmes que pour celles décrites précédemment pour l'ultrogel.

IV - RESULTATS

IV. RESULTATS

IV. 1. Acétate kinase

IV. 1. 1. Régulation de l'acétate kinase

L'acétate kinase constitue l'une des deux voies d'activation de l'acétate chez les procaryotes. Son activité est impliquée dans la formation des précurseurs de la synthèse de l'aglycone (platénolide), comme elle l'est pour la synthèse des acides gras. La mesure de l'activité spécifique de cette enzyme clé durant les phases de croissance et de production de l'antibiotique est donc fondamentale. Nous choisissons ici d'étudier l'influence de la source d'azote, et l'influence des acides gras à courtes chaînes, sur cette activité et sur la production de spiramycine, en fonction des résultats déjà obtenus et signalés auparavant.

IV. 1. 1. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur la production de spiramycine et la production d'acides gras

Au cours de tous nos travaux sur la production de spiramycine par *S. ambofaciens*, nous avons utilisé un milieu synthétique élaboré au laboratoire.

La nature et la concentration des substrats ont été déterminées de sorte que ce milieu permette une croissance satisfaisante de *S. ambofaciens* et une production significative de spiramycine.

En ce qui concerne la source de carbone et d'énergie, la souche peut utiliser des glucides tels que le glucose, le mannose, le galactose, les dextrines et l'amidon (Ninet et Verrier, 1960; Ashy et Abou Zeid, 1982). Nous avons choisi l'utilisation de dextrines, ces substrats réduisent le taux de croissance, et leur catabolisme réprime peu la synthèse de spiramycine.

Les acides gras à longues chaînes peuvent aussi servir de source de carbone et d'énergie. Toutefois, leur utilisation nécessite une longue adaptation. Leur catabolisme et l'incidence sur la production de spiramycine sont étudiées par ailleurs au laboratoire. Nous ne nous en sommes pas autrement préoccupés ici.

Plusieurs sources d'azote aussi bien organiques que minérales, se sont révélées aptes à permettre la croissance de *S. ambofaciens*, mais pour un milieu synthétique type, les ions ammonium se

révèlent être comme une bonne source d'azote à la concentration de 50 mM, lorsque les dextrines sont à concentration 30 g.l⁻¹.

La valine constitue une source d'azote favorisant la production de spiramycine. Nous utilisons ce substrat en comparaison à l'ammonium, particulièrement pour étudier son influence sur la fourniture de précurseurs de la partie aglycone et sur l'activité d'enzymes d'activation de l'acétate.

La nature du contenu du milieu en minéraux est importante, certains d'entre eux tels que le zinc et le cobalt, participent au contrôle de la production de spiramycine (Omura et coll., 1980; Ashy et Abou Zeid, 1982).

L'effet des sources d'azote, sur la production de spiramycine, est comparé sur deux fermentations l'une conduite sur milieu synthétique type avec du chlorure d'ammonium (50 mM), l'autre en présence de valine (50 mM).

L'ammonium permet d'obtenir une meilleure quantité de biomasse qu'avec la valine (fig 21). La vitesse spécifique de croissance est 0,063 h⁻¹ et la biomasse maximale atteint 6,1 g.l⁻¹ (poids sec) en présence d'ammonium. Ces valeurs sont 0,058 h⁻¹ et 4,35 g.l⁻¹ (poids sec) avec la valine.

Au cours de la première culture, la croissance de *S. ambofaciens* est limitée par l'ammonium. Celui-ci est totalement consommé après trois jours de culture, puis, il est excrété pendant la phase stationnaire de croissance jusqu'à atteindre la valeur de 8,5 mM (fig 22a). L'ammonium apparaît au troisième jour dans la culture sur valine, et continue à augmenter progressivement pour atteindre une concentration de 12,1 mM dans le milieu (fig 22b). L'évolution du pH extracellulaire reflète cette variation d'ion ammonium dans le milieu. En présence d'ammonium, la croissance s'accompagne d'une acidification du milieu de culture, alors qu'en présence de valine, le pH varie très peu. Cette acidification pourrait être expliquée par un relargage de protons dans le milieu, lors de l'assimilation de l'azote à partir de l'ammonium. Pendant la phase stationnaire, le pH augmente dans les deux cas. Cette augmentation du pH est parallèle à l'excrétion d'ammonium.

La production de spiramycine commence lors de la phase de ralentissement de croissance et se poursuit activement pendant la phase stationnaire. En présence d'ammonium (Fig 21a), les productions spécifiques et volumétriques maximales sont de 4,59 mg.g⁻¹ de poids sec cellulaire et de 28 mg. l⁻¹ respectivement. En

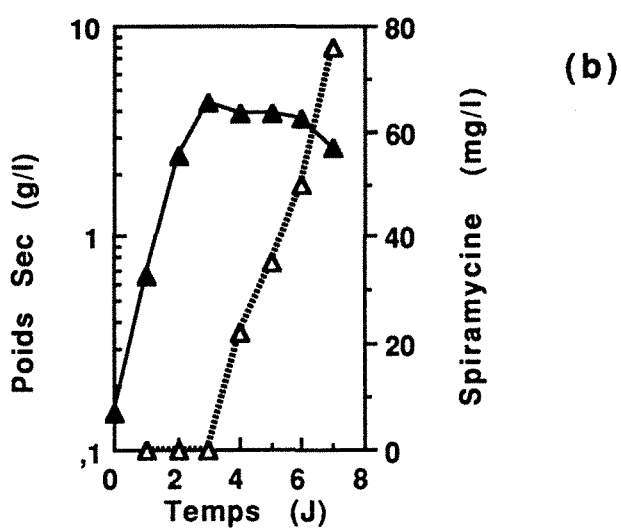
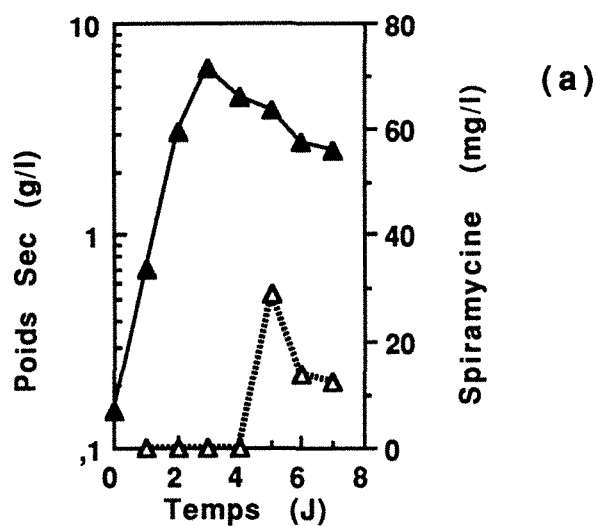


Figure 21 : Effet de l'ammonium et de la valine sur la production de spiramycine.

Cinétiques de croissance ($\blacktriangle$) et de production de spiramycine ($\triangle$) sur milieu synthétique type avec 30 g.l^{-1} de dextrines en présence de NH_4Cl 50 mM (a) ou de valine 50 mM (b).

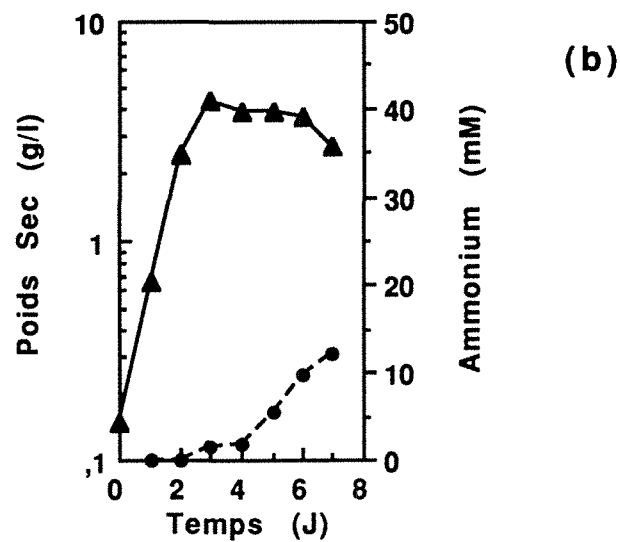
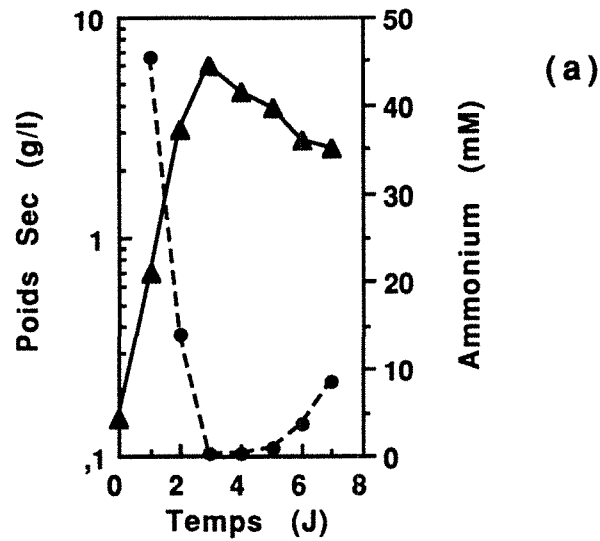


Figure 22 : Consommation et excrétion d'ammonium dans le milieu extracellulaire.
 Cinétique de croissance ($\blacktriangle$) et évolution d'ammonium ($\bullet$) dans le milieu de culture avec 30 g.l^{-1} de dextrines, en présence de NH_4Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

présence de valine (Fig 21b), elles sont de $18,4 \text{ mg.g}^{-1}$ et de 80 mg.l^{-1} .

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse du milieu extracellulaire montre la présence des acides gras à courtes chaînes. La nature et la quantité de ces acides gras dépendent de la nature de la source d'azote présente dans le milieu de culture. Lorsque ce dernier contient de la valine (Fig 23), il y a une présence transitoire d'acétate, d'isobutyrate, de propionate et de butyrate au cours de la fermentation. La somme des acides gras présents varie en fonction de l'âge de la culture. Cette somme est assez importante pendant la trophophase puisqu'elle atteint une concentration de $5,4 \text{ g.l}^{-1}$. Cette valeur diminue progressivement jusqu'à atteindre une concentration de $0,26 \text{ g.l}^{-1}$ à 7 jour de fermentation. Parmi les acides gras présents dans le milieu de culture, l'acétate est quantitativement le plus important au début, alors que l'isobutyrate est à concentration plus faible. L'apparition de ce dernier dans le milieu de culture précède immédiatement la production de spiramycine. Il atteint une concentration de $2,75 \text{ g.l}^{-1}$ au début de l'idiophase et disparaît par la suite. Sa disparition du milieu s'effectue pendant la phase stationnaire de croissance lors de la production de spiramycine.

Dans le cas de la culture sur ammonium (Fig 24), la concentration extracellulaire des acides gras à courtes chaînes est moins importante, voire négligeable par rapport à celle sur valine. En début de fermentation, elle est 100 fois plus faible. Au troisième jour, elle est 40 fois plus faible. En fin de fermentation, elle est trois fois plus faible. Cette différence d'évolution des acides gras à courtes chaînes peut être rapprochée de la différence d'évolution de spiramycine entre les deux types de fermentation.

IV. 1. 1. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'acétate kinase

La présence des acides gras à courtes chaînes plus importante en milieu valine, semble stimuler la biosynthèse de spiramycine. Pour que ces acides gras soient utilisables par le système "poly-kétides synthétase", ils doivent être transportés dans la cellule puis activés en acylthioesters.

Dans les mêmes conditions de culture que celles indiquées auparavant (dextrines 30 g.l^{-1} ; NH_4Cl 50 mM ou valine 50 mM), nous avons suivi l'évolution de l'acétate kinase. Dans les deux cas, l'acétate kinase présente deux *maxima* d'activité, l'un pendant la phase exponentielle de croissance et l'autre pendant la phase stationnaire.

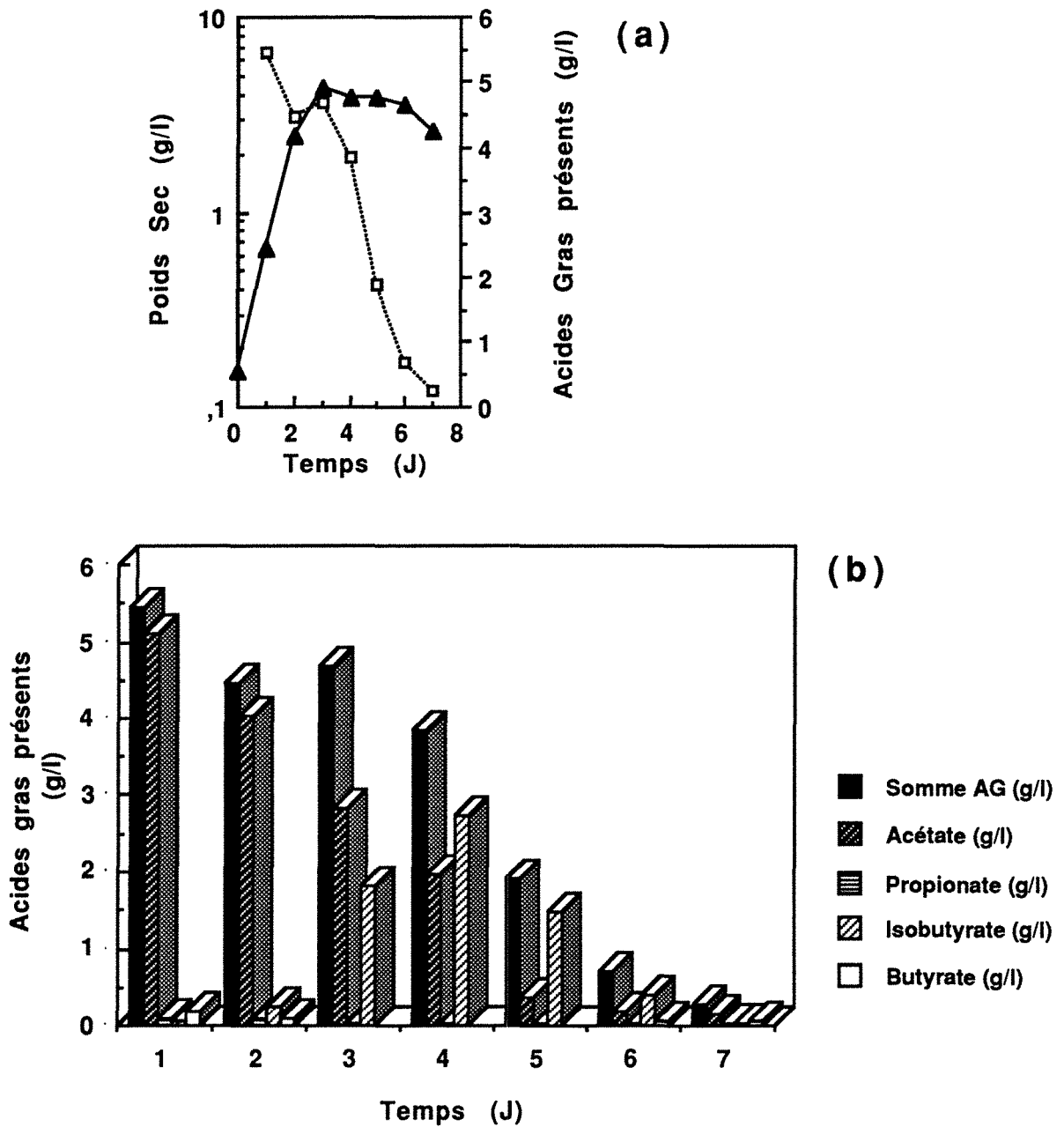


Figure 23 : Présence d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu extracellulaire.

Evolution de l'apparition d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de valine (50 mM).

- (a): Cinétique de croissance (▲) et évolution de la somme des acides gras présents dans le milieu (□).
- (b): Evolution de l'apparition transitoire de chaque acide gras.

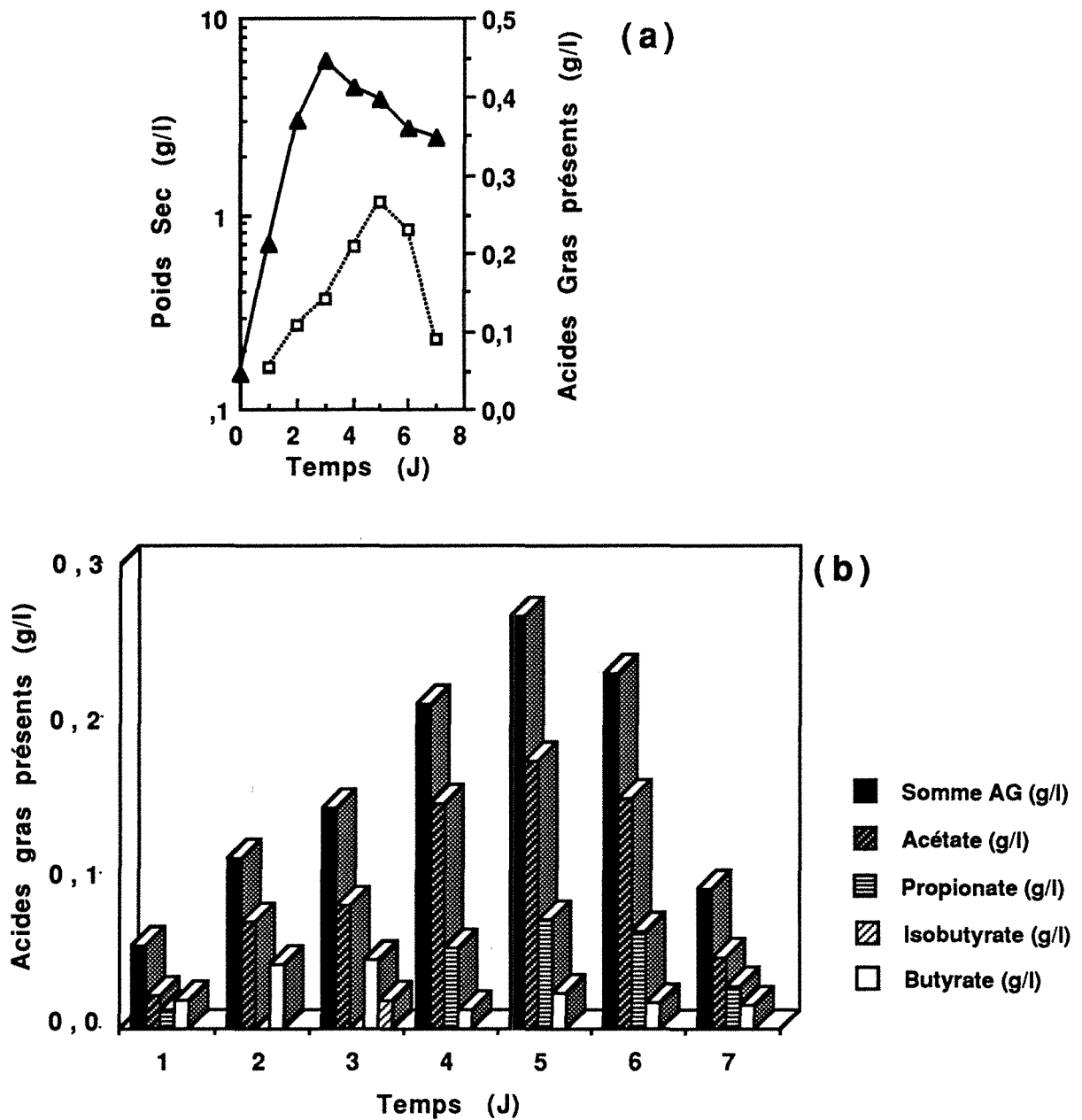


Figure 24 : Présence d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu extracellulaire.

Evolution de l'apparition d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de NH_4Cl (50 mM).

- (a): Cinétique de croissance (▲) et évolution de la somme des acides gras présents dans le milieu (□).
- (b): Evolution de l'apparition transitoire de chaque acide gras.

Le deuxième coïncide avec la phase de biosynthèse de spiramycine (fig 21).

Sur milieu ammonium (Fig 25a), l'activité spécifique de l'acétate kinase est 0,09 $\mu\text{moles d'acétyl-phosphate formé par min et par mg de protéines}$, en phase exponentielle de croissance. Cette activité spécifique chute lors du ralentissement de croissance. Elle augmente transitoirement lors de la phase stationnaire. Elle atteint un maximum de 0,106 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

Sur milieu valine (Fig 25b), l'activité spécifique est plus élevée en phase exponentielle de croissance (0,134 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) que sur milieu ammonium. En idiophase, cette activité de l'acétate kinase est 0,095 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Une diminution de l'activité spécifique est aussi observée lors du ralentissement de croissance, suivie d'une augmentation transitoire lors de la phase stationnaire. Le maximum d'activité spécifique pendant (0,095 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) n'est pas significativement différent de celui sur milieu ammonium.

Bien que la production de spiramycine soit beaucoup plus élevée sur milieu valine que sur milieu ammonium, les activités spécifiques de l'acétate kinase en phase stationnaire de croissance sont du même ordre dans les deux milieux.

IV. 1. 1. 3. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur la production de spiramycine

L'addition d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu de culture contenant une source de carbone glucidique (dextrines) stimule la production de spiramycine, probablement en augmentant la disponibilité en acylthioesters C_2 , C_3 , C_4 nécessaires à la synthèse de l'aglycone. La stimulation de la biosynthèse de certains polykétides par des acides gras à courtes chaînes a été rapportée, notamment dans le cas de l'érythromycine (Raczynska- Bojanowska et coll., 1970; Mandal et coll., 1988).

L'influence des acides gras précurseurs sur la production de spiramycine chez *S. ambofaciens* a été étudiée au laboratoire (Khaoua et coll., 1992). Dans un milieu de culture (30 g.l^{-1} de dextrines, 50 mM de chlorure d'ammonium), de l'acétate, du propionate ou du butyrate ont été ajoutés en début de culture, seuls ou en différentes combinaisons, à concentrations initiales totales de 10 ou 15 mM.

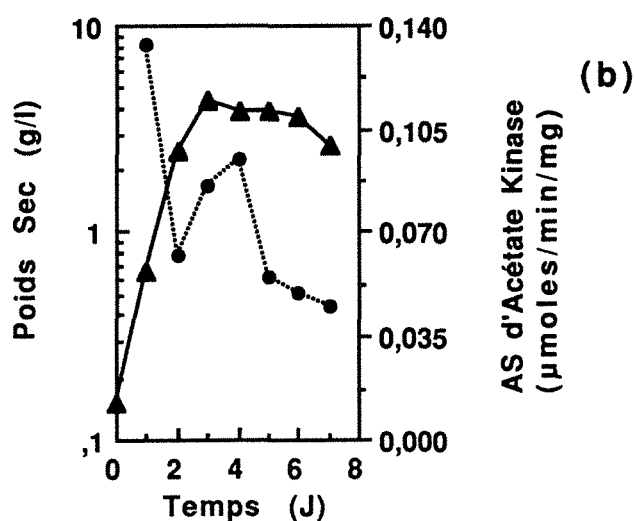
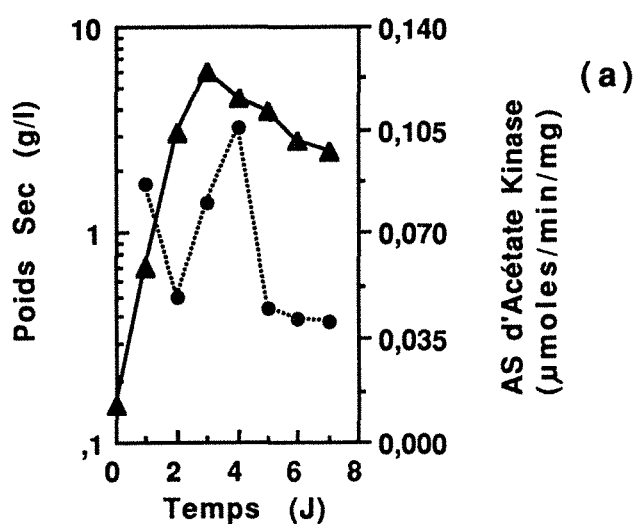


Figure 25 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité acétate kinase.

Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'acétate kinase (●) sur le milieu de culture avec 30 g.l⁻¹ de dextrines, en présence de NH₄Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

Le choix des additions et des concentrations des acides gras seuls ou en combinaisons joue un rôle important dans la stimulation de la production de spiramycine.

Toutes ces additions n'ont aucun effet sur la production de biomasse, l'ammonium étant le substrat limitant. Par contre, elles stimulent la production de spiramycine d'autant plus que cette addition est plus proche du moment de cette biosynthèse.

L'observation de l'importante présence d'acides gras à courtes chaînes notamment acétate et isobutyrate sur milieu contenant la valine comme source d'azote, en relation avec une meilleure production de spiramycine, nous a incité à rechercher si la production accrue de spiramycine était due directement à la valine, ou indirectement aux acides gras. Trois fermentations ont été conduites en milieu contenant 30 g.l⁻¹ de dextrines et 50 mM de chlorure d'ammonium. Ont été ajoutés:

- _ dans la première fermentation: 1 g.l⁻¹ d'isobutyrate, après 24 heures de fermentation;
- _ dans la deuxième fermentation: 2,8 g.l⁻¹ d'isobutyrate, après 24 heures de fermentation;
- _ dans la troisième fermentation: 5 g.l⁻¹ d'acétate après 12 heures, puis 2,8 g.l⁻¹ d'isobutyrate après 48 heures.

Les deux premières fermentations ont pour but d'apprécier l'effet de la concentration d'isobutyrate, ajouté après 24 heures, sur la production de spiramycine.

La nature, la concentration et le moment d'ajout des acides dans la troisième fermentation tentent de reproduire ce qui était observé sur milieu valine (fig 23).

Par rapport à la fermentation témoin sur ammonium sans ajout (fig 21), les trois cultures (Fig 26a, b et c) montrent une croissance plus rapide. Des vitesses maximales spécifiques des trois cultures sont du même ordre (0,081 h⁻¹). La biomasse produite dans ces trois fermentations est identique (maximum atteint: 6,5 g.l⁻¹); elle correspond à celle du témoin. Dans toutes ces fermentations, la production de la biomasse est limitée par l'ammonium.

Au cours de ces trois fermentations, l'ammonium est totalement consommé pendant la croissance, puis, il est relargué pendant la phase stationnaire dans le milieu jusqu'à atteindre les valeurs de 19 mM, 15 mM et 10 mM dans la première, deuxième et troisième fermentation (fig 27).

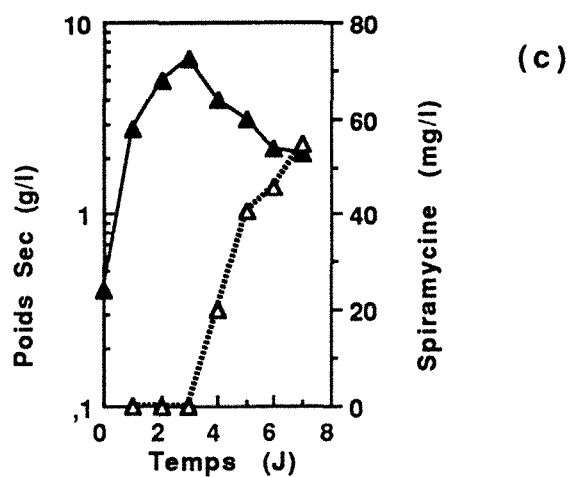
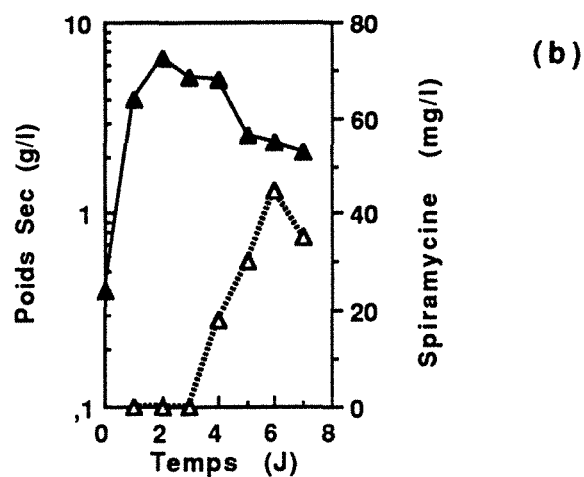
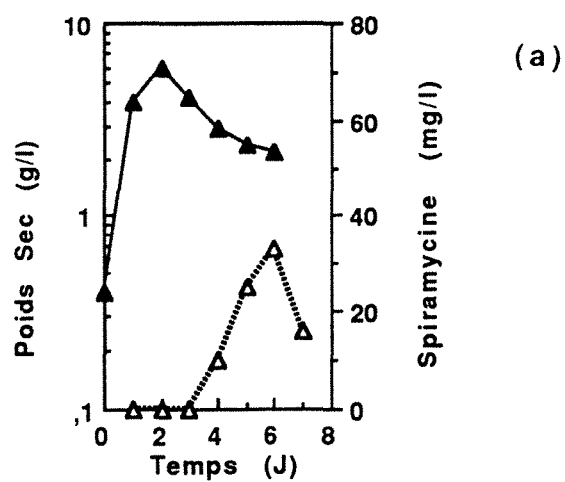


Figure 26 : Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur la production de spiramycine.

Cinétiques de croissance (▲) et de production de spiramycine (Δ) sur le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de NH_4Cl (50 mM) avec:

- (a) : 1 g.l^{-1} d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (b) : $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (c) : 5 g.l^{-1} d'acétate ajouté après 12 h et $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate après 48 h de fermentation.

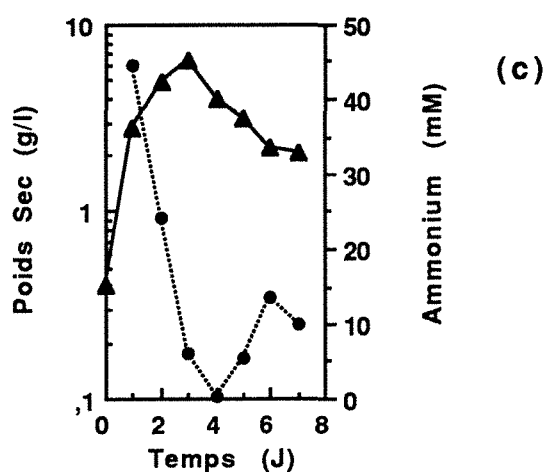
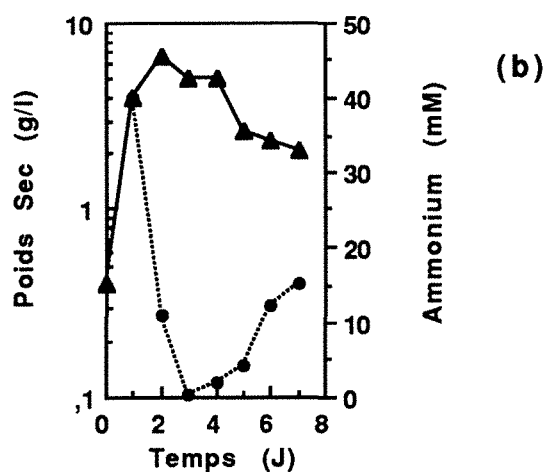
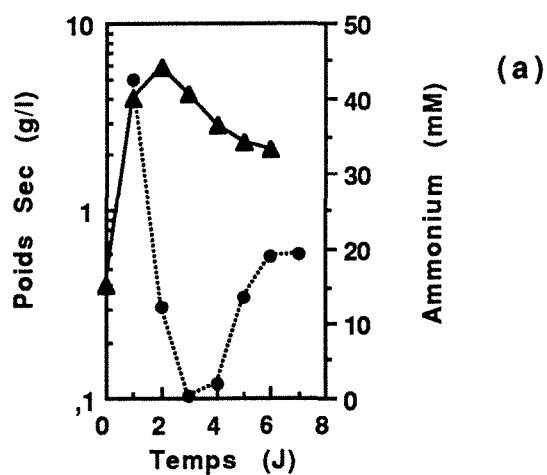


Figure 27 : Consommation et présence de l'ammonium dans le milieu.

Cinétique de croissance (▲) et évolution d'ammonium (●) dans le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de NH_4Cl (50 mM), avec:

- (a) : 1 g.l^{-1} d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (b) : $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (c) : 5 g.l^{-1} d'acétate ajouté après 12 h et $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate après 48 h de fermentation.

La production de spiramycine par *S. ambofaciens* dans ces trois fermentations a été mesurée (Fig 26). Quand la concentration d'isobutyrate ajouté est de 1 g.l⁻¹ ou 2,8 g.l⁻¹, la production volumétrique de spiramycine est respectivement améliorée de 18 % ou 61 % par rapport à la production sur ammonium sans ajout. L'addition successive d'acétate et d'isobutyrate permet une amélioration de la production volumétrique de la spiramycine de 90 %. La production de spiramycine est donc accrue par l'isobutyrate, d'autant plus que la concentration de l'acide est élevée. Elle est aussi plus fortement accrue par l'addition successive d'acétate et d'isobutyrate, ceux-ci semblent simuler l'effet de la culture sur valine en ce qui concerne la production de spiramycine.

IV. 1. 1. 4. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité spécifique de l'acétate kinase

L'effet inducteur des acides gras à courtes chaînes sur la synthèse de l'acétate kinase a été démontré au laboratoire. Nous avons étendu les observations de Khaoua et coll. (1992) en cherchant l'effet de l'isobutyrate seul ou en combinaison avec l'acétate. L'ajout de 1 g.l⁻¹ d'isobutyrate après 24 heures de fermentation (Fig 28a), ne modifie pas l'activité spécifique de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance. Par contre, en phase stationnaire cette activité chute d'environ 47 %, par rapport au témoin sur ammonium sans ajout.

L'addition de 2,8 g.l⁻¹ d'isobutyrate en début de culture (Fig 28b), augmente légèrement l'activité de l'acétate kinase, cette augmentation est de l'ordre de 8 % en phase exponentielle.

L'addition d'acétate 5 g.l⁻¹ après 12 heures et d'isobutyrate 2,8 g.l⁻¹ après 48 heures de fermentation (Fig 28c) provoque une augmentation de l'activité spécifique de l'acétate kinase plus importante que précédemment (19 %).

L'évolution de l'activité de l'acétate kinase au cours de cette dernière fermentation est pratiquement semblable à celle obtenue lors de la culture sur valine 50 mM (ou NH₄Cl). L'addition successive d'acétate et d'isobutyrate semble simuler l'effet de la culture sur valine vis-à-vis de l'activité de l'acétate kinase comme de la production de spiramycine (fig 26).

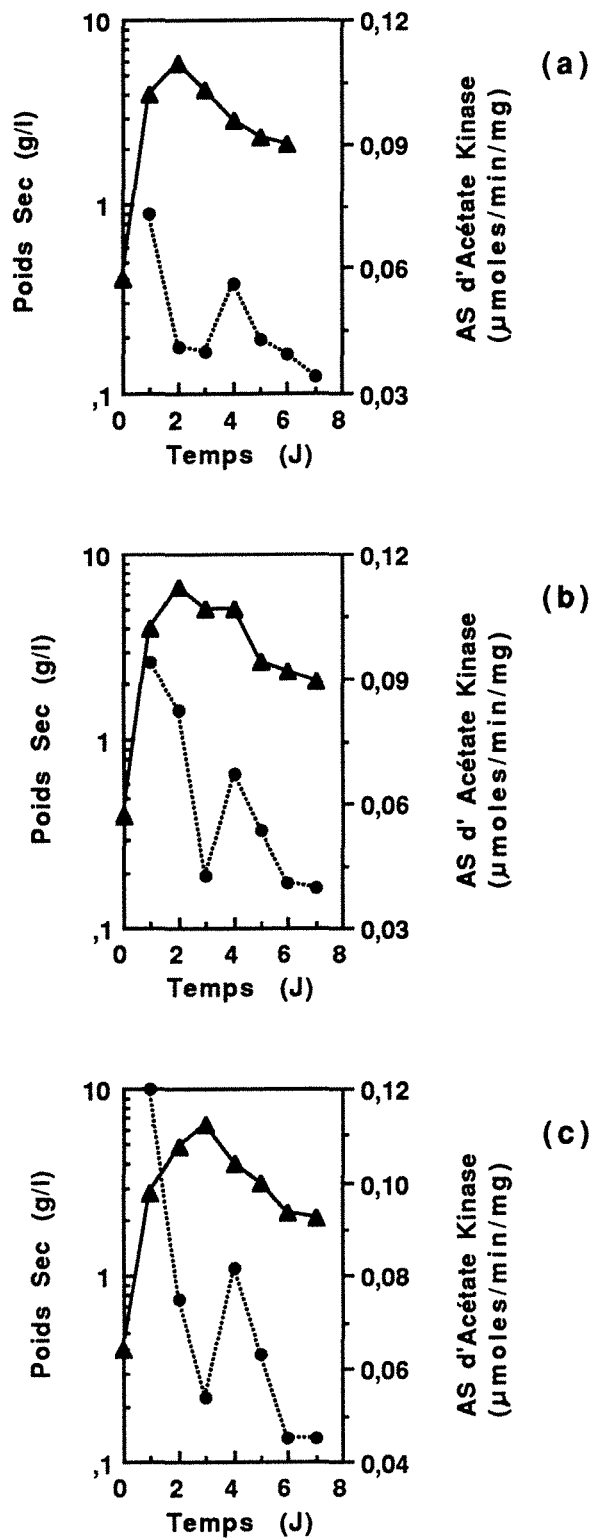


Figure 28 : Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité acétate kinase.

Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'acétate kinase (●) sur le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de NH_4Cl (50mM), avec:

- (a) : 1 g.l^{-1} d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (b) : $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (c) : 5 g.l^{-1} d'acétate ajouté après 12 h et $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate après 48 h de fermentation.

IV. 1. 2. Acyl-kinase en phase exponentielle de croissance

Deux systèmes enzymatiques d'activation des acides gras à courtes chaînes sont connus: acyl-CoA synthétases et acyl-kinases couplées aux acyl-phosphotransférases. Ces deux systèmes d'activation peuvent exister simultanément chez les procaryotes, alors que chez les eucaryotes, seul le système des acyl-CoA synthétases est présent (Brown, 1977).

Chez *S. ambofaciens* les deux systèmes existent, toutefois le système des acyl-synthétases n'est présent que pendant la trophophase (Khaoua, 1990), alors que le système des acyl-kinases et acyl-phosphotransférases est présent pendant la trophophase et l'idiophase. Il est probable que ce deuxième système soit impliqué dans la synthèse de spiramycine. Les acides gras sont d'autant plus favorables à la production de l'antibiotique qu'ils agissent, non seulement comme précurseurs, mais aussi comme inducteurs de leur activation par les kinases.

Jusqu'ici, au laboratoire la mise en évidence des activités des acyl-kinases et l'étude des variations de leur activité spécifique lors des différentes phases de croissance de *S. ambofaciens* se sont faites à partir des extraits acellulaires bruts. Pour apprécier si les acyl-kinases produites lors de la phase exponentielle et lors de la phase stationnaire sont une même enzyme ou des enzymes différentes, nous avons été amenés à purifier ces enzymes.

IV. 1. 2. 1. Purification partielle de l'activité produite en phase exponentielle de croissance

Le protocole final exposé ci-après résulte de divers essais préliminaires mettant en oeuvre différentes méthodes de purification. Ces essais préliminaires ne sont pas rapportés. Les détails des méthodes utilisées sont décrits aux paragraphes III. 7 et III. 8.

IV. 1. 2. 1. 1. Préparation de l'extrait acellulaire

L'extrait acellulaire a été obtenu à partir d'une culture de 4 l conduite en milieu synthétique (dextrines 30 g.l⁻¹, NH₄Cl 50 mM) additionnée avec 10 mM d'acétate, inducteur de la synthèse de l'enzyme. Les cellules ont été récoltées après 24 h de croissance, en phase exponentielle de croissance. Le surnageant obtenu après désintégration des cellules au sonicateur et élimination des débris

cellulaires par centrifugation constitue l'extrait brut. Sa concentration protéique est 5 mg.ml^{-1} et son activité spécifique est de $0,245 \text{ } \mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine. L'activité totale des 466 ml d'extrait représente $494,2 \text{ } \mu\text{moles.mn}^{-1}$. C'est la référence 100 % d'activité totale.

L'activité de l'acétate kinase a été dosée par la méthode colorimétrique à l'hydroxamate.

IV. 1. 2. 1. 2. Ultracentrifugation et traitement au sulfate de streptomycine

Le surnageant obtenu après centrifugation de l'extrait brut à $30\,000 \times g$ pendant 2 h 30 min à 4°C contient 94 % de l'activité totale.

A ce stade de traitement au sulfate de streptomycine, l'activité enzymatique est de $0,253 \text{ } \mu\text{moles.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, avec un rendement de 93 % de l'activité totale.

IV. 1. 2. 1. 3. Précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium

L'extrait protéique soluble ainsi obtenu a été soumis à un fractionnement progressif au sulfate d'ammonium.

Le sulfate d'ammonium a été ajouté jusqu'à un certain pourcentage de saturation:

- _ 0 à 46 % = F_1
- _ 46 à 72 % = F_2
- _ surnageant de F_2 = F_3

Les fractions relarguées les plus riches en activité enzymatique ont été obtenues avec des concentrations de sulfate d'ammonium comprises entre 46 - 72 % de saturation (fraction F_2).

Dans ces fractions, l'enrichissement est de l'ordre de 8 fois, avec un rendement en activité totale de 77 %.

IV. 1. 2. 1. 4. Ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure 10 000

La fraction F_2 contenant l'activité enzymatique est ultrafiltrée sur une membrane à seuil de coupure 10 000.

L'activité est totalement retenue, alors que les sels et les petites molécules de la préparation enzymatique sont éliminés.

A ce stade, l'activité spécifique est d'environ 10 fois celle de l'extrait brut, avec un rendement de 73 %.

IV. 1. 2. 1. 5. Filtration sur gel de Séphacryl S-200

Un exemple de profil d'élution de l'acétate kinase en filtration sur gel de Séphacryl S-200 est donné dans la figure 29.

A ce niveau, nous arrivons à obtenir un degré de purification de 22 fois, avec un rendement en activité totale de 71 %.

IV. 1. 2. 1. 6. Chromatographie sur colonne de D.E.A.E. Séphacel

Un exemple de profil d'élution de l'acétate kinase en chromatographie sur colonne D.E.A.E. Séphacel est donné dans la figure 30. Les fractions actives ont été obtenues dans le NaCl de concentration 0,2 M.

A ce stade de purification, l'extrait enzymatique est enrichi 180 fois, avec un rendement en activité totale de 41 %.

IV. 1. 2. 1. 7. Bilan de la purification

Le tableau 1, résume les résultats obtenus lors de la succession des différentes opérations de purification.

L'enchaînement des différentes étapes a permis d'obtenir un extrait enzymatique dont l'activité spécifique est de $43,5 \mu\text{moles.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. L'enrichissement a été de 180 fois par rapport à l'extrait brut, le rendement en activité totale a été de 41 %.

L'enzyme, dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 avec 1 mM de DTT, est stable pendant plusieurs mois à -20°C . A $+4^{\circ}\text{C}$, la stabilité est suffisante pour conserver une activité identique pendant plus d'une semaine.

La présence de 1 mM de DTT est indispensable pour le maintien de son activité pendant la purification et le stockage.

IV. 1. 2. 2. Caractérisation partielle en phase exponentielle de croissance

Toute cette partie caractérisation a été faite sur un extrait enzymatique partiellement purifié, après chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel .

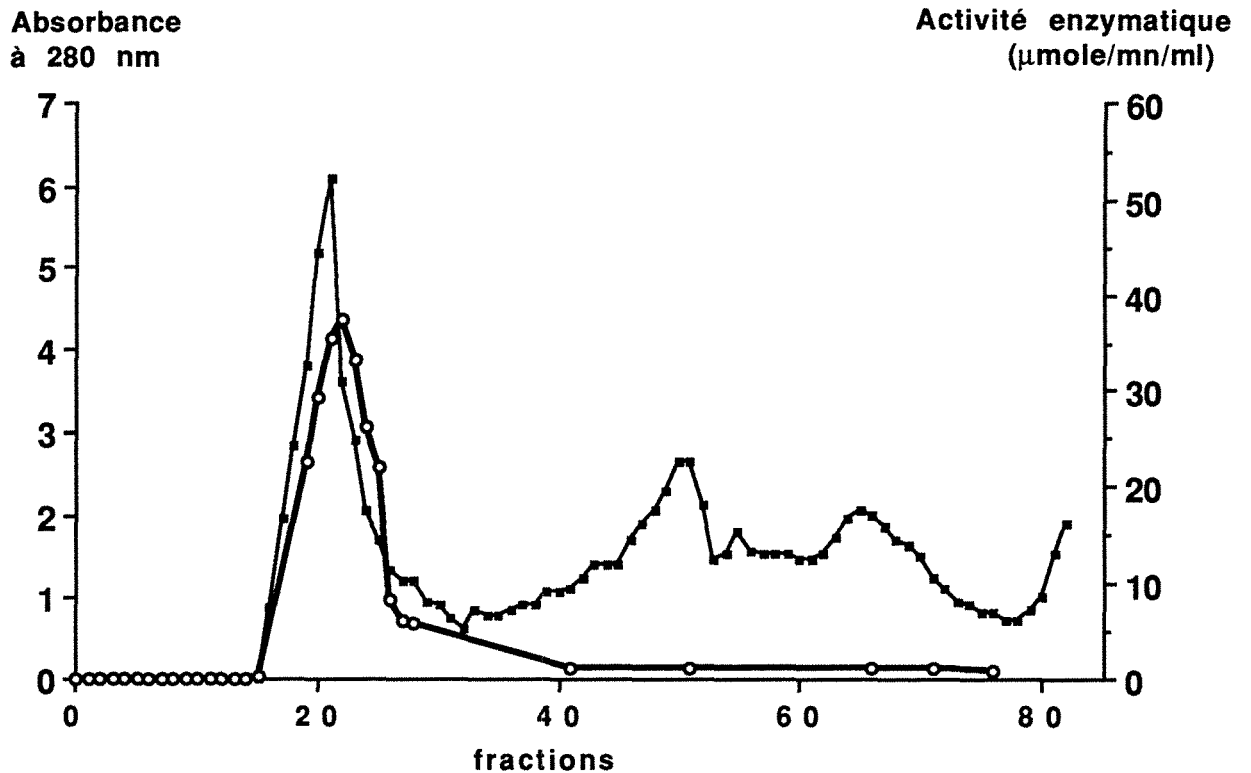


Figure 29 : Filtration sur gel de Séphacryl S-200 (gamme de fractionnement : (5000-250000) de l'acétate kinase de *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance.

Colonne de Séphacryl S-200 (1,5 cm x 95 cm, volume 167 ml) équilibrée dans du Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. Dépôt de la fraction ultrafiltrée après traitement au sulfate d'ammonium (130 mg de protéines). Elution avec le tampon d'équilibration. Débit d'élution : 60 ml/h. Fractions recueillies : 4 ml.

(●) : Absorbance à 280 nm.

(○) : Activité enzymatique (μmoles/min/ml)

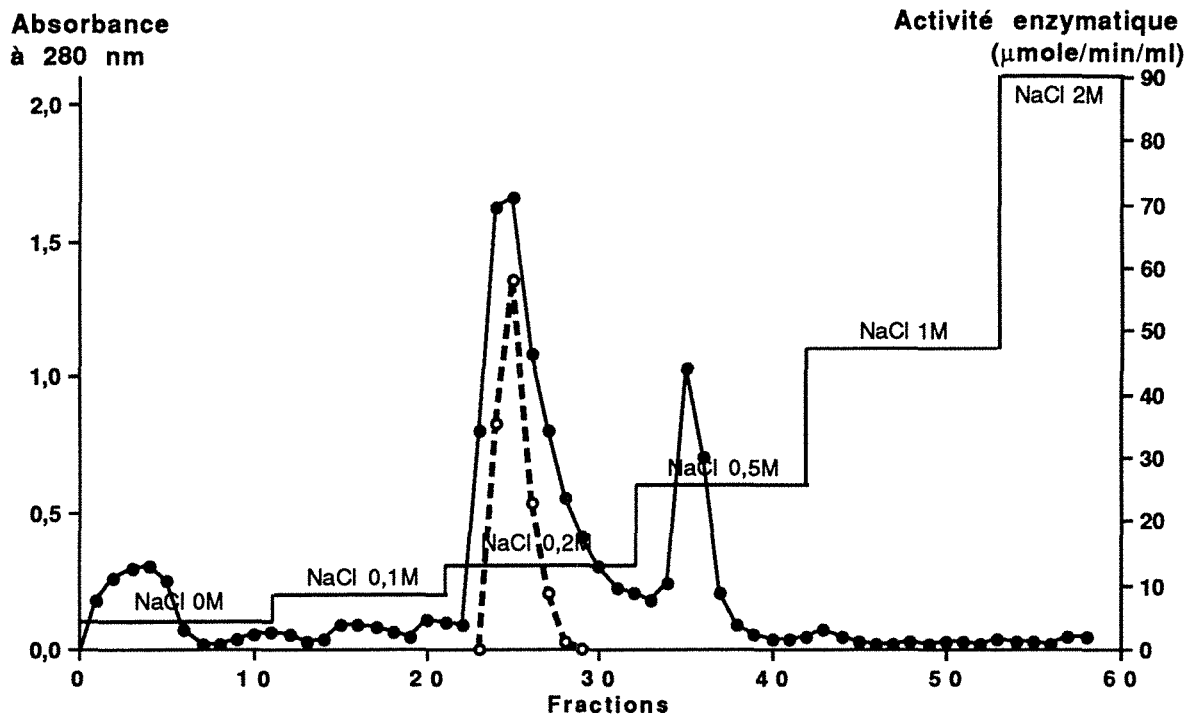


Figure 30 : Chromatographie sur colonne D.E.A.E. Séphacel: activité acétate kinase de *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance.

Colonne de D.E.A.E. Séphacel (1,2 cm x 16 cm; 18 ml) équilibrée dans du Tris-HCl 100 mM à pH 8,0. Dépôt (60 mg de protéines) des fractions riches obtenues après filtration sur gel de Séphacryl S-200. Elution avec un gradient discontinu croissant en NaCl dans du Tris-HCl à pH 8,0 (0 à 2 M). Débit d'élution: 30 ml/h. Fractions recueillies: 5 ml.

(●) : Absorbance à 280 nm

(○) : Activité enzymatique (μmole/min/ml)

Etapes	Protéines en mg (PT)	A.S $\mu\text{mole/mn/mg}$	A.T $\mu\text{mole/mn}$	Purification	Rendement % en A.T
Extrait brut	2013,10	0,24	494,2	1,00	100
Ultracentrifugation	1881,40	0,25	464,6	1,01	94
Traitement au sulfate de streptomycine 1%	1815,50	0,25	459,6	1,03	93
Sulfate d'ammonium 0-46% = F1	150,90	0,06	9,7		
Sulfate d'ammonium 46-72% = F2	199,80	1,90	378,8	7,74	77
Surnageant de F2 = F3	1510,00	0,02	25,2		
Ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure 10000 d	150,60	2,41	363,6	9,85	73
Filtration sur gel Séphacryl S-200	65,80	5,37	353,5	21,93	71
Chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel	4,65	43,44	202,0	$\approx 180,00$	≈ 41

Tableau 1 : Etapes de purification partielle de l'acétate kinase synthétisée par *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance.

IV. 1. 2. 2. 1. Spécificité de l'acétate kinase vis-à-vis de certains substrats

Dans les mêmes conditions réactionnelles que celles de l'essai standard (III. 7. 2.), un certain nombre d'acides ont été testés, à la concentration finale de 40 mM, afin d'évaluer leurs aptitudes à recevoir du phosphate.

Le tableau 2, indique l'activité relative de l'acétate kinase vis-à-vis des différents substrats utilisés. L'acétate kinase de *S. ambofaciens* est capable de phosphoryler certains substrats acides ayant un nombre de carbone allant de 2 à 5 atomes. La capacité à phosphoryler d'autres acides n'a pas été étudiée.

Avec le propionate, l'activité est de 65 % de celle mesurée avec l'acétate. Cette activité relative diminue progressivement jusqu'à 13 % dans le cas du fumarate et du méthylmalonate.

L'acétate kinase peut phosphoryler les acides carboxyliques saturés à courtes chaînes linéaires tels que l'acétate, le propionate et le butyrate. Les acides carboxyliques ramifiés comme l'isobutyrate et l'isovalérate sont également utilisés comme substrats. Elle peut même utiliser le fumarate en tant qu'acide dicarboxylique insaturé.

Cette expérience préliminaire montre que l'acétate kinase possède une assez large spécificité de substrats. Elle est plus spécifique de l'acétate. Toutefois les valeurs relatives indiquées pour les différents acides ne donnent qu'une valeur indicative, les conditions expérimentales utilisées (40 mM des substrats acides) étant choisies arbitrairement. Une analyse plus fine de l'activité vis-à-vis des différents substrats nécessite la détermination des paramètres cinétiques.

IV. 1. 2. 2. 2. Paramètres cinétiques de l'enzyme

Pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis des acides, les essais ont été réalisés en présence de ATP-Mg²⁺ à la concentration de 7 mM et des concentrations variables d'acides gras. Tous les essais avec les différents acides ont été faits avec la même quantité de l'extrait enzymatique, ce qui permet de comparer les V_{max} . Nous avons utilisé la représentation des résultats selon Lineweaver et Burk pour déterminer ces paramètres. Dans les zones de concentrations utilisées pour les différents acides, cette représentation est linéaire. L'enzyme présente donc pour tous ces substrats une cinétique michaelienne. Par exemple, dans le cas de

Substrats	Activité acétate kinase (%)
Acétate	100
Propionate	65
Isobutyrate	52
Isovalérate	43
Butyrate	17
Méthylmalonate	13
Fumarate	13

Tableau 2 : Spécificité de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en substrat acide: 40 mM, concentration en ATP-Mg²⁺: 7 mM.

Concentration protéique: 45 µg.ml⁻¹.

Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle avec l'acétate, prise comme référence (100 % d'activité).

l'acétate, les concentrations utilisées allaient jusqu'à 35 mM; le K_m apparent pour l'acétate a pour valeur 8,3 mM.

Les essais pour déterminer le K_m apparent de l'enzyme pour le complexe ATP-Mg²⁺ ont été réalisés en utilisant l'acétate comme autre substrat, à concentration 40 mM et des concentrations variables de ATP-Mg²⁺.

Les valeurs des paramètres K_m apparent et V_{max} pour la concentration d'enzyme choisie sont indiquées dans le tableau 3.

L'affinité pour le complexe ATP-Mg²⁺ est assez élevée (K_m : 0,7 mM). Pour les acides, l'affinité est moindre. La plus élevée est pour l'acétate (K_m : 8,3 mM); elle est beaucoup plus faible pour les autres acides, en particulier pour l'isobutyrate et le butyrate. Pour ces acides, l'affinité est 10 et 12 fois moindre que pour l'acétate.

L'activité de l'enzyme est plus élevée avec l'acétate pour les faibles concentrations de substrat par rapport au K_m alors qu'elle semble plus élevée avec l'isobutyrate pour les fortes concentrations en substrats.

IV. 1. 2. 2. 3. Effet de certains ions divalents sur l'enzyme

Etant donné le rôle important que jouent certains ions divalents sur l'activité des enzymes en général et des kinases en particulier, nous avons cherché leurs effets sur l'acétate kinase.

L'ion Ca²⁺ provoque une perte d'activité enzymatique d'environ 33 %. Cette légère inhibition reste stable quelle que soit la concentration du Ca²⁺ ajoutée.

Le Mn²⁺ exerce une inhibition plus importante de l'enzyme que Ca²⁺. L'inhibition peut atteindre 72 % pour une concentration de 13 mM.

Cette inhibition augmente avec le Zn²⁺ et surtout le Co²⁺. L'activité peut être totalement inhibée à concentration de 13 mM de Co²⁺.

Les essais ont été effectués (sauf contre indication) avec des concentrations d'ATP-Mg²⁺: 7 mM et d'acétate: 40 mM. Les résultats sont rapportés dans le tableau 4.

L'effet des ions divalents Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ ou Co²⁺ sur l'activité enzymatique de l'acétate kinase a été étudié en absence de l'ion divalent Mg²⁺. Dans ce cas, aucune activité enzymatique n'est décelable (activité nulle) en présence de ces 4 ions divalents utilisés séparément. Ces ions métalliques ne sont pas capables de remplacer l'ion Mg²⁺. L'ion divalent Mg²⁺ est indispensable à l'activité enzymatique de l'acétate kinase.

Substrats	Activité à fortes concentrations de substrat $V_{\max}$ ($\mu\text{moles/min}$)	K_m (mM)	Activité à faibles concentrations de substrat $V_{\max} / K_m$
Acétate	13,3	8,3	1,6
Propionate	14,3	40,0	0,35
Butyrate	20,0	100,0	0,20
Isobutyrate	50,0	80,0	0,62
Méthylmalonate	25,0	50,0	0,50
ATP-Mg ²⁺	11,1	0,7	15,7

Tableau 3 : Paramètres cinétiques de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; pour la mesure des $V_{\max}$ et K_m des acides, la concentration en ATP-Mg²⁺ a été fixée à 7 mM; pour la mesure de $V_{\max}$ et K_m de l'ATP-Mg²⁺, l'acétate à 40 mM a été utilisé comme substrat.

Concentration protéique: 45 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

concentration des cations divalents (mM)	Activité acétate kinase (%)			
	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺
0	100	100	100	100
0,76	67	42	95	52
3,8	67	38	52	23
13	67	28	5	0

Tableau 4 : Effet de certains cations divalents sur l'activité acétate kinase en présence du complexe ATP-Mg²⁺.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en acétate: 40mM; concentration en ATP-Mg²⁺: 7 mM.

Concentration protéique: 45 µg.ml⁻¹.

Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle avec l'acétate en présence de l'ATP-Mg²⁺, prise comme référence sans ajout d'autres cations divalents (100 % d'activité).

L'effet de la concentration relative entre Mg^{2+} et ATP sur l'activité de l'acétate kinase a été mesuré en faisant varier la concentration de Mg^{2+} , celle de l'ATP étant fixée à 7 mM (fig 31)

L'activité est maximale lorsque le rapport molaire $Mg^{2+}/_{ATP}$ est 1. L'ion Mg^{2+} est donc nécessaire à l'activité de l'acétate kinase, en complexe équimoléculaire avec l'ATP.

IV. 1. 2. 2. 4. Effet de la température

L'activité acétate kinase a été mesurée à différentes températures, entre +4 °C et +80 °C à une concentration de 40 mM d'acétate et de 7 mM en complexe ATP- Mg^{2+} . L'activité maximale est obtenue aux environ de 60 °C (fig 32).

IV. 1. 2. 2. 5. Activateurs et inhibiteurs divers

Nous avons mesuré l'activité de l'acétate kinase en présence de différents composés pouvant avoir une influence sur celle-ci. Le tableau 5 résume les résultats de l'effet de ces réactifs.

Les ions phosphate et pyrophosphate augmentent significativement l'activité enzymatique lorsque leurs concentrations se situent entre 0,5 et 1 mM. L'utilisation de tampons composés de ces ions est donc possible.

Les thiols comme le DTT et la cystéine ont un effet activateur. Cette activation pourrait être due aux fonctions relatives de ces composés, mais il n'est pas exclu que ces thiols puissent améliorer l'activité par d'autres types d'actions comme la chélation de métaux inhibiteurs de l'enzyme.

Si le DTT et la cystéine exerçaient une action réductrice sur la protéine il semblerait que la présence et l'intégrité de ponts disulfures ne soient pas nécessaires à l'activité. De toute manière, il semble intéressant de conserver l'enzyme et de mesurer son activité, en présence de DTT.

Nous avons aussi mesuré l'effet de certains réactifs des thiols, à savoir le N-éthyl-maléimide (NEM), l'iodacétamide et le para-chloro-mercuri-benzoate (pCMB).

Le NEM est un réactif assez spécifique des groupes -SH à faible concentration. A des concentrations finales dans l'essai allant de 0 à 1 mM, il exerce un effet inhibiteur notable, et cette inhibition dépasse les 35 % à la concentration de 1 mM.

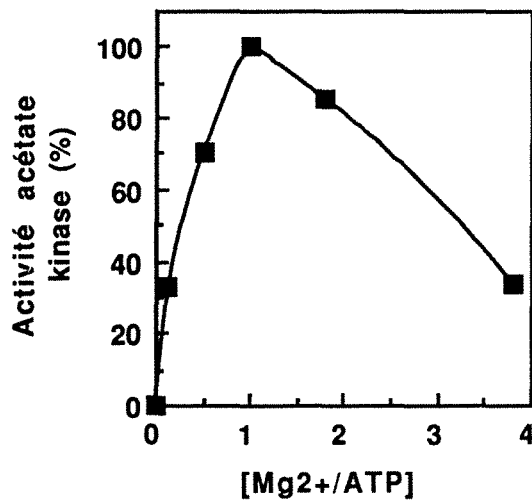


Figure 31 : Effet de la concentration du complexe ATP-Mg²⁺ sur l'activité acétate kinase.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en acétate: 40mM, concentration en Mg²⁺: variable, concentration en l'ATP: 7 mM.

Concentration protéique: 45 µg.ml⁻¹.

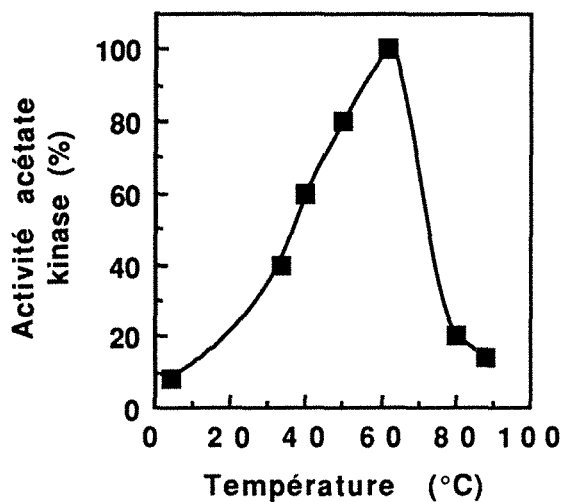


Figure 32 : Effet de la température sur l'activité de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en acétate: 40mM, concentration en ATP-Mg²⁺: 7mM.

Concentration protéique: 45 µg.ml⁻¹.

Concentrations des réactifs (mM)	Activité acétate kinase (%)						
	Phosphate de Na	Pyro- phosphate de Na	DTT	Cystéine	NEM	Ioda- cétamide	pCMB
0,00	100	100	100	100	100	100	100
0,15	-	-	123	-	76	62	67
0,50	153	119	-	-	71	42	0
1,00	138	172	143	138	62	38	0
10,00	128	133	-	153	-	-	-
16,00	-	-	-	162	-	-	-

Tableau 5 : Effet de certains réactifs sur l'activité de l'acétate kinase.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en acétate: 40mM; concentration en ATP-Mg²⁺: 7 mM.

Concentration protéique: 45 µg.ml⁻¹.

Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle avec l'acétate en présence de l'ATP-Mg²⁺, prise comme référence sans ajout des réactifs (100 % d'activité).

DTT= Dithiothréitol, pCMB= Para-chloro-mercuri-benzoate, NEM= N-éthyl-maléimide.

L'iodacétamide, qui est moyennement spécifique des groupes -SH, exerce aussi un effet inhibiteur sur l'enzyme et cette inhibition dépasse les 60 % à la concentration de 1 mM.

Le pCMB et les autres dérivés mercuri-benzoates sont des réactifs puissants des thiols. Cependant, leur action n'est pas toujours très spécifique de ces groupements. Dans notre cas, l'enzyme subit une forte inhibition par le pCMB. A des concentrations supérieures à 0,15 mM, l'activité enzymatique de l'acétate kinase est totalement annulée.

Puisque le NEM (réactif très spécifique) et l'iodacétamide (moyennement spécifique) sont des inhibiteurs de l'enzyme et que l'effet du pCMB va dans le même sens, nous pouvons conclure qu'il doit y avoir un ou plusieurs groupes -SH nécessaire à l'activité, au centre actif de l'enzyme.

IV. 1. 2. 2. 6. Estimation de la masse moléculaire

Nous avons utilisé la sérum albumine bovine (5 mg; $M_r = 68000$) comme repère. Le bleu de dextran (0,6 mg; $M_r = 2\ 000\ 000$) nous donne la valeur du volume mort, V_o , (20 ml), et le bichromate de potassium (0,5 mg; $M_r = 297$) nous donne la valeur du volume total de la colonne, V_T , (160 ml). Le volume d'élution de l'activité acétate kinase est inférieur à celui de l'albumine, donc la masse moléculaire de l'enzyme serait de l'ordre de 90 000 d.

IV. 1. 2. 2. 7. Identification du mécanisme de la réaction de l'acétate kinase

Puisque l'acétate kinase possède deux substrats principaux, l'acétate et le complexe $ATP-Mg^{2+}$, nous avons essayé d'identifier le mécanisme de la réaction et ceci par l'intermédiaire des transformées graphiques selon Lineweaver et Burk, après avoir mesuré la vitesse initiale de réaction pour des concentrations variables de chacun des deux substrats.

En représentant $1/v_i$ en fonction de $1/[acétate]$ (figure 33) (ou $1/v_i$ en fonction de $1/[ATP-Mg^{2+}]$), nous avons obtenu un faisceau de droites auxquelles on peut appliquer l'équation générale suivante pour deux substrats A et B :

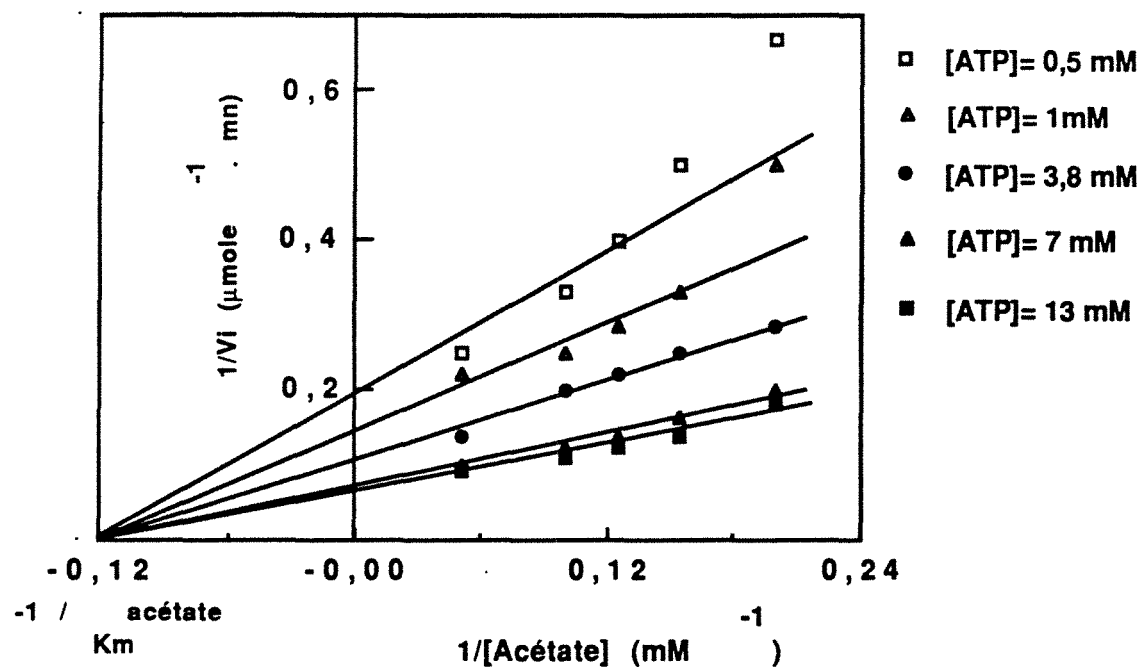


Figure 33 : Mécanisme réactionnel de l'acétate kinase
 Système séquentiel au hasard à fixation indépendante.
 Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard.

$$1/v_i = \left(K_m^A/V_{\max} (1 + K_m^B/B) \right) 1/A + 1/V_{\max} (1 + K_m^B/B)$$

Ces faisceaux possèdent les caractéristiques suivantes:

- _ les droites sont sécantes (non parallèles), ce qui caractérise un système séquentiel. Le système est dit séquentiel lorsque les deux substrats se fixent sur l'enzyme avant la libération des produits; la formation du complexe ternaire est indispensable pour que la réaction ait lieu.
- _ les faisceaux de droites se coupent dans les deux cas à gauche de l'axe des ordonnées, ce qui caractérise un système séquentiel au hasard. Le système est dit au hasard lorsque l'enzyme possède un site de fixation pour chaque substrat et que l'un ou l'autre peut se fixer en premier lieu sur l'enzyme.
- _ les faisceaux de droites se coupent sur l'axe des abscisses, ce qui caractérise une fixation indépendante. La fixation est indépendante lorsque chaque substrat a une affinité identique pour l'enzyme libre et pour l'enzyme ayant déjà fixé l'autre substrat.

Donc, nous pouvons déduire que l'acétate kinase constitue un système séquentiel au hasard à fixation indépendante.

Cleland (1970) a proposé une représentation schématique linéaire des réactions enzymatiques comportant plus d'un substrat. Dans notre cas, ce genre de représentation est donné par la figure 34.

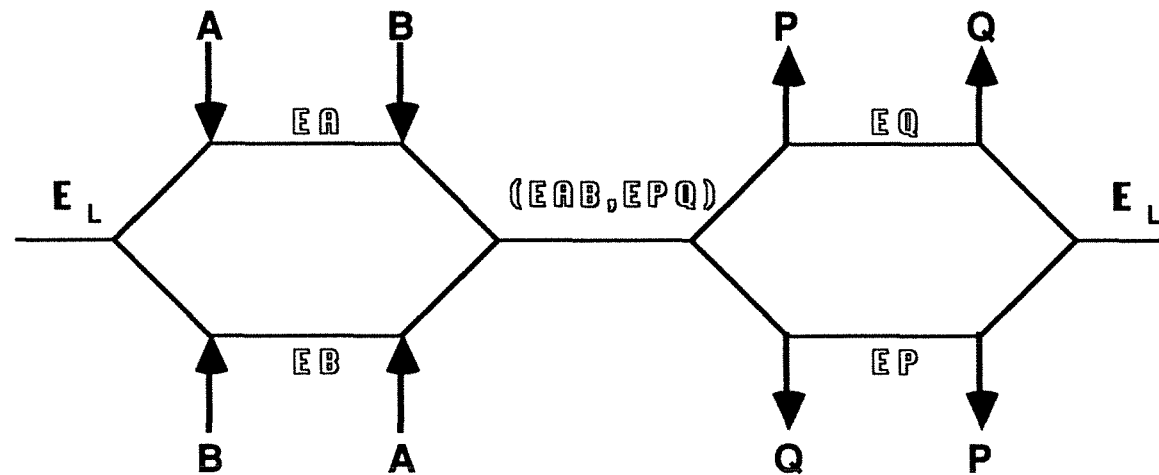


Figure 34 : Représentation schématique linéaire de la réaction de l'acétate kinase.

A = Acétate

B = ATP-Mg²⁺

E_L = Acétate kinase libre

EAB = Complexe ternaire

P = Acétyl-phosphate

Q = ADP-Mg²⁺

EA = Complexe binaire

· En résumé :

Nous avons caractérisé partiellement l'activité de l'acétate kinase obtenue en phase exponentielle de croissance. Nous avons obtenu un extrait brut contenant une activité spécifique de 0,24 μ moles d'acétyl-phosphate formé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine. L'enzyme a été purifiée 180 fois. Sa masse moléculaire a été estimée par filtration sur gel de type Ultrogel ACA 44 (Mr 90 000). L'enzyme est active vis-à-vis des acides gras saturés ayant 2 à 5 atomes de carbones; l'acétate est son meilleur substrat. Les K_m apparents de l'acétate et du complexe ATP-Mg²⁺ sont respectivement 8,3 mM et 0,7 mM. Par rapport à l'activité manifestée vis-à-vis de l'acétate (100 %), l'enzyme phosphoryle le propionate et l'isobutyrate avec une activité de 50 à 60 %, et le butyrate avec une activité de 17 %. Elle exige l'ion divalent Mg²⁺ pour son activité. Le maximum d'activité est obtenue à 62 °C et nécessite la présence des agents réducteurs. L'activité de l'enzyme est inhibée lorsque elle est traitée par des réactifs des thiols tels que l'iodacétamide, le N-éthylmaléimide et le para-chloro-mercuri-benzoate. Le mécanisme est trouvé correspondre au mécanisme séquentiel au hasard à fixation indépendante.

IV. 1. 3. Acyl-kinase en phase stationnaire de croissance

Nous avons observé l'existence de deux *maxima* d'activité acétate kinase au cours de la croissance. Nous avons montré précédemment (IV. 1.) que la présence des acides gras à courtes chaînes synthétisés par la bactérie ou ajoutés dans le milieu de culture, stimulait fortement la biosynthèse de spiramycine par *S. ambofaciens* en phase stationnaire. Ces acides gras pourraient donc agir comme inducteurs de la biosynthèse de l'acétate kinase au cours de cette phase. Cette hypothèse a été vérifiée, au laboratoire, par utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse protéique, le chloramphénicol. Dans ces conditions, la disparition du deuxième pic d'activité des kinases a été constatée (Khaoua, 1990).

Ces résultats montrent que, pendant la phase stationnaire de croissance de *S. ambofaciens* sur le milieu de culture synthétique, il y a biosynthèse *de novo* des kinases et que cette biosynthèse peut être induite par les acides gras à courtes chaînes.

Il pourrait donc exister une corrélation entre la stimulation de la biosynthèse des enzymes d'activation des acides gras et celle de la biosynthèse de spiramycine.

Afin d'obtenir des informations plus précises sur l'activité acétate kinase en phase stationnaire et de la comparer avec celle de la phase exponentielle de croissance, nous avons cherché à la purifier et la caractériser très partiellement.

IV. 1. 3. 1. Purification partielle de l'acétate kinase en phase stationnaire

Nous avons adopté le même protocole de purification que précédemment (IV. 2. 1.) en respectant les mêmes conditions de travail, en partant de cellules récoltées après cinq jours de croissance.

Les différentes étapes de purification, ainsi que leurs résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

A partir de l'extrait brut jusqu'après l'étape de chromatographie échangeuse d'ions, l'extrait enzymatique a été enrichi 96 fois avec un rendement de 55 %.

ETAPES	Protéines mg (PT)	A.S $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	A.T $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1}$	Purification	Rendement % en A.T
Extrait brut	443,90	0,35	156,20	1,00	100
Ultracentrifugation	375,10	0,41	154,80	1,17	99
Traitement au sulfate de Streptomycine 1%	331,60	0,46	152,80	1,30	98
Sulfate d'ammonium 46-72 % = F2	81,84	1,68	137,76	4,78	88
Ultrafiltration sur Membrane à seuil de coupure 10 000d.	47,46	2,26	107,52	6,43	69
Filtration sur gel Séphacryl S-200	22,32	4,27	95,31	12,13	61
Chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel	2,53	33,69	85,23	96,00	55

Tableau 6 : Etapes de purification partielle de l'acétate kinase synthétisée par *S. ambofaciens* en phase stationnaire de croissance.

Par comparaison avec la purification partielle de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance, nous avons constaté que le comportement des enzymes est le même en filtration sur gel et en chromatographie d'échange d'ions.

Donc, les caractères moléculaires de taille et de charge seraient sensiblement les mêmes.

IV. 1. 3. 2. Caractérisation partielle en phase stationnaire

Dans cette partie, nous nous sommes surtout intéressés à déterminer les paramètres cinétiques vis-à-vis de certains substrats tels que l'acétate et le complexe ATP-Mg²⁺.

Le tableau 7 donne les paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis de l'acétate et du complexe ATP-Mg²⁺.

L'affinité de l'enzyme vis-à-vis de ces substrats est assez nettement différente, selon l'origine de l'extrait, synthétisé en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Vis-à-vis de l'acétate, l'affinité de l'enzyme produite en phase stationnaire est 2,4 fois plus faible que celle de l'enzyme produite en phase exponentielle (K_m de 20 et 8,3 mM respectivement). En ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'ATP-Mg²⁺, l'affinité de l'enzyme produite en phase stationnaire est beaucoup plus faible que lors de la phase exponentielle (K_m de 2,94 et 0,7 mM respectivement).

Ces différences d'affinité entre les enzymes obtenues dans les deux phases, bien que significatives, ne semblent toutefois pas très importantes.



Substrats	$V_{\max}$ ($\mu\text{moles. min}^{-1}$)	K_m (mM)	$V_{\max} / K_m$
Acétate	5,0	20,0	0,25
ATP-Mg ²⁺	8,6	2,94	0,29

Tableau 7 : Paramètres cinétiques de l'acétate kinase en phase stationnaire de croissance.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en substrat: variable, concentration en ATP-Mg²⁺: 7 mM. Dans le cas de l'ATP-Mg²⁺, l'acétate à 40 mM a été pris comme substrat.

IV. 1. 4. Discussion et conclusions

Notre travail sur l'acétate kinase a d'abord consisté à mesurer l'activité spécifique de l'enzyme et à suivre l'évolution de cette activité sur deux milieux contenant des sources d'azote différentes, l'une sous forme de chlorure d'ammonium à 50 mM, l'autre sous forme de valine à 50 mM.

Dans l'un et l'autre milieu, l'évolution de l'activité spécifique de l'acétate kinase est semblable: élevée en phase exponentielle, elle chute lors du ralentissement de croissance. Les pics observés lors de la phase stationnaire traduisent des activités comparables dans les deux milieux, alors que la production de spiramycine lors de cette phase est trois fois plus élevée sur milieu valine que sur milieu ammonium.

Il a déjà été montré que la synthèse de l'acétate kinase durant la phase exponentielle de croissance est insensible à la concentration d'ammonium. La synthèse d'acétate kinase en phase stationnaire est réduite en excès d'ammonium (Khaoua et coll., 1992). La synthèse d'acétate kinase en phase stationnaire est fortement accrue en présence d'acétate. L'induction de la synthèse de cette enzyme par l'acétate et autres acides gras à courtes chaînes dépend du moment de leur ajout, de leurs concentrations et des combinaisons dans lesquelles ils sont ajoutés. Les évolutions des activités spécifiques de l'acétate kinase que nous avons observé durant les phases de croissance sur ces deux milieux (ammonium et valine) peuvent être discutées en regard de ces constatations.

En phase exponentielle, la synthèse de l'enzyme est peu régulée. Quel que soit le milieu, la synthèse de l'acétate kinase est nécessaire pour la biosynthèse des lipides constituants cellulaires.

En phase de ralentissement et lors de la phase stationnaire de croissance, la teneur en acides gras excrétés (dont principalement l'acétate) est beaucoup plus élevée sur milieu valine que sur milieu ammonium. Lors de ces phases, la concentration d'ammonium est plus élevée sur milieu valine que sur milieu ammonium dans lequel le composé est le facteur limitant de la croissance. L'induction de la synthèse de l'acétate kinase pendant cette phase par les acides gras sur milieu valine pourrait être compensée par une répression par l'ammonium. Cette hypothèse permettrait d'expliquer que l'activité spécifique de l'enzyme sur milieu valine reste du même ordre que sur milieu ammonium. Elle mériterait d'être confirmée par d'autres expérimentations. La meilleure production de spiramycine sur milieu valine que sur milieu ammonium ne serait donc pas corrélée

à l'activité spécifique de l'acétate kinase, mais probablement à la teneur d'acides précurseurs (acétate, isobutyrate particulièrement).

Chez *S. erythreus* producteur d'érythromycine, Raczynska-Bojanowska et coll. (1973) ont montré la présence de deux kinases à spécificités différentes: la première kinase apparaît pendant la phase exponentielle de croissance; elle est spécifique de l'acétate. La deuxième apparaît parallèlement à la production d'érythromycine et elle est spécifique du propionate. Ces auteurs suggèrent l'intervention de la propionate kinase dans l'activation du propionate précurseur d'érythromycine.

Dans le cas de l'acétate kinase de *S. ambofaciens*, la régulation différente de la synthèse de l'enzyme selon les phases de croissance autorise l'hypothèse, soit de l'existence de deux enzymes différentes, soit de l'existence d'une même enzyme modifiée selon l'état physiologiques des cellules, cette activité "acétate kinase" assurant des fonctions différentes suivant l'âge de la culture.

Afin d'apporter des premiers éléments de réponse à cette question, nous nous sommes proposés de purifier, au moins partiellement, l'acétate kinase pendant les deux phases de croissance.

Les étapes successives de purification, citées auparavant (IV. 1. 2. 1.), constituent donc notre protocole final de la purification partielle de l'acétate kinase chez *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance. Le choix de ce protocole a été basé sur sa simplicité, sa reproductibilité et surtout sa compatibilité avec notre enzyme. L'acétate kinase, obtenue en phase exponentielle de croissance, a été purifiée 180 fois avec un rendement 41 %.

Cette purification peut être comparée à celles décrites dans la littérature. Chez *Desulfovibrio vulgaris*, l'acétate kinase a été purifiée 15 fois avec un rendement 67 %, ceci en vue de l'immobilisation de l'enzyme (Mannens et coll., 1988). Chez *Clostridium acetobutylicum*, la butyrate kinase a été purifiée 77 fois avec un rendement 31 %. Pour l'acétate kinase de *Methanosarcina thermophila*, le degré de purification et le rendement sont respectivement de 102 fois et 16 %. Dans les deux derniers cas, la purification avait pour but d'étudier et de caractériser les deux enzymes. Une des meilleures purifications a été réalisée par Nakajima et coll. (1978) qui ont purifié l'acétate kinase 4270 fois avec un rendement 30,2 % chez *Bacillus stearothermophilus*.

La masse moléculaire de l'enzyme de *S. ambofaciens* a été estimée par gel filtration à 90 000. Les masses moléculaires de l'acétate kinase de *Bacillus stearothermophilus* (Nakajima et coll.,

1978) et de *Methanosarcina thermophila* (Aceti et Ferry, 1988) sont respectivement 160 000 et 94 000.

Nous avons comparé les valeurs de K_m apparent, vis-à-vis de l'acétate, des acétates kinases d'origines différentes:

- _ *Bacillus stearothermophilus* 120 mM (Nakajima et coll., 1978),
- _ *Streptococcus diacetylactis* 140 mM (Collins et Bruhn, 1970),
- _ *Veillonella alcalescens* 100 mM (Bowman et coll., 1976),
- _ *Mycobacterium phlei* 57 mM (Mannens et coll., 1988),
- _ *Azotobacter chroococcum* 2 mM (Mannens et coll., 1988).

La majorité de ces valeurs de K_m est élevée, ce qui signifie que l'affinité de la plupart des acétates kinases pour l'acétate est très faible.

Dans le cas de l'acétate kinase de *S. ambofaciens*, le K_m apparent pour l'acétate est 8,3 mM. Cette valeur semble être suffisamment faible pour aboutir à l'acétyl-phosphate et favoriser ainsi la production d'acétyl-CoA.

En ce qui concerne sa spécificité de substrats, l'acétate kinase de *S. ambofaciens* phosphoryle l'acétate de manière très efficace. Elle phosphoryle également le propionate, le butyrate et des acides carboxyliques à chaînes ramifiées, tels que l'isobutyrate et le céto-isovalérate. Les affinités pour ces acides sont de 5 à 10 fois moindre que pour l'acétate.

Chez *S. ambofaciens*, l'acétate kinase ne présente aucune activité enzymatique lorsque l'ion Mg^{2+} est éliminé du mélange réactionnel. Cette activité est toujours absente même si les cations divalents Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , et le Zn^{2+} remplacent le Mg^{2+} . L'enzyme exige la présence de l'ion divalent Mg^{2+} pour son activité.

Une étude plus poussée sur l'influence des différents cations a été réalisée par Aceti et Ferry (1988) chez *Methanosarcina thermophila*. L'acétate kinase de cette espèce est activée en présence de Mg^{2+} , mais la substitution du Mg^{2+} par Mn^{2+} , Co^{2+} ou Ca^{2+} produit une augmentation de 30 % de l'activité. Par contre, avec le Cu^{2+} , Ni^{2+} ou le Zn^{2+} aucune activité significative n'est observée. Chez *Bacillus stearothermophilus* et *E. coli* (Nakajima et coll., 1978), chacun de ces cations divalents permet l'activité de l'acétate kinase.

La présence d'agents réducteurs, tels que le DTT et la cystéine, est nécessaire pour conserver une activité optimale durant la purification et le stockage de l'enzyme. Ces thiols ont aussi un effet activateur sur l'acétate kinase de *S. ambofaciens*. Si cette activation est due à une action réductrice sur la protéine, cela implique que la présence et l'intégrité des ponts disulfures ne joue pas un rôle

essentiel dans les fonctions catalytiques de l'acétate kinase. Si cette activation est due à une protection des cystéines contre l'oxydation, cela implique la possibilité que la formation de nouveaux ponts disulfures, intra ou interchaînes, modifie la conformation de l'enzyme et provoque une chute de l'activité.

Le traitement avec des réactifs des thiols comme l'iodacétamide, le NEM et les composés mercuriques provoquent une inhibition, même à de faibles concentrations. Ces résultats suggèrent une implication des groupements sulfhydryls au niveau du site catalytique de l'enzyme et une accessibilité de ces groupes aux réactifs utilisés. Le puissant effet inhibiteur du pCMB sur l'activité enzymatique pourrait aussi être lié à son action sur des résidus histidines impliqués dans le centre actif. La présence des résidus histidines dans le centre actif de la dihydrofolate réductase et de la ribonucléase a été démontrée par des expériences similaires. La modification des résidus histidines inactive la pyruvate kinase (Dann et Brïhon, 1974) et l'adénylate kinase (Schirmer et coll., 1970).

Chez *S. ambofaciens*, la puissante inhibition de l'acétate kinase par les ions Zn^{2+} (95 % à la concentration 13 mM) est aussi un autre argument en faveur de la présence des résidus histidines au niveau du centre actif de l'enzyme, ces ions étant capables de se fixer sur le groupement imidazole. Ce fait est aussi observé dans le cas de phosphodiésterase de levure (Fujimoto et coll., 1974). Cette enzyme possède un ou deux atomes de zinc à l'intérieur de son site actif.

Tous ces résultats suggèrent que des résidus histidines pourraient participer à la réaction enzymatique de l'acétate kinase. La présence de 9 de ces résidus a été démontrée dans l'acétate kinase purifiée de *B. stearothermophilus* (Nakajima et coll., 1978).

La stabilité thermique de l'enzyme de *S. ambofaciens* a été examinée. Cette acétate kinase est assez stable entre 40 °C et 80 °C, mais à 4 °C et à 80 °C elle est rapidement inactivée. L'enzyme de *B. stearothermophilus* est plus stable que celle de *E. coli* (Nakajima et coll., 1978). Chez *E. coli*, l'enzyme est inactivée à 4 °C mais celle de *B. stearothermophilus* est assez stable même au-delà de 65 °C.

Le mécanisme de la réaction de l'acétate kinase a aussi été recherché. Il correspond à un mécanisme séquentiel au hasard à fixation indépendante.

Pendant la phase stationnaire, nous avons fait appel aux mêmes étapes de purification que celles utilisées au cours de la phase exponentielle de croissance.

L'acétate kinase de *S. ambofaciens* en phase stationnaire, a été purifiée 96 fois avec un rendement 55 %.

Au cours des étapes de purification, nous avons comparé le comportement de l'enzyme avec celui de l'enzyme obtenue en phase exponentielle. Deux points intéressants concernent la taille et la charge moléculaire. Le volume d'élution en filtration sur gel, identique pour les deux enzymes, montre que la taille des molécules synthétisées est sensiblement la même. Le comportement analogue en chromatographie d'échange d'ions suggère que la charge globale des molécules recueillies en phase exponentielle et stationnaire ne change pas.

L'affinité des deux enzymes vis-à-vis de certains substrats est significativement différente, mais la différence est relativement faible.

En se basant sur ces quelques arguments de comparaison, nous pourrions supposer qu'a priori les deux *maxima*, d'activité de l'acétate kinase de *S. ambofaciens* lors des deux phases de croissance, font partie d'un même équipement enzymatique. Sans doute, il pourrait aussi exister un changement de forme touchant la conformation de l'enzyme suivant l'âge, l'état physiologique et les besoins cellulaires de la bactérie. Mais à ce stade du travail, nous n'avons pas tous les éléments nécessaires afin de trancher d'une façon catégorique.

IV. 2. Formation du malonyl-CoA

Dans la réaction globale de synthèse des acides gras qui est catalysée par un ensemble de sept protéines localisées dans le cytosol, le complexe acide gras synthétase, l'acétyl-CoA dérivé de sources glucidiques ou d'aminoacides est le précurseur de tous les atomes de carbone d'acides gras. Cependant, des huit unités acétyl qui sont nécessaires pour réaliser la synthèse de l'acide palmitique, une seule est fournie par l'acétyl-CoA. Les sept autres proviennent du malonyl-CoA formé dans une réaction de carboxylation à partir de l'acétyl-CoA et de HCO_3^- , par l'action d'une acétyl-CoA carboxylase. Lorsque le malonyl-CoA a été formé, les étapes suivantes de la synthèse des acides gras vont se succéder dans une séquence de six étapes catalysées par les six enzymes du système acide gras synthétase. La septième protéine du système, qui est dépourvue d'activité enzymatique, est l'acétyl-carrier-protein (ACP), protéine de transport, sur laquelle la chaîne d'acides gras qui se forment est attachée par covalence.

La biosynthèse des polykétides débute par la condensation des unités acétyl-CoA, malonyl-CoA et méthylmalonyl-CoA. Cette biosynthèse est inhibée par la céruléine qui est aussi un inhibiteur de la biosynthèse des acides gras chez les levures et les bactéries. Cet antibiotique agit au niveau de la β -cétoacylthioester synthétase (Vance et coll., 1972). Ceci suggère une analogie entre la biosynthèse des acides gras et celle des polykétides. En effet, les deux voies sont initiées par la décarboxylation du groupement malonyl et son acylation par un résidu acyl. Les groupements acyl et malonyl sont transférés, respectivement par une acétyl-transférase et une malonyl-transférase, sur le groupement prosthétique de l'ACP (Kobuke et Yoshida, 1978). Chez *S. noursei* var *polyfungini*, l'augmentation de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase a été corrélée à la fois à l'augmentation de la formation de l'antibiotique tétraène et celle de la lipogenèse (Behal et coll., 1977).

Ce que nous venons d'évoquer montre le rôle important que joue le malonyl-CoA à la fois dans la biosynthèse des acides gras et dans la biosynthèse des polykétides. Cependant, la carboxylation de l'acétyl-CoA n'est pas la seule voie conduisant au malonyl-CoA.

Le malonyl-CoA peut aussi être synthétisé à partir de l'oxaloacétate, par action de l'oxaloacétate déshydrogénase. L'oxaloacétate peut provenir de la carboxylation de phosphoénolpyruvate (PEP) ou de pyruvate (PEP carboxylase ou pyruvate carboxylase). Ces systèmes n'ont pas été étudiés ici. Un

schéma d'ensemble résume les voies possibles conduisant au malonyl-CoA (schéma 1).

Notre objectif est, par mesure des activités spécifiques des enzymes clés du système dans différentes conditions de culture, d'apprécier la mise en oeuvre potentielle de ces voies, et de les associer à la production de spiramycine. Ceci nécessite préalablement la mise au point de dosage des activités de ces enzymes, en particulier de celles catalysant des réactions faisant intervenir des dérivés de HS-CoA.

IV. 2. 1. Mise au point de la méthode de dosage de certaines enzymes par HPLC

Les techniques habituellement utilisées pour le dosage des carboxylases font appel à des réactions enzymatiques couplées, à la spectrophotométrie et/ou aux traceurs isotopiques. Elles nécessitent des extraits enzymatiques suffisamment purifiés pour éviter des réactions parasites, et sont généralement assez lourdes à mettre en oeuvre. Les cinq dernières années ont vu le développement du dosage par HPLC pour les enzymes faisant intervenir des acyl-CoA (crotonase par Norwood et coll., 1990, carboxylases par De Spiegeleer et coll., 1986, Oizumi et Hayakawa, 1990). Ces auteurs montrent que la technique de dosage par HPLC des carboxylases est une méthode beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que celles nécessitant la spectrophotométrie ou la radioactivité: c'est une méthode sensible, spécifique, nécessitant une moindre purification. Tous ces auteurs ont travaillé avec des extraits enzymatiques issus des mammifères.

Suivant ces indications, nous avons entrepris la mise au point des mesures d'activité de certaines enzymes de *S. ambofaciens*, de carboxylases et déshydrogénases, par dosage en HPLC des composés acyl-CoA, à courtes et moyennes chaînes issus des réactions.

En général, ces composés sont séparés, sur des colonnes en phase inversée (C_{18}), avec un ordre d'élution basé sur leur caractère lipophile. La phase mobile est constituée d'un mélange variable de méthanol et de KH_2PO_4 50 mM à pH 5,3. En augmentant la concentration du méthanol, les composés les plus lipophiles seront élués plus rapidement. La détection des produits acyl-CoA est effectuée en utilisant un détecteur UV; elle est basée sur l'absorbance spécifique à 254 nm des composés contenant l'HS-CoA.

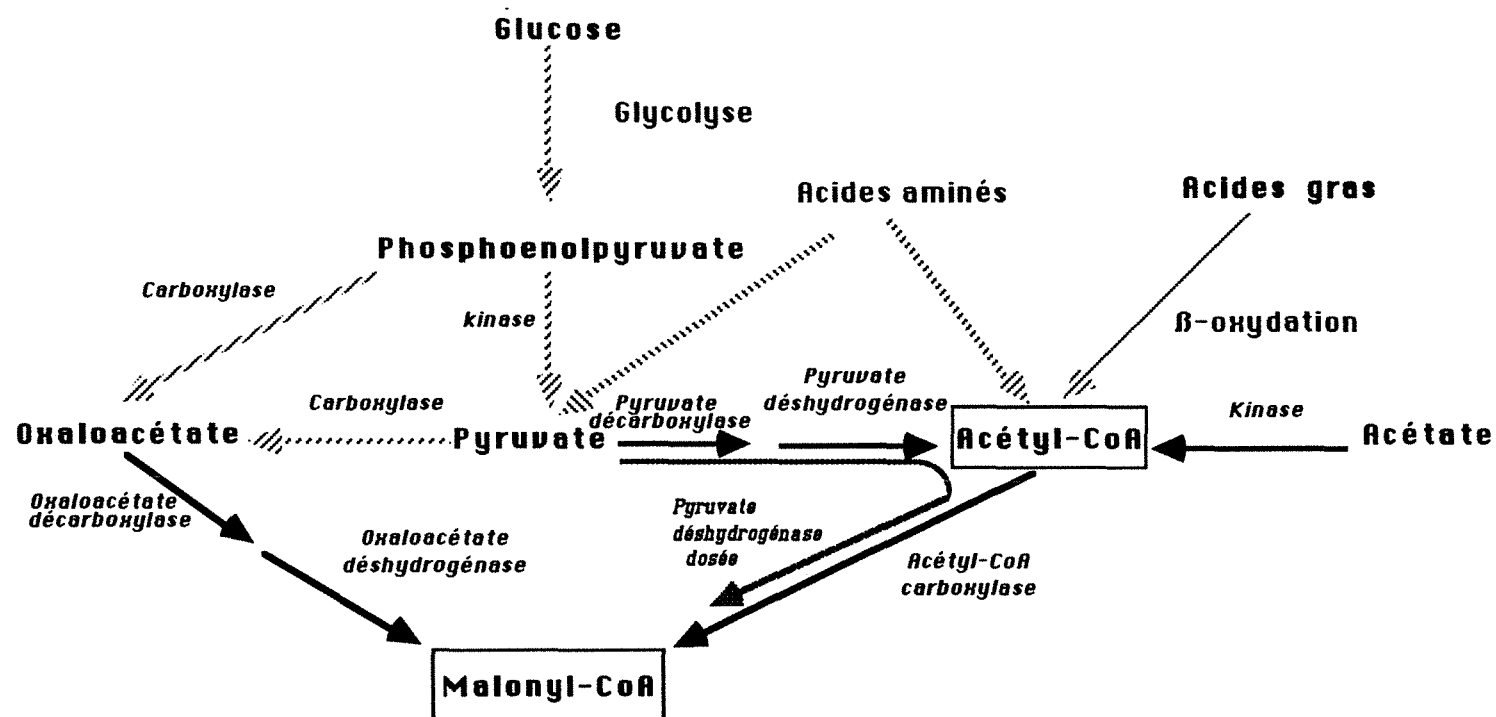


Schéma 1: Biosynthèse de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA

→ : Voies étudiées
 → : Pyruvate déshydrogénase dosée par HPLC

Toutes les enzymes que nous avons dosées par HPLC, participent à la formation de malonyl-CoA, sauf l'enzyme céto-isovalérate déshydrogénase (CIVDH). Bien que le dosage de l'activité de cette dernière enzyme ait été mis au point lors de ce travail, la CIVDH n'entre pas directement dans le cadre de nos préoccupations d'ordre physiologique. Cette enzyme est étudiée par ailleurs au laboratoire et il nous a donc semblé intéressant de l'adjoindre aux autres dans le cadre de cette mise au point de dosage.

Pour identifier le malonyl-CoA, nous avons injecté, dans les mêmes conditions d'élution que l'échantillon de réaction enzymatique, du malonyl-CoA témoin. Le produit est quantifié à partir d'une courbe d'étalonnage établie préalablement dans la gamme des concentrations utilisées; la surface du pic est proportionnelle à sa concentration injectée.

IV. 2. 1. 1. Dosage de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC)

Nous avons utilisé deux types de chromatographes qui, grâce à leurs performances respectives, nous ont permis d'obtenir une analyse fiable des produits de réaction.

Les mises au point nécessaires ont été effectuées en utilisant les dérivés-CoA substrat et produit, l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA.

Nous avons testé et comparé trois types de colonnes.

* NOVA-PAK C₁₈, 5μ (3,9 mm x 15 cm) WATERS. Cette colonne a été placée sur le chromatographe Millipore Waters qui ne permet que l'utilisation d'un gradient discontinu dans la phase mobile. L'éluant est un mélange de KH₂PO₄ 50 mM pH 5,3 et de méthanol pur, préalablement filtrés et dégazés.

Après les essais préliminaires, nous avons opté pour les conditions suivantes:

- injection d'un volume d'échantillon de 25 μl;
- élution débutant avec du méthanol à 30 % dans le tampon pendant 1 min, avec un débit de 0,9 ml/min; élution poursuivie avec 10 % de méthanol dans ce tampon pendant 11 min, avec le débit de 1,9 ml/min.
- rééquilibrage de la colonne avec 3 % de méthanol dans le tampon pendant 10 min, avec un débit de 0,9 ml/min.

* RMC NOVA-PAK C₁₈, 4μ (8 mm x 10 cm) WATERS. Avec cette colonne, nous avons procédé pratiquement de la même manière que précédemment; seules les conditions du gradient discontinu ont été changées:

- élution débutant avec du méthanol à 1 % dans le tampon pendant 10 min, avec un débit de 1 ml/min; élution poursuivie avec 10 % de méthanol dans le tampon pendant 5 min, avec un débit de 2 ml/min.
- rééquilibrage de la colonne avec 1 % de méthanol dans le tampon pendant 8 min, avec un débit de 2 ml/min; poursuivie avec 1 % de méthanol dans le tampon pendant 2 min, avec un débit de 1 ml/min.

* COLOSIL C₁₈, 5 μ (6 mm x 15 cm) COLO CHROM. La colonne est placée sur le chromatographe SPECTRA PHYSICS. Le volume de l'échantillon est de 50 μ l. Nous avons réalisé un gradient continu de 0 à 30 % de méthanol dans le tampon pendant 25 min, le débit étant de 1 ml/min.

Une précolonne Guard-Pak μ Bondapak C₁₈ est placée avant les deux premières colonnes. Les résultats obtenus avec les trois colonnes sont satisfaisants, non seulement au niveau de la séparation mais aussi au niveau de la résolution et de la reproductibilité des résultats.

Au cours de notre travail sur l'ACC, nous avons fait appel aux deux types de chromatographes et aux trois colonnes citées ci-dessus.

La figure 35 montre les chromatogrammes types d'un essai enzymatique de l'ACC, effectués en utilisant la colonne NOVA-PAK C₁₈. En respectant les conditions d'élution citées ci-dessus, nous avons pu obtenir sur le même chromatogramme à la fois le produit de la réaction, correspondant au malonyl-CoA (avec un temps de rétention de 6,8 min), et le substrat, correspondant à l'acétyl-CoA (Tr= 9,3 min).

La figure 36 représente la formation du malonyl-CoA en fonction du temps d'incubation de la réaction enzymatique. Cette formation est linéaire jusqu'à 15 min, au-delà nous ne sommes plus en vitesse initiale, avec cette quantité d'enzyme.

Les figures 37 et 38 montrent les profils d'élution, des composés du mélange réactionnel, issus respectivement des colonnes RMC NOVA-PAK C₁₈ et COLOSIL C₁₈.

L'utilisation des trois colonnes permet de confirmer l'identité des substrat et produit de la réaction. Les dosages sont possibles

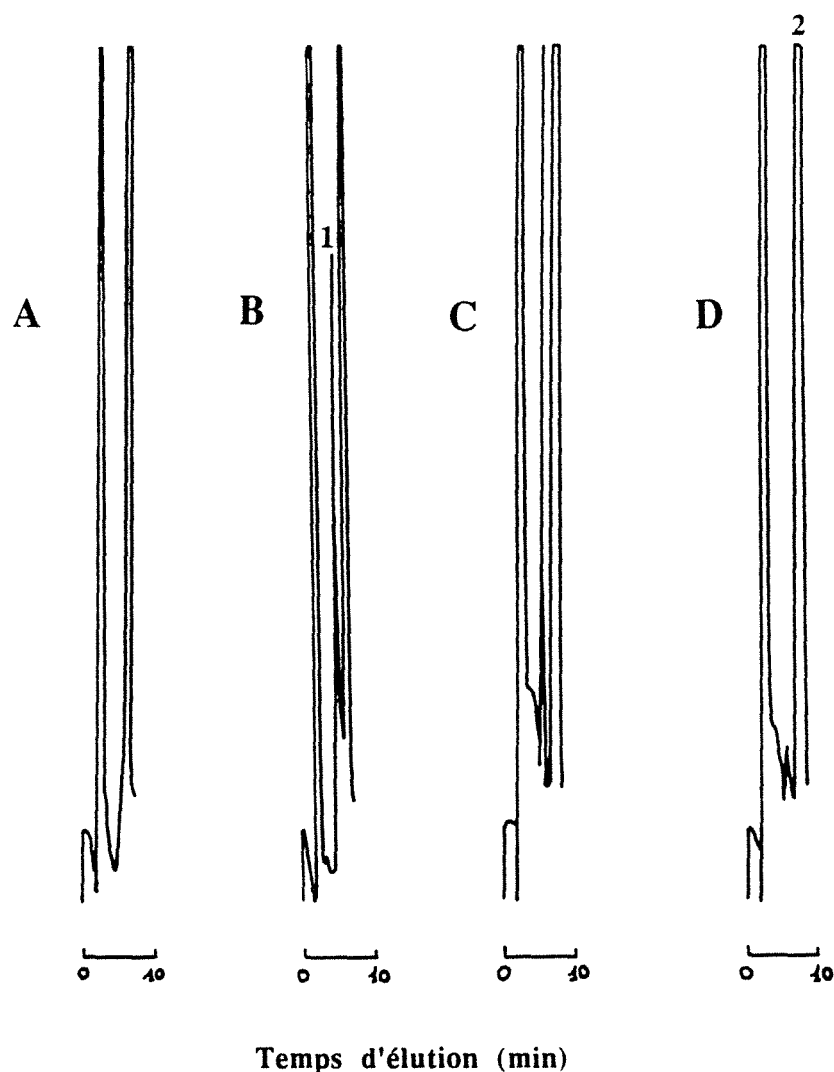


Figure 35 : Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC).
(Colonne NOVA-PAK C₁₈, 3,9 mm x 15 cm)

A = Témoin de la réaction de l'ACC.

B = Réaction de l'ACC.

C = Réaction de l'ACC avec doublement de la concentration de l'acétyl-CoA.

D = Réaction de l'ACC avec doublement de la concentration de l'acétyl-CoA et avec élimination de KHCO₃.

1 = Malonyl-CoA

2 = Acétyl-CoA

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

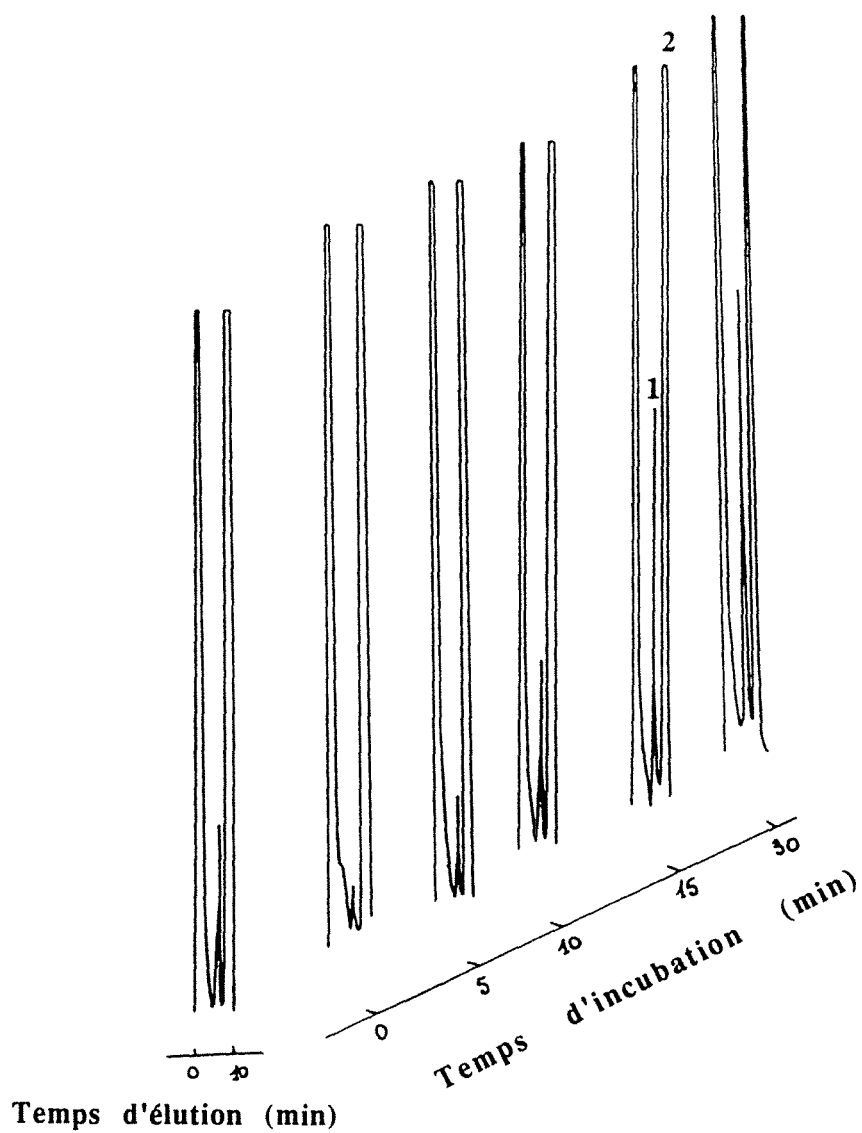


Figure 36 : Formation du malonyl-CoA en fonction du temps d'incubation de la réaction de l'acétyl-CoA carboxylase.

(Colonne NOVA-PAK C₁₈, 3,9 mm x 15 cm)

1 = MalonylCoA

2 = Acétyl-CoA

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

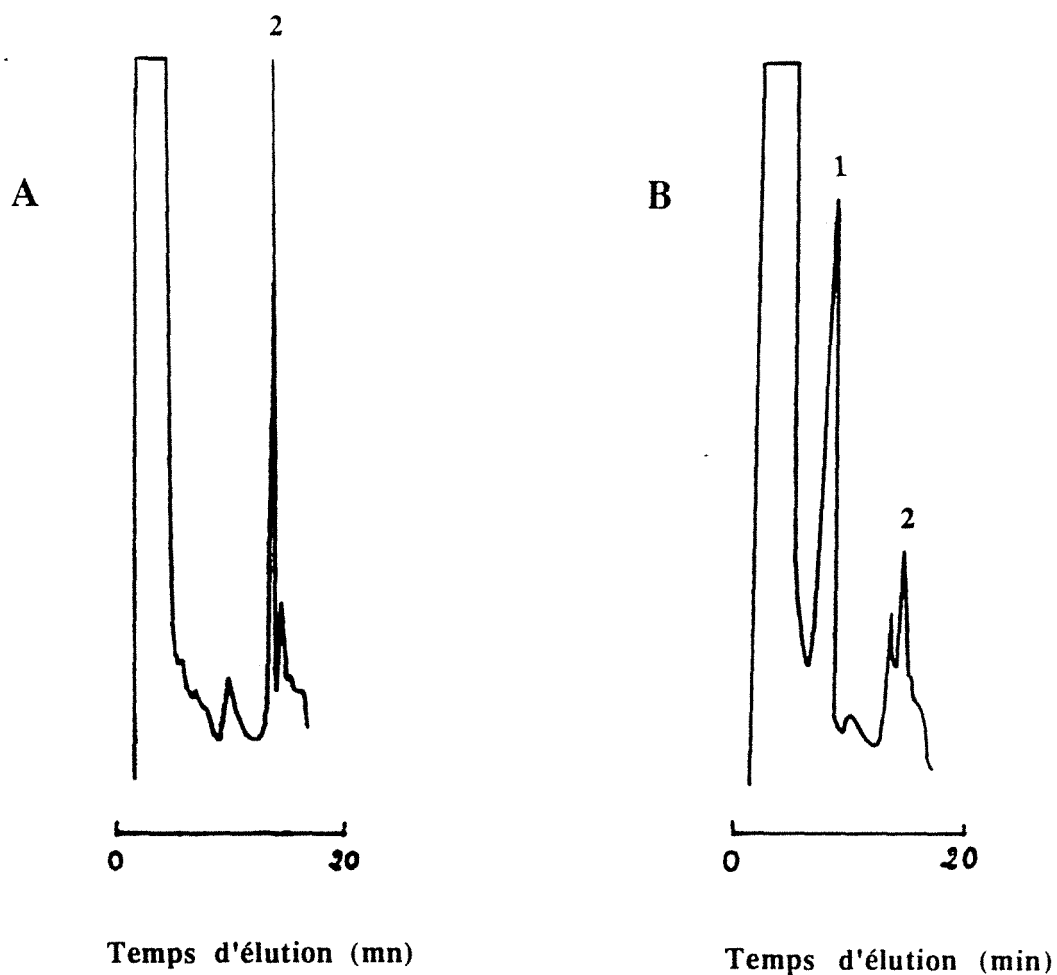


Figure 37 : Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase.
(Colonne RMC NOVA-PAK C₁₈, 8 mm x 10 cm)

A = Témoin de la réaction de l'ACC.

B = Réaction de l'ACC.

1 = Malonyl-CoA

2 = Acétyl-CoA

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

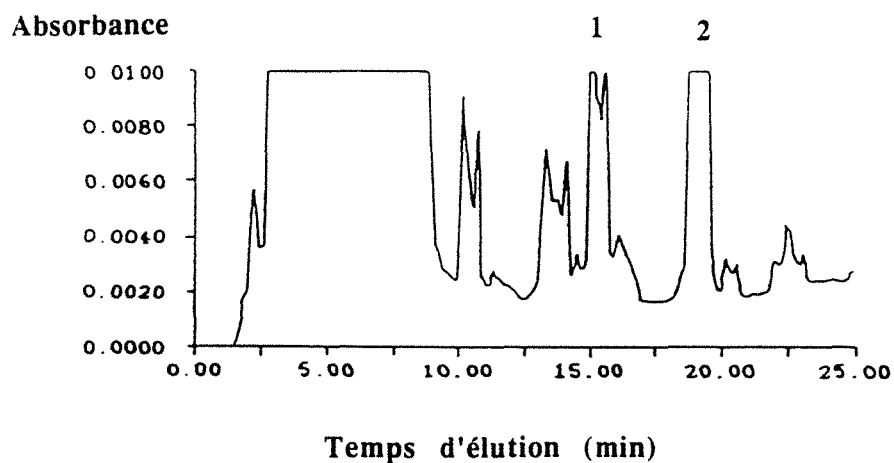
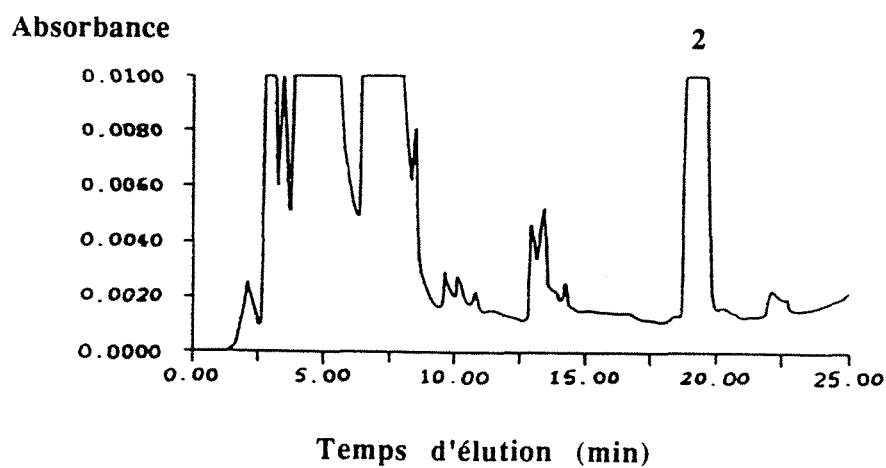
A**B**

Figure 38 : Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase.
(Colonne Colosil C₁₈, 6 mm x 15 cm)

A = Réaction de l'ACC.

B = Témoin de la réaction de l'ACC.

1 = Malonyl-CoA

2 = Acétyl-CoA

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

avec chacune des colonnes, qui permettent de suivre en même temps le substrat et le produit de la réaction.

Les résultats obtenus par ces différents chromatogrammes montrent que le temps de rétention de chaque composé de la réaction enzymatique de l'ACC dépend principalement du type de la colonne et des conditions d'élution. Le tableau 8 résume les temps de rétention du HS-CoA, de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA en présence des trois types de colonnes utilisées.

IV. 2.1. 2. Dosage de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH), de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la céto-isovalérate déshydrogénase (CIVDH)

Les réactions catalysées par ces enzymes sont données dans le chapitre matériel et méthodes.

Nous avons utilisé la colonne COLOSIL C₁₈ (6 mm x 15 cm) incorporée au système de SPECTRA FOCUS. La phase mobile est constituée d'un mélange de KH₂PO₄ 50 mM pH 5,3 et de méthanol. On applique à la colonne un gradient de méthanol de 0 à 30 % pendant 25 min, avec un débit de 1 ml/min.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait que sur ces chromatogrammes, nous pouvons suivre en même temps l'apparition du produit et la disparition du substrat de la réaction, comme dans le cas de l'ACC.

Les figures 39, 40 et 41 montrent respectivement les profils d'élution des substrats et produits des réactions catalysées par OADH, PDH et CIVDH.

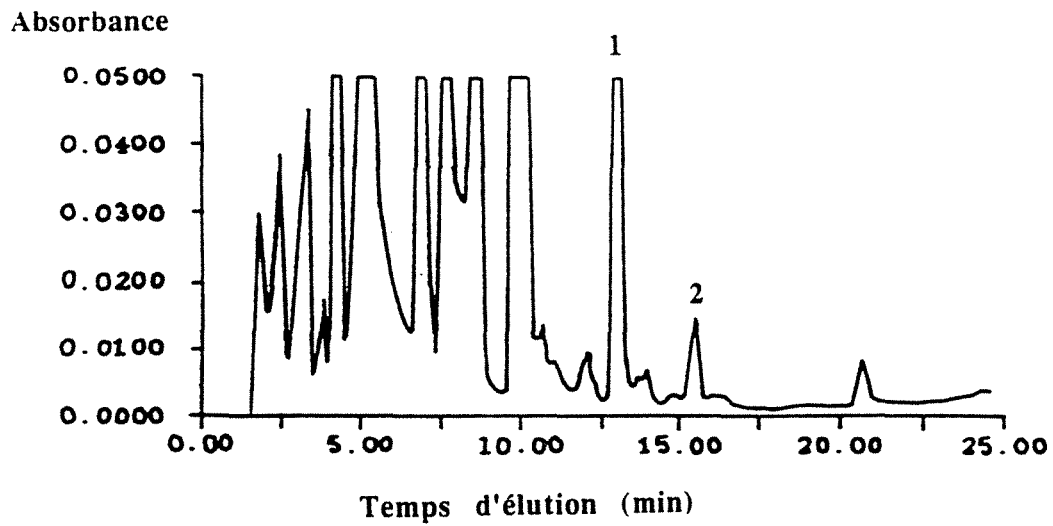
* OADH : Sur la figure 39B nous obtenons un pic ayant le même temps de rétention que le malonyl-CoA sur la figure 39A. L'analyse spectrale de ce pic a ultérieurement montré qu'il ne s'agit pas de malonyl-CoA. Dans le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme nous effectuons une soustraction de ce pic par rapport au produit de la réaction (malonyl-CoA).

* PDH : Même remarque que précédemment concernant le pic ayant le même temps de rétention que le malonyl-CoA. Une autre remarque préliminaire relative au dosage s'impose. Quand nous avons effectué les analyses chromatographiques du milieu réactionnel, nous avons constaté la formation importante de malonyl-CoA, l'acétyl-CoA apparaissant sous forme de quantité faible. Les figures 40A et 40B montrent respectivement la réaction enzymatique et son témoin. Nous pouvons supposer que l'acétyl-CoA formé par la PDH est aussitôt pris en charge par l'acétyl-CoA carboxylase pour donner le malonyl-CoA, la vitesse de formation de

TYPES DE COLONNES	Tr (mn) de HS-CoA	Tr (mn) de Malonyl-CoA	Tr (mn) de Acétyl-CoA
NOVA-PAK C ₁₈ , 5 μ (3,9 mm x 15 cm)	7,7	6,8	9,3
RMC NOVA-PAK C ₁₈ , 4 μ (8 mm x 10 cm)	16,7	9,9	18,2
COLOSIL C ₁₈ , 5 μ (6 mm x 15 cm)	15,2	13,2	19,5

Tableau 8 : Temps de rétention (Tr) de malonyl-CoA, HS-CoA et acétyl-CoA selon les types de colonnes et les conditions d'élution.
Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

A



B

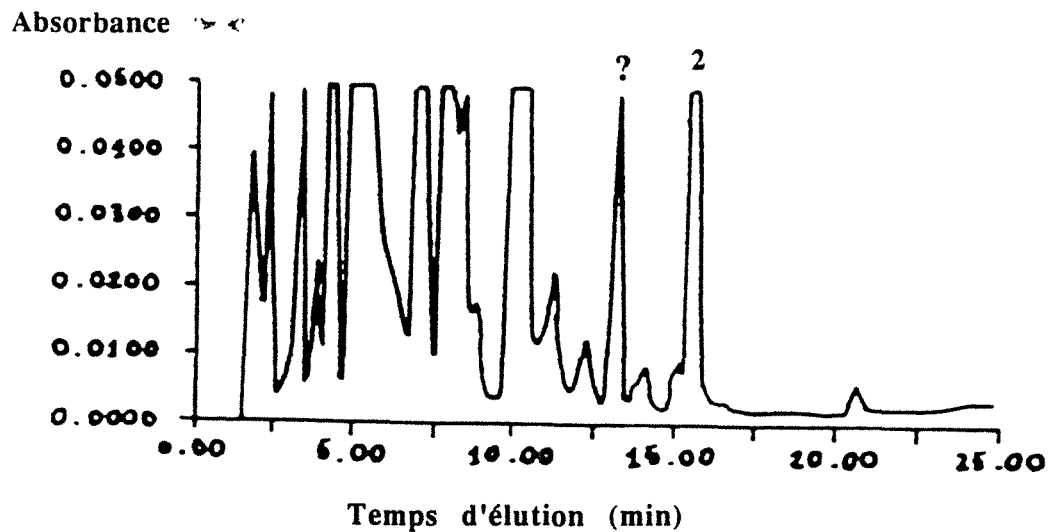


Figure 39 : Profils d'élution du milieu réactionnel de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH).
(Colonne Colosil C₁₈, 6 mm x 15 cm)

A = Réaction de l'OADH.

B = Témoin de la réaction de l'OADH.

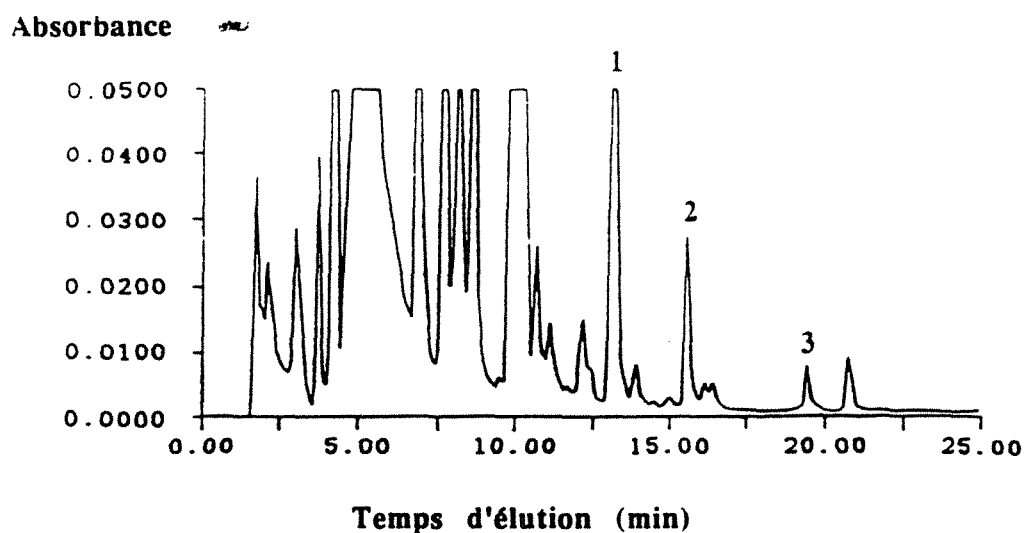
1 = Malonyl-CoA

2 = HS-CoA

? = Explication donnée au paragraphe IV. 2. 1. 2.

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

A



B

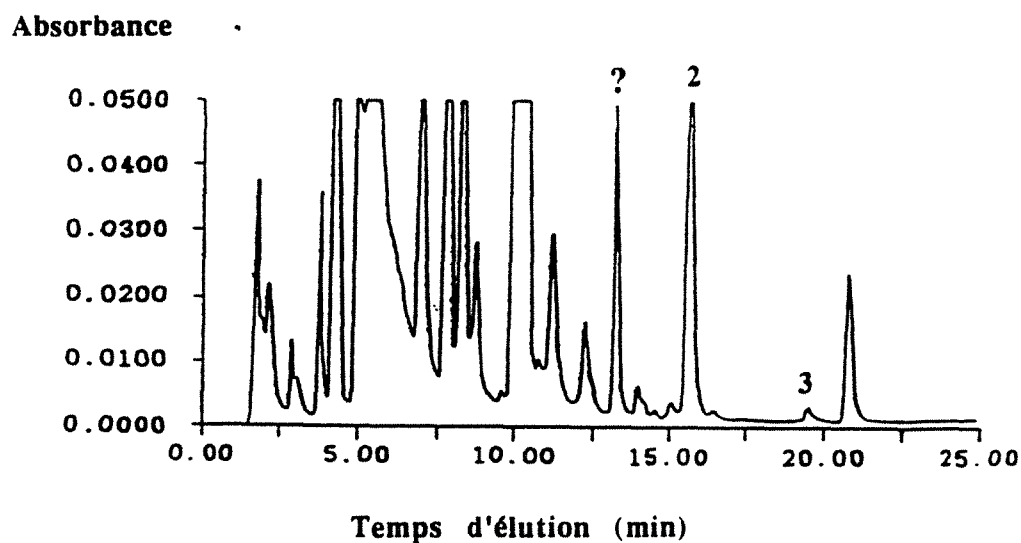


Figure 40 : Profils d'élution du milieu réactionnel de la pyruvate déshydrogénase (PDH).
(Colonne Colosil C₁₈, 6 mm x 15 cm)

A = Réaction de la PDH.

B = Témoin de la réaction de la PDH.

1 = Malonyl-CoA

2 = HS-CoA

3 = Acétyl-CoA

? = Explication donnée au paragraphe IV. 2. 1. 2.

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

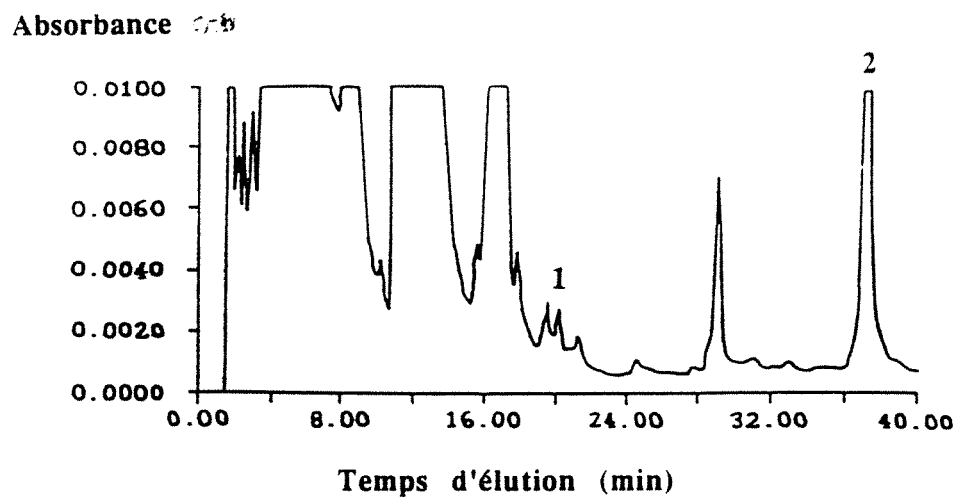
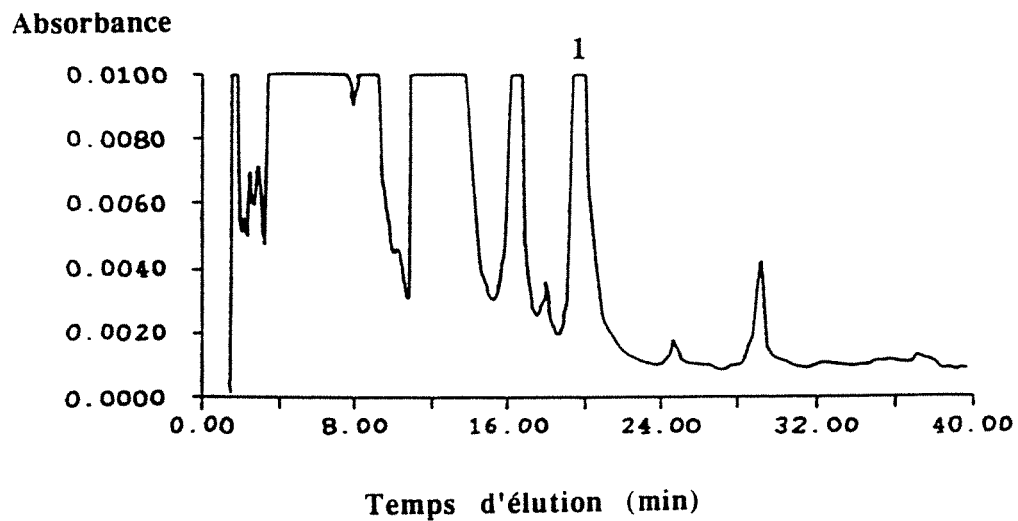
A**B**

Figure 41 : Profils d'élution du milieu réactionnel de la céto-isovalérate déshydrogénase (CIVDH). (Colonne Colosil C₁₈, 6 mm x 15 cm)

A = Réaction de la CIVDH.

B = Témoin de la réaction de la CIVDH.

1 = HS-CoA

2 = Isobutyryl-CoA

Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

l'acétyl-CoA, donc l'activité PDH, constituerait l'étape limitante de cette transformation produite par couplage des activités PDH et ACC. Nous montrerons ultérieurement que l'acétyl-CoA carboxylase, qui transforme l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, est présente dans les deux types de cultures.

* CIVDH : Il faut signaler que dans l'essai de l'activité de CIVDH, le temps de rétention du HS-CoA a changé. Ceci s'explique par le fait que le produit de la réaction, l'isobutyryl-CoA, est élué tardivement et que 25 min d'élution n'étaient pas suffisants pour le décrocher. Nous avons été amenés à augmenter le temps d'élution à 40 min et par conséquent le gradient, calculé par l'appareil à partir du temps d'élution programmé, a légèrement changé. Ceci implique le changement du temps de rétention du HS-CoA.

IV. 2. 1. 3. Autres techniques d'identification du produit de la réaction (malonyl-CoA)

IV. 2. 1. 3. 1. Chromatographie sur couche mince

Pour confirmer l'identification du malonyl-CoA comme produit des réactions enzymatiques décrites précédemment, nous avons utilisé d'autres techniques que l'HPLC, en particulier la chromatographie sur couches minces. Cette technique a été appliquée assez récemment pour séparer les acyl-CoA par De Spiegeleer et coll. (1988); nous l'avons légèrement modifiée selon nos besoins et nos objectifs.

Le support solide est constitué de gel de silice 60 F₂₅₄ (Kieselgel MERCK). Placés à 3 cm du bord inférieur de la plaque (5 cm x 20 cm) et à 1 cm des bords latéraux, les extraits (espacés l'un de l'autre de 1,5 cm) sont déposés progressivement à l'aide d'une micropipette et sont séchés sous un courant d'air froid entre chaque application, afin que le spot formé soit le plus petit possible.

Les cuves rectangulaires utilisées contiennent 100 ml de solvant. L'atmosphère des cuves est saturée pendant au moins 2 heures avec les vapeurs du solvant choisi, avant d'y introduire les plaques de silice.

Pour nous guider dans le choix de la polarité des éluants à utiliser, nous nous sommes basés sur les différents systèmes décrits par De Spiegeleer et coll. (1988).

Nous avons utilisé deux types d'éluants:

_ éluant acide :	* acide propionique	60 %
	* ammoniacque	5 %
	* eau	35 %

- _ éluant basique : a/
- | | |
|---------------------|------|
| * 2-méthoxy-éthanol | 50 % |
| * 2-butanol | 21 % |
| * 1-octanol | 5 % |
| * eau | 24 % |
- b/ * triéthylamine (18 %) de a/.

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru des distances comprises entre 10 et 15 cm à partir du dépôt. Le solvant est éliminé de la plaque par évaporation à température ambiante. Le chromatogramme est observé sous lumière ultraviolette ($\lambda = 254$ nm) et les spots (fluorescence) qui apparaissent sont notés.

Les R_f sont mesurés. Nous avons pu ainsi identifier les constituants des réactions enzymatiques en particulier le malonyl-CoA, par rapport aux R_f de témoins.

Les figures 42 et 43 montrent les chromatogrammes obtenus après chromatographie en éluant acide et basique (exemple de l'OADH).

IV. 2. 1. 3. 2. Analyse des spectres des acyl-CoA en HPLC

Dans l'analyse des milieux réactionnels en HPLC, nous avons travaillé avec le système SPECTRA FOCUS dont le logiciel ajoute certaines performances au détecteur, en particulier l'analyse des spectres des produits élués lors de la chromatographie et la possibilité de spectres en vol (en trois dimensions). Nous avons utilisé ces avantages pour l'identification du malonyl-CoA.

Les deux éléments principaux de la réaction enzymatique catalysée par l'oxaloacétate déshydrogénase sont le coenzyme-A en tant que substrat et le malonyl-CoA en tant que produit. Nous avons analysé les spectres respectifs des produits commerciaux, à la sortie de la colonne. La différence entre les spectres a été traduite par le rapport entre l'absorption à $\lambda_{230 \text{ nm}}$ et à $\lambda_{255 \text{ nm}}$ (maximum d'absorption). En ce qui concerne le HS-CoA, ce rapport est de l'ordre de 0,26 (fig 44), alors que pour le malonyl-CoA il est de l'ordre de 0,52 (fig 45). Nous pouvons ainsi différencier le HS-CoA et le malonyl-CoA non seulement par leurs temps de rétention mais aussi par ce rapport d'absorption obtenu dans leurs spectres.

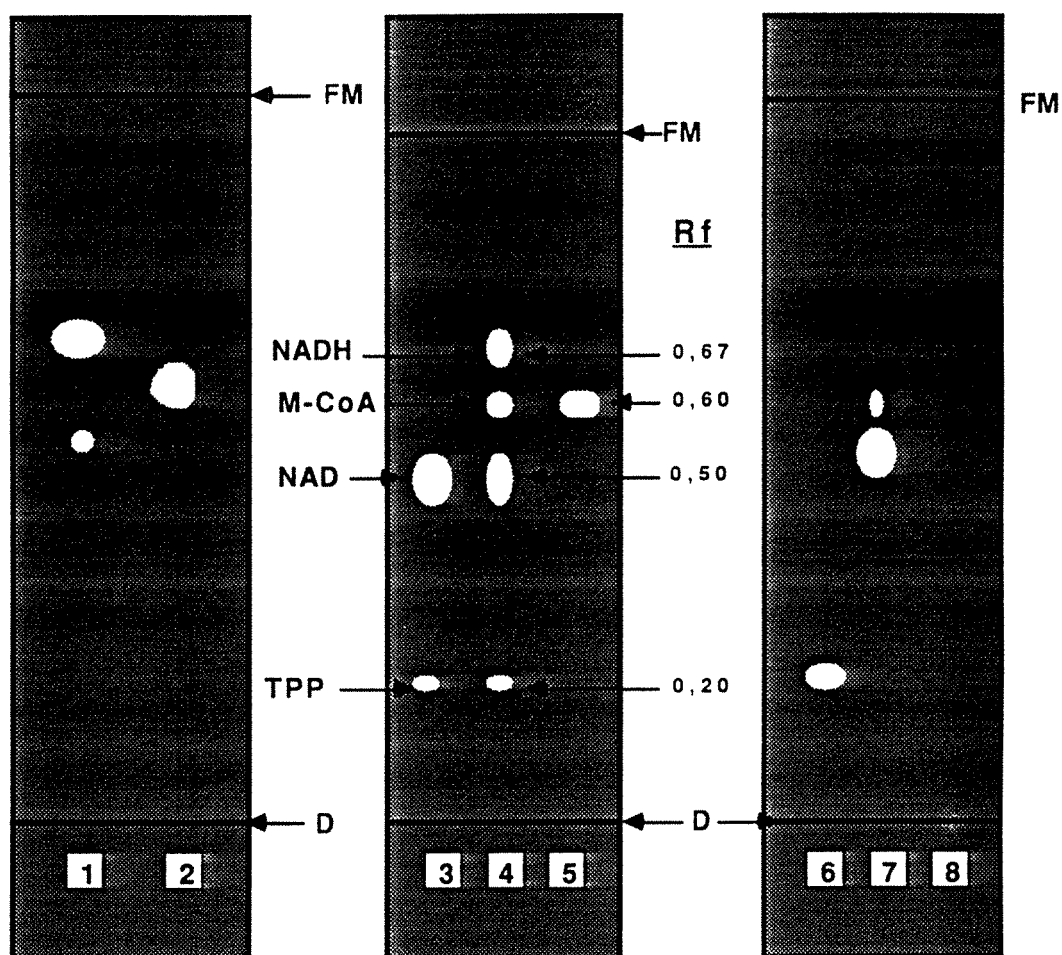


Figure 42 : Chromatographie sur couche mince de Silice avec le système éluant acide.

- | | |
|--|----------------------|
| 1 NADH | 5 Malonyl-CoA |
| 2 Malonyl-CoA (M-CoA) | 6 TPP |
| 3 Témoin de la réaction enzymatique | 7 NAD |
| 4 Réaction enzymatique | 8 HS-CoA |
- D = Dépôt** **FM = Front de migration**

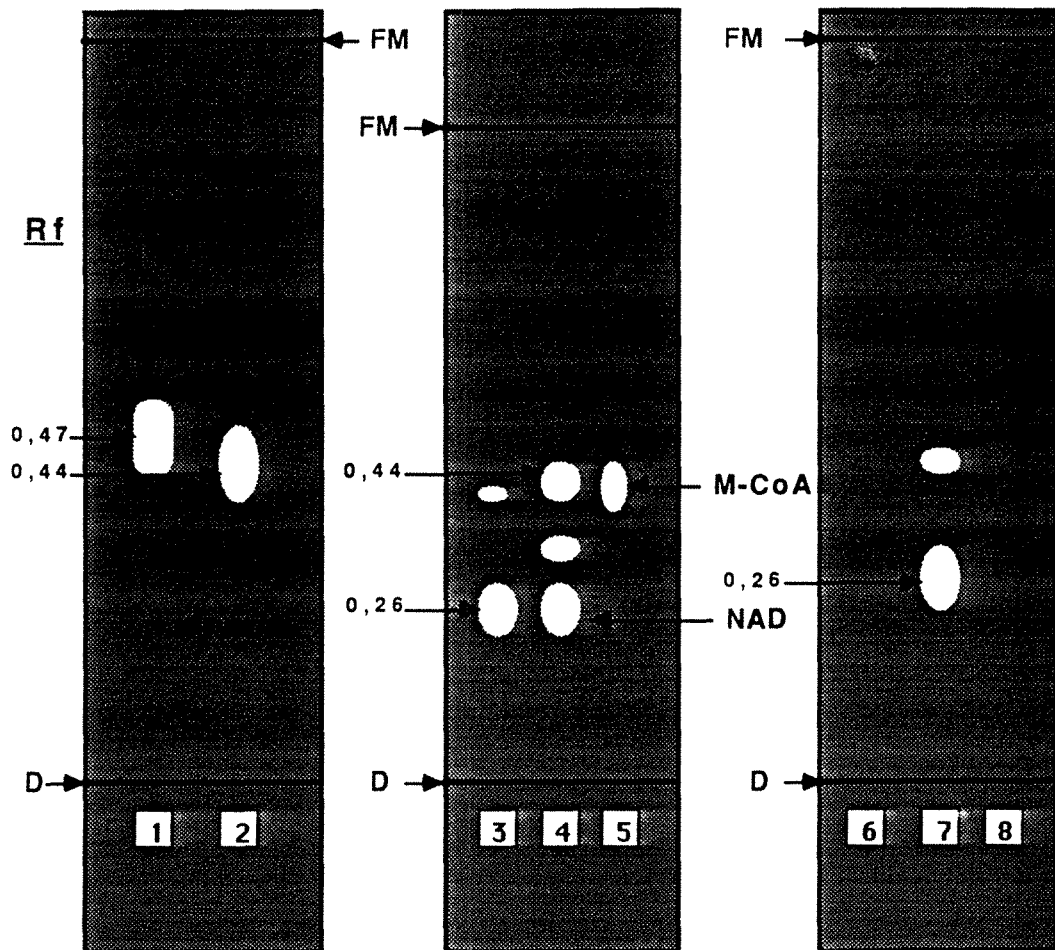


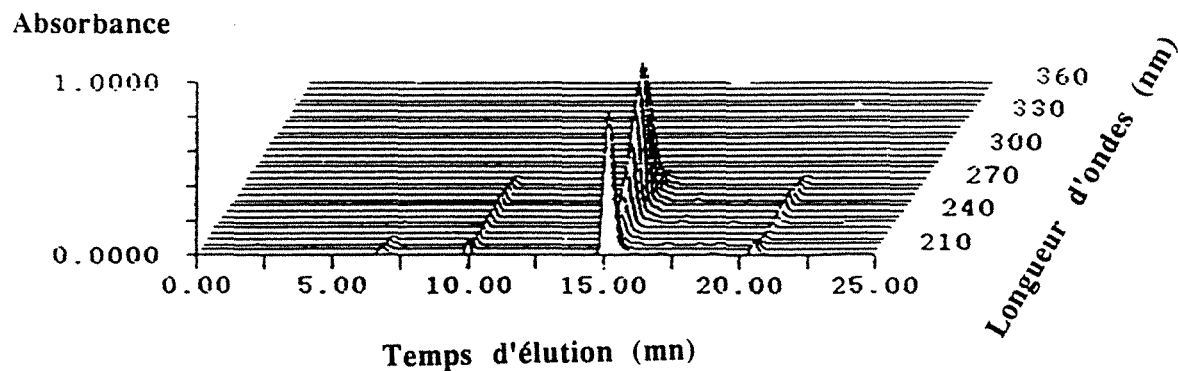
Figure 43 : Chromatographie sur couche mince de Silice avec le système éluant basique.

- | | |
|--|----------------------|
| 1 NADH | 5 Malonyl-CoA |
| 2 Malonyl-CoA (M-CoA) | 6 TPP |
| 3 Témoin de la réaction enzymatique | 7 NAD |
| 4 Réaction enzymatique | 8 HS-CoA |

D = Dépôt

FM = Front de migration

A



B

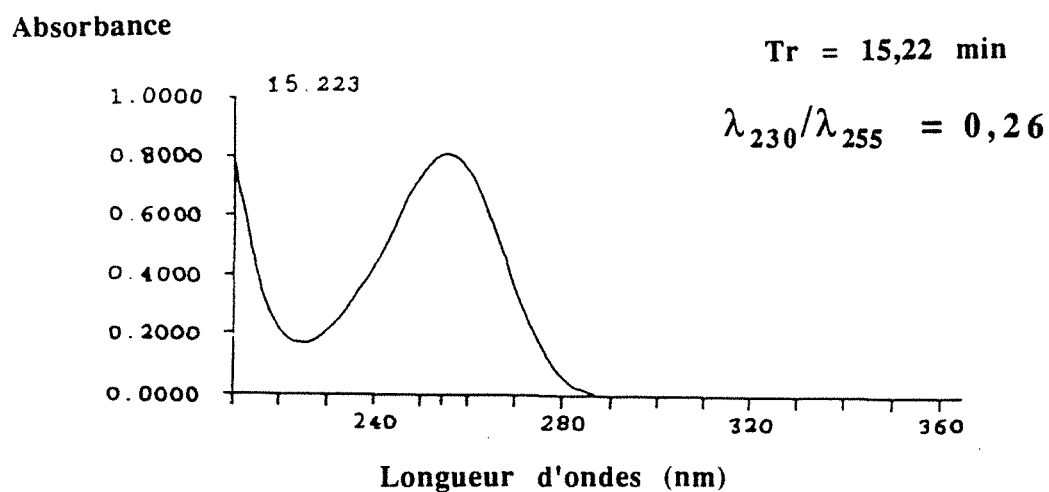


Figure 44 : Chromatogramme en trois dimensions (spectres en vol) (A) et spectre UV à un temps de rétention de 15,223 min (B) du témoin HS-CoA commercial.
(Colonne Colosil C₁₈)
Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

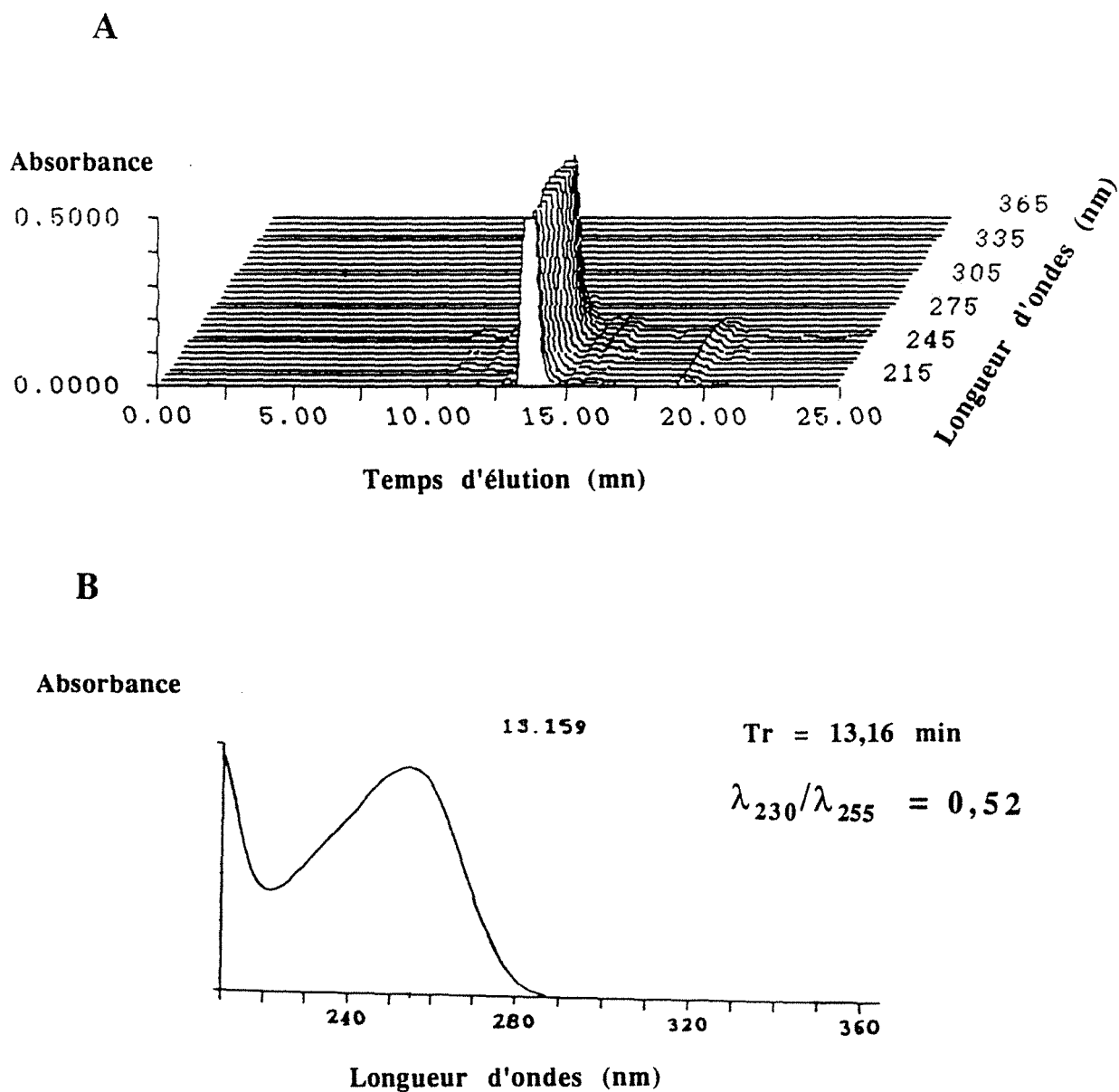


Figure 45 : Chromatogramme en trois dimension (spectres en vol) (A) et spectre UV à un temps de rétention de 13,159 min (B) du témoin Malonyl-CoA commercial. (Colonne Colosil C₁₈)
Phase mobile et conditions d'élution décrites au paragraphe IV. 2. 1. 1.

Pour consolider notre identification spectrale, nous avons déterminé les spectres de pureté des produits (en particulier le malonyl-CoA) ayant des temps de rétention déterminés. Les figures 46A et 46B montrent que les spectres des produits ayant des temps de rétention 12,279 min et 14,779 min (ces valeurs de temps de rétention, 12,279 et 14,779, sont indiquées par l'appareil; voir figure 46) ne correspondent pas au malonyl-CoA. Ces deux produits encadrent le pic du malonyl-CoA (fig 39). Sur la figure 46A, les spectres 2 ($Tr = 12,939$ min), 3 ($Tr = 13,159$ min) et 4 ($Tr = 13,300$ min) se situent sur le pic du malonyl-CoA. Alors que le produit de spectre 1 ($Tr = 12,279$ min) se situe avant le pic du malonyl-CoA. Sur la figure 46B, les spectres 1 ($Tr = 12,939$ min), 2 ($Tr = 13,159$ min) et 3 ($Tr = 13,300$ min) se situent sur le pic du malonyl-CoA. Alors que le produit de spectre 4 ($Tr = 12,279$ min) se situe après le pic du malonyl-CoA.

Par ailleurs, nous pouvons effectuer un rapport ou soustraction de spectre de pureté à des temps de rétention bien définis. Ce rapport est de l'ordre de 1 quand nous sommes en présence d'un produit pur, dans ce cas c'est le malonyl-CoA (fig 47A), ce rapport augmente au fur et à mesure que la pureté d'un produit diminue. Il peut atteindre une valeur de 15 quand il s'agit de deux produits totalement différents (fig 47B).

Les figures 48 et 49 montrent respectivement le profil d'élution de milieu réactionnel de l'oxaloacétate déshydrogénase et du témoin. Afin d'identifier les différents pics de ces deux chromatogrammes, nous avons adopté le même type de méthode que ci-dessus. Nous avons ainsi pu identifier et confirmer la présence du malonyl-CoA lors de la réaction enzymatique, grâce au rapport d'absorbance $\lambda_{230}/\lambda_{255} = 0,52$ obtenu à partir des spectres de composés sortant avec des temps de rétention proche de 13,15 min (fig 48D).

Les figures 48A et 49A illustrent l'intérêt de l'affichage en trois dimensions d'un chromatogramme en mode multi-longueurs d'ondes. Grâce à la possibilité d'avoir les spectres en vol, nous pouvons suivre l'évolution spectrale en fonction du temps de rétention ainsi que l'évolution du rapport d'absorbance $\lambda_{230}/\lambda_{255}$ que nous avons choisi comme caractéristique.

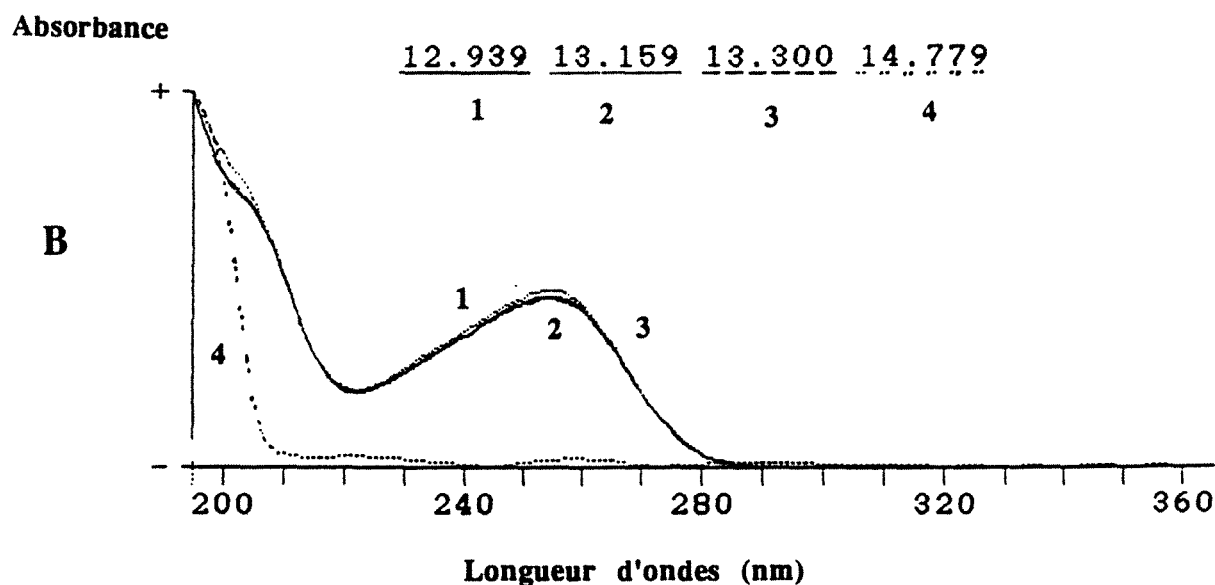
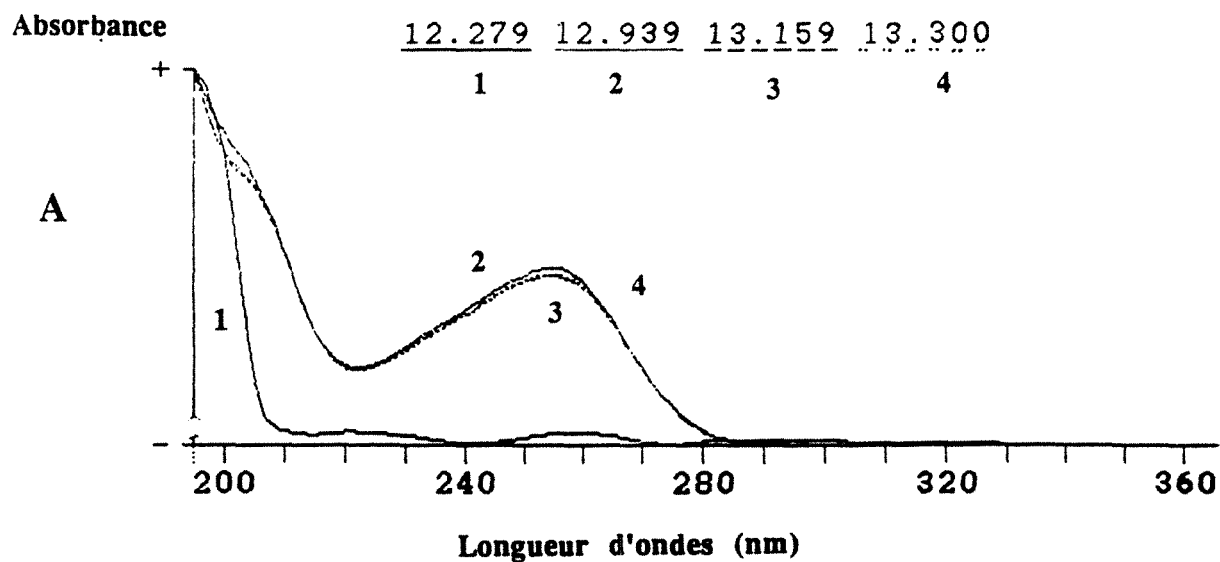


Figure 46 : Analyse de la pureté du malonyl-CoA par mesure des spectres UV à différentes régions du pic (Colonne Colosil C₁₈).

A = Spectres 2 (Tr = 12,939), 3 (Tr = 13,159) et 4 (Tr = 13,300): se situent sur le pic du malonyl-CoA. (Tr = temps de rétention en min). Spectre 1 (Tr = 12,279) se situe avant le pic du malonyl-CoA.

B = Spectres 1 (Tr = 12,939), 2 (Tr = 13,159) et 3 (Tr = 13,300): se situent sur le pic du malonyl-CoA. (Tr = temps de rétention en min). Spectre 4 (Tr = 14,779) se situe après le pic du malonyl-CoA.

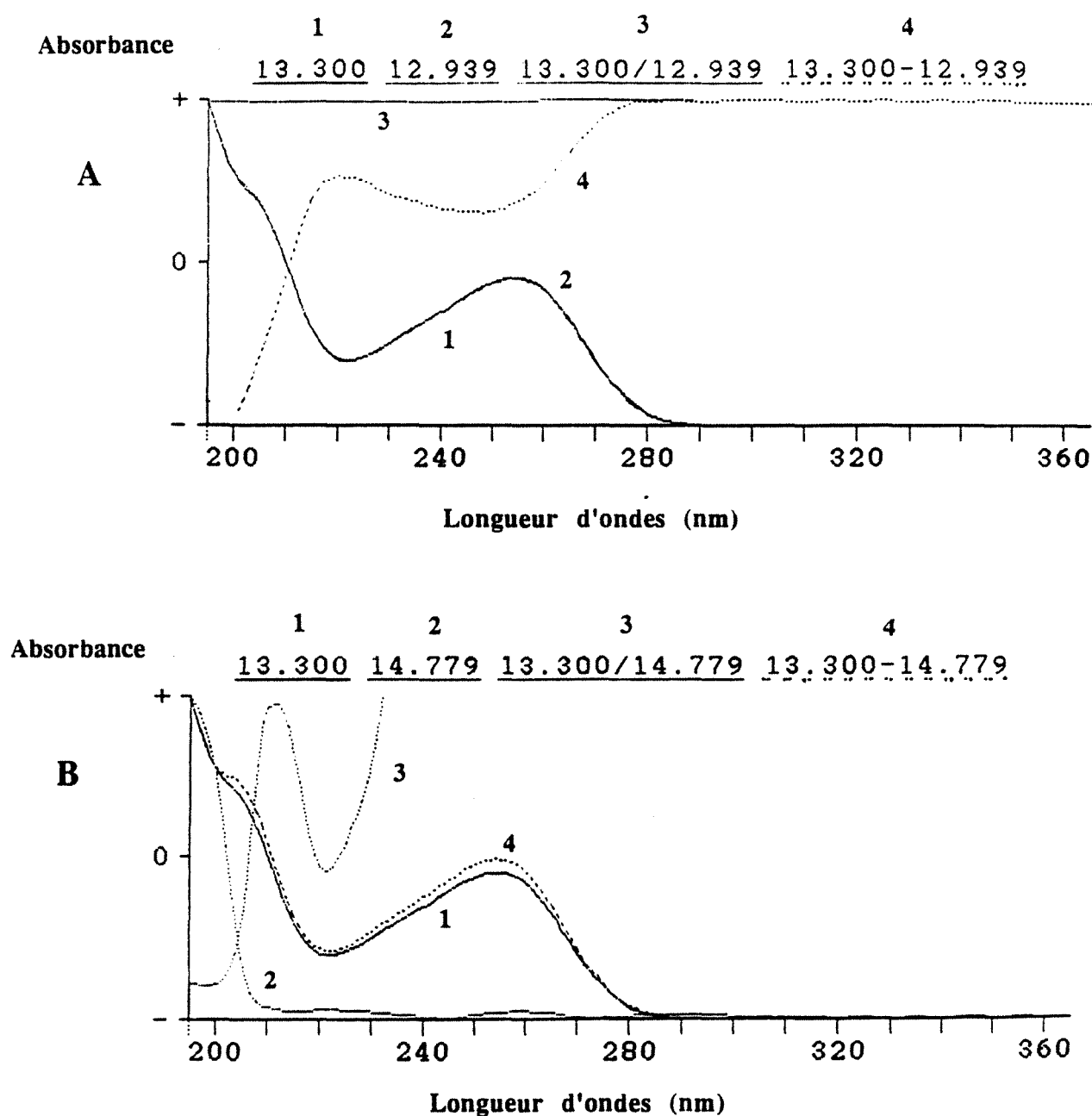


Figure 47 : Analyse de la pureté du malonyl-CoA par le rapport des spectres UV (Colonne Colosil C₁₈).

A = Rapport des spectres 1 (Tr = 13,300) et 2 (Tr = 12,939) qui se situent sur le pic du malonyl-CoA. 3 correspond au rapport de 1 et 2, 4 étant leur soustraction.

B = Rapport des spectres 1 (Tr = 13,300) et 2 (Tr = 14,779), le spectre 2 étant en dehors du pic malonyl-CoA. 3 correspond au rapport de 1 et 2, 4 étant leur soustraction.

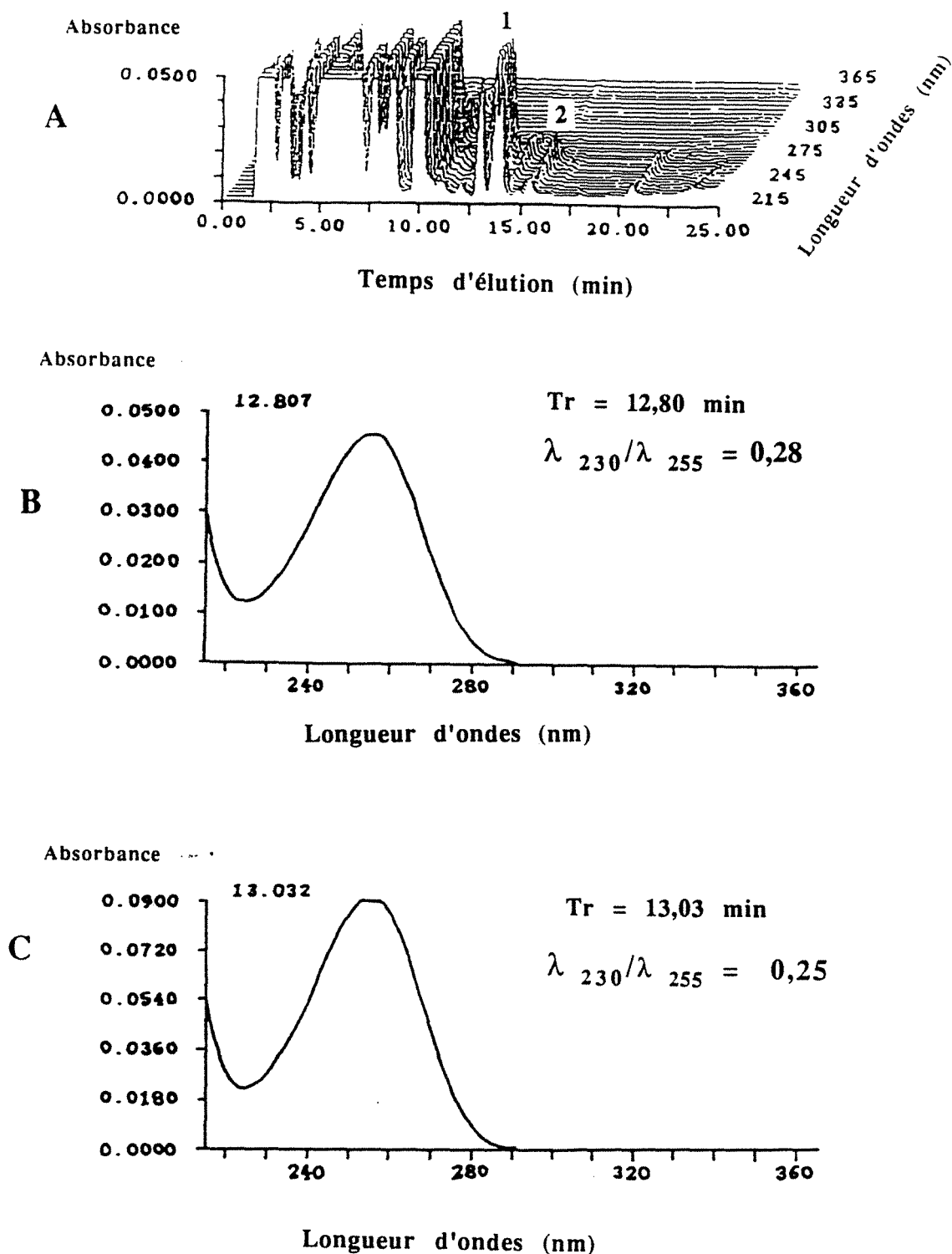


Figure 48 : Analyse spectrale du chromatogramme de la réaction de l'oxaloacétate déshydrogénase; identification du malonyl-CoA (Colonne Colosil C₁₈).

A = Chromatogramme en trois dimensions (spectres en vol) de l'OADH.
 B et C = Spectres UV pris à différents niveaux du produit de la réaction (malonyl-CoA).
 1 = Malonyl-CoA
 2 = HS-CoA

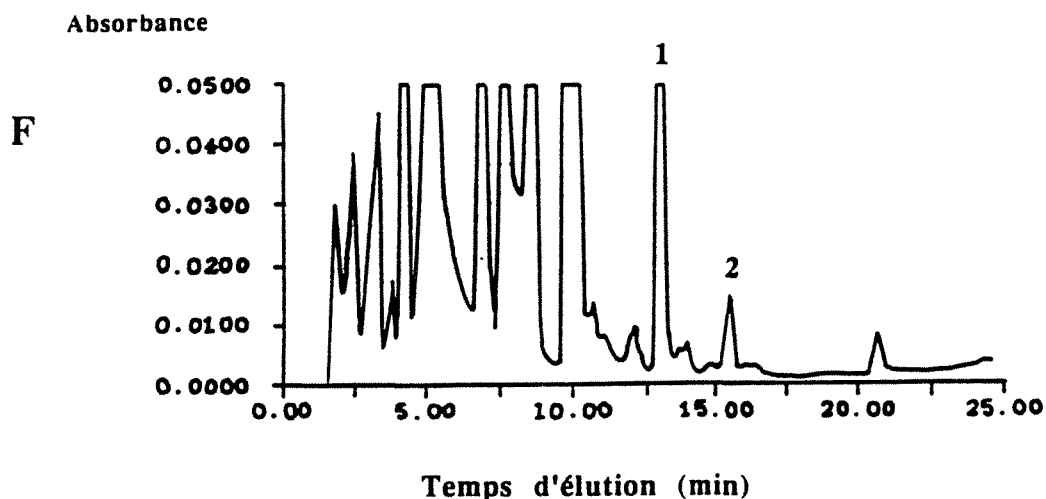
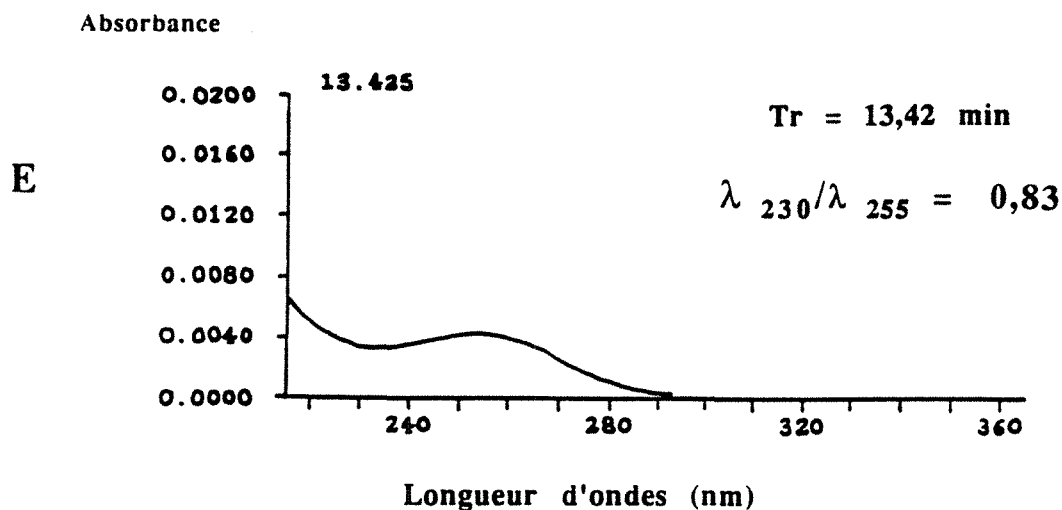
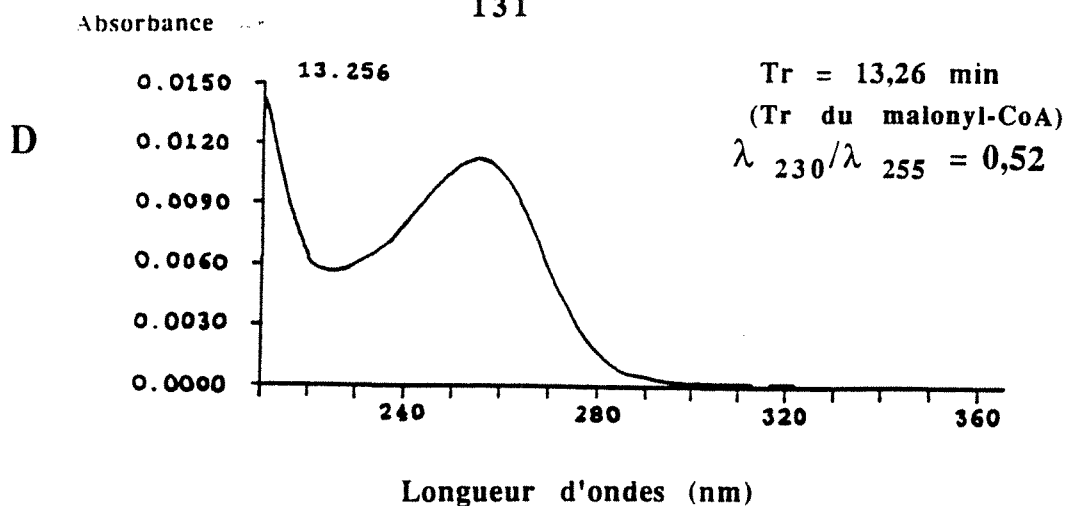


Figure 48 (suite): Analyse spectrale du chromatogramme de la réaction de l'oxaloacétate déshydrogénase; identification du malonyl-CoA (Colonne Colosil C₁₈).

D et E = Spectres UV pris à différents niveaux du produit de la réaction (malonyl-CoA).

F = Profil d'élution simple du milieu réactionnel de l'OADH.

1 = Malonyl-CoA

2 = HS-CoA

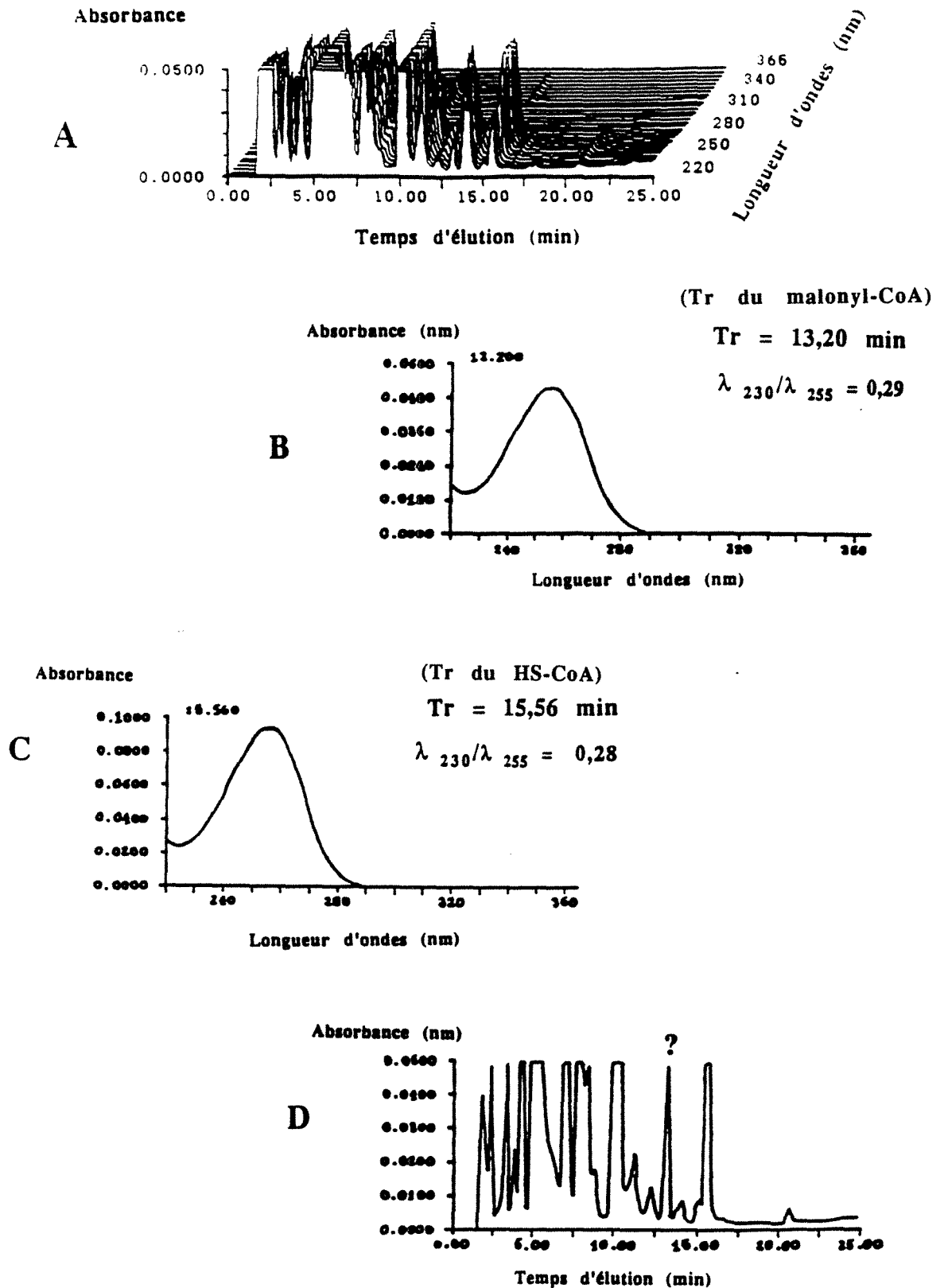


Figure 49 : Analyse spectrale du chromatogramme du témoin de la réaction de l'oxaloacétate déshydrogénase (Colonne Colosil C₁₈).

A = Chromatogramme en trois dimensions (spectres en vol) du témoin de l'OADH.

B et C = Spectres UV pris à différents niveaux du chromatogramme.

D = Profil d'élution simple du milieu réactionnel du témoin de l'OADH.

IV. 2. 1. 4. Conclusion

Pour le dosage des activités des déshydrogénases, nous avons d'abord utilisé la méthode par spectrophotométrie en suivant la formation de NADH. Nous avons rencontré des problèmes de réactions parasites (en particulier provoquées par la présence de NADH oxydase). La mise au point de la technique de dosage de ce groupe d'enzymes par HPLC, s'est révélée très positive. Ce type de dosage n'avait, à notre connaissance, pas été jusqu'alors décrit.

Le dosage des activités enzymatiques par HPLC peut donc se faire dans de bonnes conditions qualitatives et quantitatives:

- identification du produit de réaction, confirmé par d'autres méthodes
- précision
- reproductibilité.

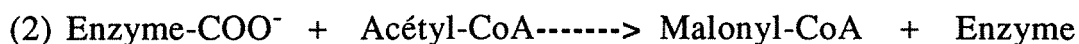
IV. 2. 2. Acétyl-CoA carboxylase

Les carboxylases sont parmi les enzymes qui pourraient jouer un rôle clé dans cette première partie de la biosynthèse de l'aglycone. En présence d'acétyl-CoA, de propionyl-CoA ou de butyryl-CoA, elles catalysent la réaction de carboxylation pour donner respectivement le malonyl-CoA, le méthylmalonyl-CoA ou l'éthylmalonyl-CoA.

Chez *S. erythreus*, une faible accumulation de l'érythronolide, utilisant le propionyl- et le 2-méthylmalonyl-CoA comme précurseurs, pourrait être causée par une faible teneur en activité propionyl-CoA carboxylase (Raczynska-Bojanowska et coll., 1973). Il y a corrélation entre la production de l'enzyme et la production de l'antibiotique. Ceci montre le rôle important que pourraient jouer ces carboxylases à la fois dans la biosynthèse des acides gras et dans la biosynthèse des macrolides.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'acétyl-CoA carboxylase de *S. ambofaciens*.

On a montré que, chez certains organismes comme les moisissures, l'acétyl-CoA carboxylase contient de la biotine et la réaction enzymatique exige à la fois du bicarbonate et des cations Mn^{2+} . Cette réaction s'effectue en deux étapes: d'abord, la carboxylation de l'enzyme à biotine conduisant au composé intermédiaire enzyme-carboxybiotine (1), puis réaction de transcarboxylation pendant laquelle l'acétyl-CoA est converti en malonyl-CoA (2) (White et coll., 1978; Weete, 1980).



La carboxylation de l'acétyl-CoA est généralement considérée comme une étape limitante dans la biosynthèse des acides gras (Alberts et Vagelos, 1972).

L'acétyl-CoA carboxylase est une cible dans les mécanismes de contrôle de la biosynthèse des acides gras et probablement des polykétides. Cette enzyme est activée dans certains cas par des composés intermédiaires du cycle tricarboxylique, comme le citrate et l'isocitrate, par l'intermédiaire d'un contrôle allostérique. L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est également contrôlée par une inhibition "feedback" exercée par le produit final (Alberts et Vagelos, 1972).

IV. 2. 2. 1. Stabilité de l'enzyme

Nous avons montré précédemment (IV. 5. 1.) que l'acétyl-CoA carboxylase peut être dosée et suivie par la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Nous nous sommes heurtés à un problème initial et majeur concernant la stabilité de l'enzyme. En effet, avec 1 mM de DTT dans le tampon Tris-HCl 100 mM (comme dans le cas de l'acétate kinase) l'acétyl-CoA carboxylase perd la moitié de son activité au bout de quatre jours. Au bout de dix jours, cette activité a presque totalement disparu. Nous avons été amené à chercher un autre facteur stabilisateur pour l'enzyme.

Pour cela, nous avons essayé plusieurs produits tels que:

- DTT..... 5 mM
- GSH..... 10 mM
- Cystéine..... 10 mM
- BSA..... 10 mg/ml
- Glycérol..... 30 %
- Sulfate d'ammonium... 2 M

En présence de ces différents facteurs, les extraits enzymatiques bruts ont été placés à 4 °C et -20 °C. La stabilité a été testée par mesure de l'activité enzymatique à plusieurs intervalles de temps de conservation. Il s'est avéré qu'avec le glycérol à 30 %, l'acétyl-CoA carboxylase est stable pendant au moins trois mois à 4°C. Nous avons choisi ce facteur. Avec les autres facteurs, les résultats sont rassemblés dans le tableau 9.

Produits	Concentrations	Activité résiduelle d'ACC (%)	
		4°C	-20°C
Dithiotréitol (DTT)	5 mM	0	0
Gluthation réduit (GSH)	10 mM	15	20
Cystéine	10 mM	7	13
Sérum albumine bovine (BSA)	10 mg/ml	35	45
Glycérol	30 %	91	89
Sulfate d'ammonium	2 M	75	80

Tableau 9 : Effets de certains facteurs stabilisateurs de l'ACC à +4 °C et à -20 °C.
 Résultats obtenus après 3 mois de conservation. Mesure de l'activité ACC effectuée dans les conditions de l'essai standard.

Pour la suite de notre travail sur l'ACC, l'enzyme sera maintenue et stockée dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,0 avec du glycérol à 30 %.

IV. 2. 2. 2. Régulation de l'acétyl-CoA carboxylase

Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions de culture que celles indiquées auparavant et utilisées pour l'étude de la régulation de l'acétate kinase à savoir: dextrines 30 g.l⁻¹; NH₄Cl 50 mM ou valine 50 mM; différents ajouts effectués (IV. 1.). Les résultats obtenus, lors de ces cultures, concernant la biomasse, la production de spiramycine et la présence des acides gras et d'ammonium demeurent valables au cours de cette étude sur l'ACC.

IV. 2. 2. 2. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'ACC

Un suivi de l'évolution de l'activité spécifique de l'ACC au cours de la croissance a été réalisé pour étudier l'influence de la source d'azote sur cette enzyme en relation avec la production de spiramycine. Nous avons suivi l'évolution de l'ACC en présence d'ammonium ou de valine. Les activités spécifiques de l'ACC ont été déterminées dans les extraits acellulaires de cellules récoltées à différents stades de la croissance.

Dans les deux cas, l'acétyl-CoA carboxylase présente deux *maxima* d'activités; l'un pendant la phase exponentielle de croissance et l'autre pendant la phase stationnaire. Le deuxième maximum coïncide avec la phase de biosynthèse de spiramycine (cf fig 21).

Sur ammonium (Fig 50a), l'activité spécifique de l'ACC est de 1,0 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ en début de la phase exponentielle de croissance. Cette activité diminue rapidement en fin de croissance jusqu'à s'annuler au troisième jour de la fermentation. En début de phase stationnaire, un petit pic d'activité est observable, mais l'activité atteint à peine une valeur de 0,05 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Sur valine (Fig 50b), cette enzyme possède une activité spécifique de 0,70 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ en début phase exponentielle. En idiophase, le pic d'activité peut atteindre une valeur de 1 $\mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

Les résultats montrent qu'en phase exponentielle de croissance, l'activité spécifique de l'ACC n'est pas significativement différente, que la source d'azote soit la valine ou l'ammonium. Sur milieu valine, l'activité spécifique de l'ACC en phase stationnaire est nettement plus élevée que sur milieu ammonium. Cette observation

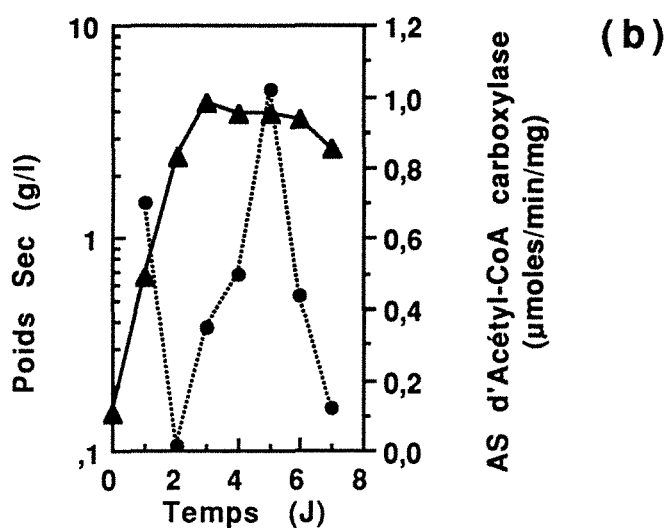
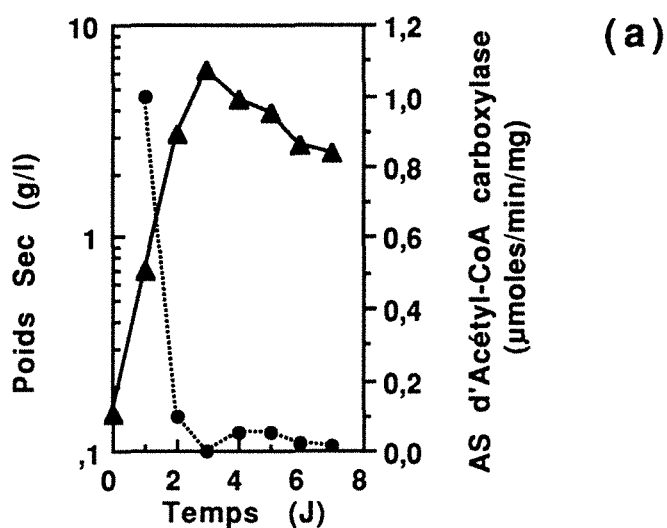


Figure 50 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité acétyl-CoA carboxylase.

Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'acétyl-CoA carboxylase (●) sur le milieu de culture avec 30 g.l^{-1} de dextrines, en présence de NH_4Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

est à rapprocher de celles faites précédemment: sur milieu valine, la production de spiramycine est plus élevée que sur milieu ammonium; de même, la concentration d'acides gras dans le milieu, en particulier l'isobutyrate, est plus élevée sur milieu valine (cf fig 21, 23 et 24).

IV. 2. 2. 2. 2. Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité spécifique de l'ACC

Lors de la culture sur milieu contenant 30 g.l⁻¹ de dextrines et 50 mM de valine comme seule source d'azote, nous avons constaté une présence, dans le milieu, assez importante des acides gras à courtes chaînes, notamment l'acétate et l'isobutyrate (fig 23). La quantité de ces acides varie avec l'âge de la fermentation. Les résultats de cette fermentation nous ont amené à réaliser trois expériences identiques à celles menées antérieurement (paragraphe IV. 1. 4.) mais ayant pour but de tester l'effet de la valine et des acides gras sur l'ACC en relation avec la synthèse de spiramycine.

L'aptitude à la production de spiramycine par *S. ambofaciens* au cours de ces trois fermentations a été testée antérieurement (fig 26). Nous avons constaté que cette production augmentait avec la concentration d'isobutyrate ajoutée, et dans le cas de la simulation de l'effet de la valine (acétate + isobutyrate).

L'activité maximale du pic de l'ACC en phase stationnaire atteint une valeur de 0,23 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, après ajout de 1 g.l⁻¹ d'isobutyrate à 24 heures de fermentation. Par rapport à la fermentation sur ammonium sans ajout, l'augmentation de l'activité maximum de ce pic est significative (fig 51a).

Avec 2,8 g.l⁻¹ d'isobutyrate ajouté après 24 heures (fig 51b), en phase stationnaire l'ACC atteint une activité spécifique de 0,47 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Ce qui donne une augmentation d'environ 100 fois par rapport à l'activité maximum obtenue sur ammonium sans ajout.

L'addition d'acétate (5 g.l⁻¹) après 12 heures puis d'isobutyrate (2,8 g.l⁻¹) après 48 heures de fermentation (fig 51c) permet encore une augmentation de l'activité spécifique de l'ACC qui atteint un maximum de 0,82 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

En phase exponentielle de croissance dans ces trois types de cultures, l'ACC atteint un même niveau d'activité que sur ammonium sans ajout (fig 50a). Dans ces conditions de culture, l'ajout des acides gras ne semble donc pas avoir d'effet immédiat sur le taux d'ACC en phase exponentielle. Par contre, en phase stationnaire cette activité augmente avec la concentration d'isobutyrate ajoutée. Cette augmentation est bien prononcée dans

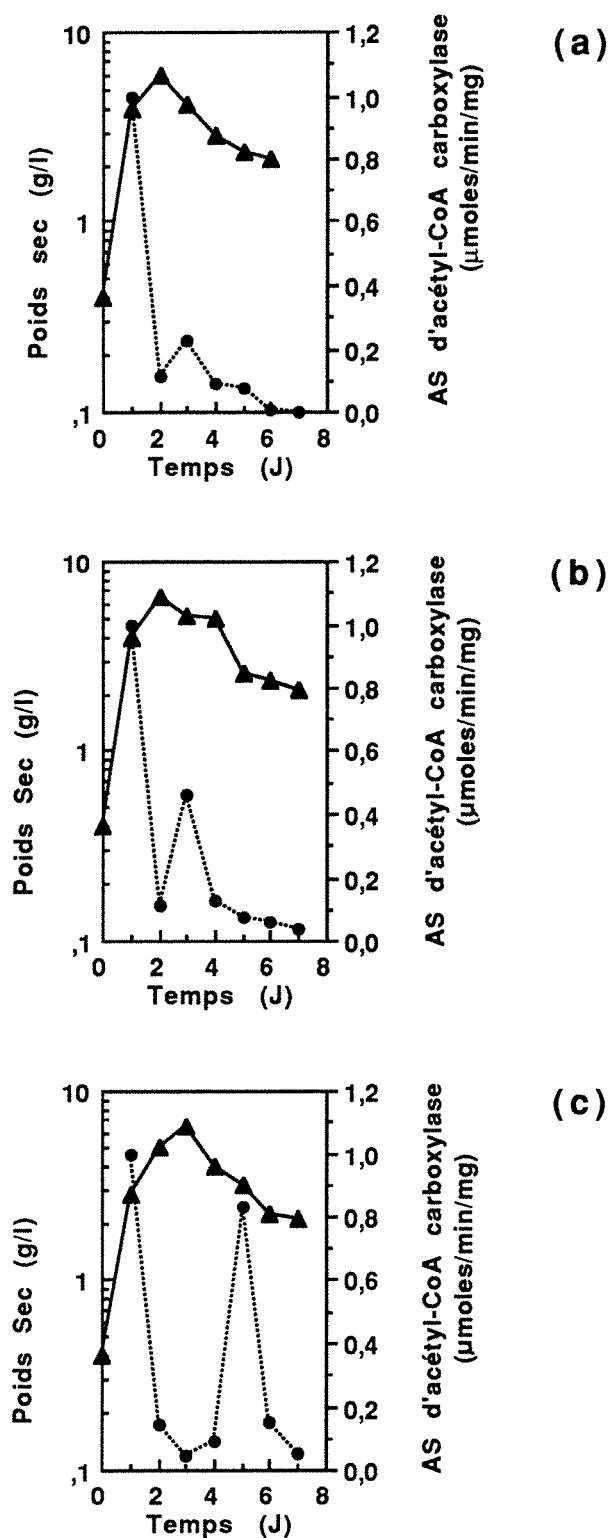


Figure 51 : Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité acétyl-CoA carboxylase.

Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'acétyl-CoA carboxylase (●) sur le milieu de culture en présence de dextrines (30 g.l^{-1}) et de NH_4Cl (50mM), avec:

- (a) : 1 g.l^{-1} d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (b) : $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate ajouté après 24 h de fermentation;
- (c) : 5 g.l^{-1} d'acétate ajouté après 12 h et $2,8 \text{ g.l}^{-1}$ d'isobutyrate après 48 h de fermentation.

le cas de l'ajout de l'acétate et de l'isobutyrate: dans ce cas nous obtenons pratiquement le même taux d'activité ACC que dans le cas d'une culture sur valine.

IV. 2. 2. 3. Purification partielle de l'ACC

L'ACC présente donc deux maxima d'activité: le premier au moment de la trophophase et le deuxième pendant l'idiophase, coïncidant avec la phase de la biosynthèse de l'antibiotique. Comme dans le cas de l'acétate kinase, nous nous sommes posés la question de savoir s'il s'agit de deux enzymes différentes ou d'une même enzyme avec des fonctions physiologiques différentes.

Afin d'apporter des éléments de réponse par caractérisation de l'enzyme, nous nous sommes proposés de travailler avec un extrait enzymatique partiellement purifié, le travail précédant ayant été effectué avec un extrait brut.

La purification de l'enzyme est également une étape nécessaire pour apprécier la spécificité de substrat: acétyl-CoA, propionyl-CoA, butyryl-CoA.

Les résultats d'essais préliminaires à la purification de l'ACC, reproduisant le protocole de purification adopté pour l'acétate kinase, ont permis d'adopter ce même protocole. Seul, le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,0 a été modifié. Il contient 30 % de glycérol au lieu de 1 mM de DTT, ce qui permet de stabiliser l'enzyme.

Le tableau 10 montre les différentes étapes de purification partielle de l'acétyl-CoA carboxylase produite par *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance. En partant de l'extrait brut, l'enzyme a été purifiée 109 fois, avec un rendement global de 65 %.

IV. 2. 2. 4. Caractérisation partielle de l'ACC

Toute cette partie a été effectuée avec un extrait enzymatique partiellement purifié, issu de l'étape de chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel.

IV. 2. 2. 4. 1. Paramètres cinétiques de l'enzyme

Pour déterminer les paramètres cinétiques de l'acétyl-CoA carboxylase (K_m et V_{max}), et pour avoir une idée sur l'affinité de l'ACC pour ses substrats, nous avons utilisé la représentation selon Lineweaver et Burk ($1/v$ en fonction de $1/s$). Dans le cas des trois substrats, cette représentation est linéaire. Les valeurs de K_m apparents et les conditions de leur détermination sont rapportées dans le tableau 11.

ETAPES	Protéines mg (PT)	A.S $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	A.T $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1}$	Purification	Rendement % en A.T
Extrait brut	2750,40	0,40	1093,40	1,00	100
Ultrafiltration sur Membrane à seuil de coupure 10 000d.	432,08	2,06	891,00	5,19	81
Filtration sur gel Séphacryl S-200	208,50	4,07	849,20	10,25	78
Chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel	16,48	43,25	712,80	109,00	65

Tableau 10 : Etapes de purification partielle de l'acétyl-CoA carboxylase synthétisée par *S. ambofaciens* en phase exponentielle de croissance.

Substrats	$V_{\max}$ ($\mu\text{moles. min}^{-1}$)	K_m (mM)
Acétyl-CoA	0,133	0,5
KHCO_3	4,5	4,0
ATP	1,4	0,09

Tableau 11 : Paramètres cinétiques de l'acétyl-CoA carboxylase en phase exponentielle de croissance.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard; concentration en substrat: variable avec des valeurs extrêmes de 3 mM pour l'ATP, 35 mM pour le KHCO_3 et 1 mM pour l'acétyl-CoA. Dans le cas de l'ATP ou de KHCO_3 , l'acétyl-CoA à 1 mM a été pris comme substrat.

IV. 2. 2. 4. 2. Effet du citrate et de certains cations monovalents sur l'activité de l'enzyme

D'après la littérature dans certains cas (mammifères), un certain nombre d'intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, en particulier le citrate, jouent un rôle stimulateur dans la biosynthèse des acides gras. Cet effet stimulateur du citrate se manifeste au niveau de la première enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse des acides gras, à savoir l'acétyl-CoA carboxylase. Il a été établi que le citrate est un activateur allostérique de l'acétyl-CoA carboxylase des mammifères (Alberts et Vagelos, 1972). Ces auteurs ont montré que cette activation de l'enzyme par le citrate est associée à la conversion de la forme protomérique inactive à la forme agrégée active.

Chez *S. ambofaciens*, nous avons recherché un effet éventuel du citrate sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase. La figure 52 montre l'effet de ce composé sur l'activité relative de l'ACC mesurée dans les conditions réactionnelles standards. Une chute rapide de l'activité relative est observée pour des concentrations en citrate allant jusqu'à 10 mM; elle est suivie d'une stabilisation autour de 63 % pour des concentrations de 10 à 50 mM de citrate.

D'après ces résultats, chez *S. ambofaciens*, le citrate ne joue pas de rôle stimulateur vis-à-vis de l'ACC. Au contraire, il a un effet inhibiteur sur l'enzyme. Cet effet semble toutefois limité.

En ce qui concerne l'effet de certains ions monovalents sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, nous avons testé les ions alcalins K^+ , Na^+ et Cs^+ . Le choix de ces cations monovalents vient du fait que, d'après la littérature, certains de ces ions et en particulier le K^+ , jouent un rôle stimulateur sur la vitesse de la carboxylation. Pour cela, certains auteurs (Hunaiti et Kolattukudy, 1982) préconisent l'utilisation du tampon phosphate de potassium afin de stimuler davantage la vitesse de carboxylation du propionyl-CoA chez *S. erythreus*.

Le tableau 12 montre l'effet de concentrations de ces trois ions comprises entre 0 et 100 mM sur l'activité relative de l'ACC de *S. ambofaciens* mesurée dans les conditions réactionnelles standards. L'ion K^+ n'a aucun effet sur l'acétyl-CoA carboxylase. Par contre, l'ion Na^+ exerce un effet stimulateur sur l'enzyme pour des concentrations supérieures à 50 mM. Le Cs^+ exerce un effet stimulateur à partir de concentrations inférieures à 10 mM. C'est le cation le plus activateur.

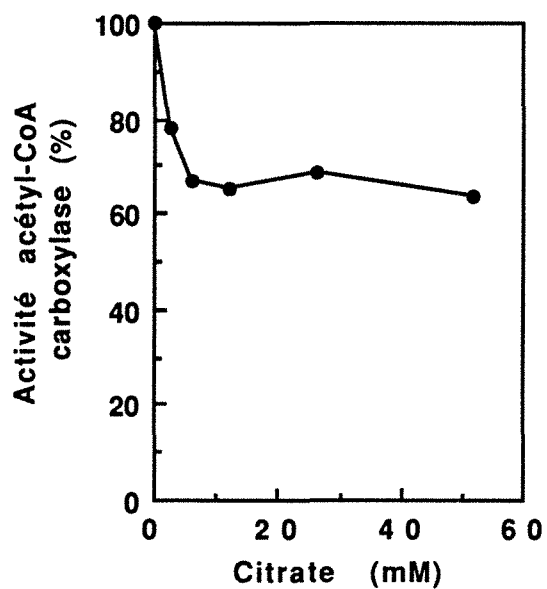


Figure 52 : Effet du citrate sur l'activité acétyl-CoA carboxylase.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard, excepté l'acétyl-CoA; concentration en acétyl-CoA: 1 mM

Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle sans ajout de citrate, prise comme référence (100 % d'activité).

Concentrations des cations monovalents (mM)	Activité acétyl-CoA carboxylase (%)		
	Na ⁺	K ⁺	Cs ⁺
0,0	100	100	100
5,9	102	95	115
51,6	115	101	132
100,0	145	105	194

Tableau 12 : Effet des cations monovalents sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase de *S. ambofaciens*.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard, excepté l'acétyl-CoA; concentration en acétyl-CoA: 1 mM

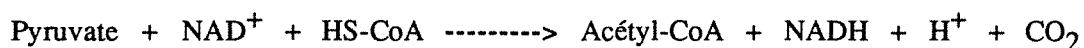
Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle sans cations monovalents, prise comme référence (100 % d'activité).

IV. 2. 2. 4. 3. Effet de la température

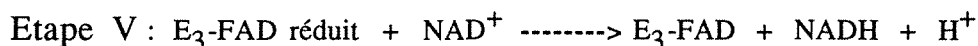
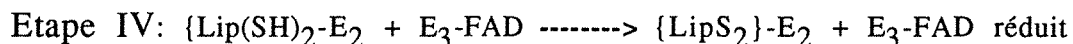
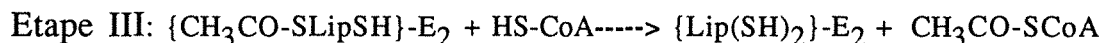
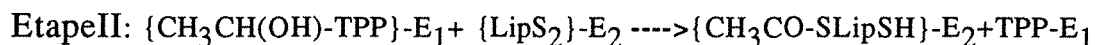
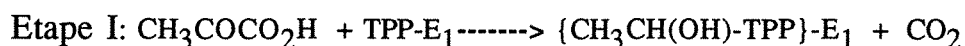
Afin de déterminer la température optimale de la réaction, l'activité enzymatique de l'acétyl-CoA carboxylase a été testée à différentes températures comprises entre +1 °C et +60 °C. La figure 53 montre que l'activité maximale est obtenue à la température de 37 °C.

IV. 2. 3. Pyruvate déshydrogénase

L'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA est catalysée par un système pyruvate déshydrogénasique. C'est un processus très complexe qui a été étudié en détail par Reed et coll. (1966). La transformation se résume à:



La décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et CO_2 met en jeu trois enzymes différentes (E_1 = pyruvate décarboxylase, E_2 = dihydrolipoyl transacétylase ou lipoate acétyltrasférase), E_3 = dihydrolipoyl déshydrogénase ou lipoamide déshydrogénase) et cinq coenzymes organisés en un complexe polyenzymatique, le système pyruvate déshydrogénasique, dont le mécanisme est schématisé comme suit :



Le dosage de l'activité pyruvate déshydrogénase (PDH) a été mis au point en utilisant l'HPLC. Une autre méthode est basée sur la détermination colorimétrique du complexe du bleu de prusse de ferrocyanure produit par la décarboxylation oxydative du substrat (pyruvate) (III. 7. 4). Cette méthode ne nécessite pas l'ajout ni de NAD^+ , ni de HS-CoA. Elle permet en fait de déterminer l'activité de

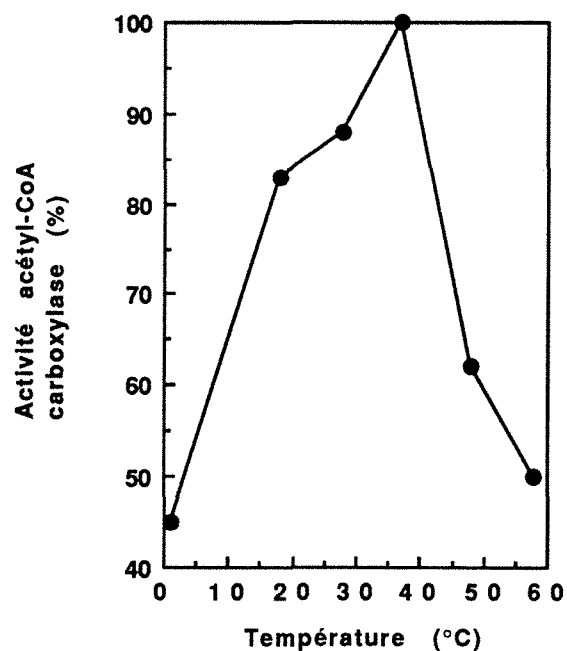


Figure 53 : Effet de la température sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase.

Les activités enzymatiques ont été testées dans les conditions de l'essai standard, excepté l'acétyl-CoA; concentration en acétyl-CoA: 1 mM

Le % d'activité est l'activité relative par rapport à celle avec la température 37 °C, prise comme référence (100 % d'activité).

la fraction E_1 du complexe déshydrogénasique, donc de doser l'activité de décarboxylation. Bien que cette réaction de décarboxylation se produise en même temps qu'une déshydrogénation, nous choisissons d'appeler cette activité "pyruvate décarboxylase" (PDC), pour la distinguer de la pyruvate déshydrogénase, transformant le pyruvate jusqu'au stade acétyl-CoA.

IV. 2. 3. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de la pyruvate décarboxylase (PDC)

Les activités spécifiques de la PDC définie ci-dessus ont été déterminées dans les extraits acellulaires issus des différents stades de la croissance. Pour cela, *S. ambofaciens* a été cultivé sur le milieu synthétique type en présence de 30 g.l⁻¹ de dextrines et de 50 mM de chlorure d'ammonium ou de 50 mM de la valine comme seule source d'azote.

Les figures 54a et 54b montrent, respectivement, l'évolution de l'activité spécifique de PDC sur milieu avec ammonium et sur milieu avec valine. Dans les deux cas, l'activité de PDC est présente en phase stationnaire de croissance. Les valeurs de l'activité de PDC sont de 0,105 et 0,073 $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ respectivement sur ammonium et sur valine au septième jour de la culture.

IV. 2.3. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de la pyruvate déshydrogénase (PDH)

. Nous avons donc suivi la formation de malonyl-CoA à partir de pyruvate pour caractériser la présence de pyruvate déshydrogénase dans les cellules au cours de la croissance.

Sur milieu avec ammonium (Fig 55a), l'évolution de cette voie de formation de malonyl-CoA à partir du pyruvate montre que cette activité est présente en phase exponentielle. Elle atteint une valeur de 8 nmoles.min⁻¹.mg⁻¹. Cette activité diminue rapidement pour s'annuler en phase stationnaire.

Sur milieu avec valine, (Fig 55b), la formation du malonyl-CoA est comparable à celle obtenue sur milieu ammonium en phase exponentielle de croissance puisqu'elle atteint une valeur de 17

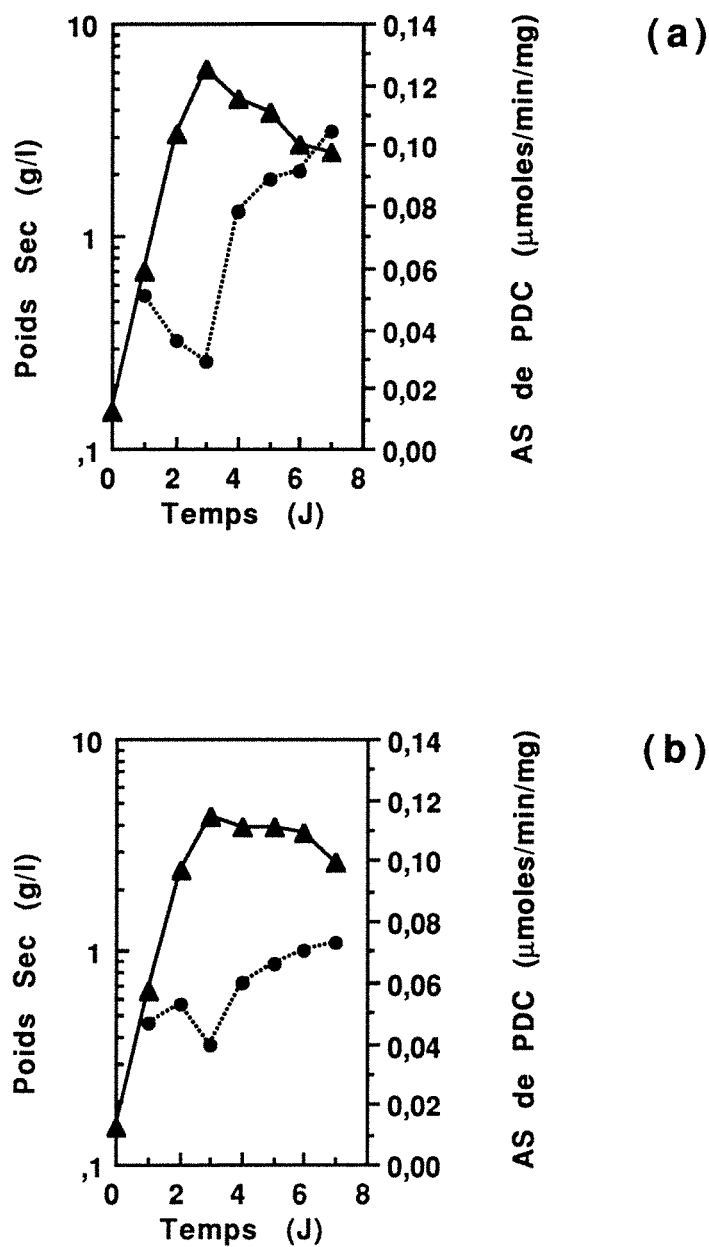


Figure 54 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité pyruvate décarboxylase (PDC).
Cinétique de croissance ($\blacktriangle$) et évolution de l'activité spécifique (AS) de la PDC ($\bullet$) sur le milieu de culture avec 30 g.l^{-1} de dextrines, en présence de NH_4Cl 50 mM (**a**) et de valine 50 mM (**b**).

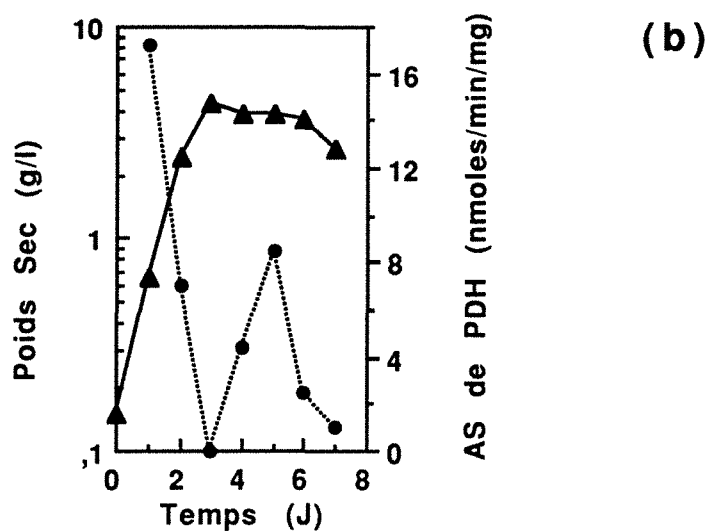
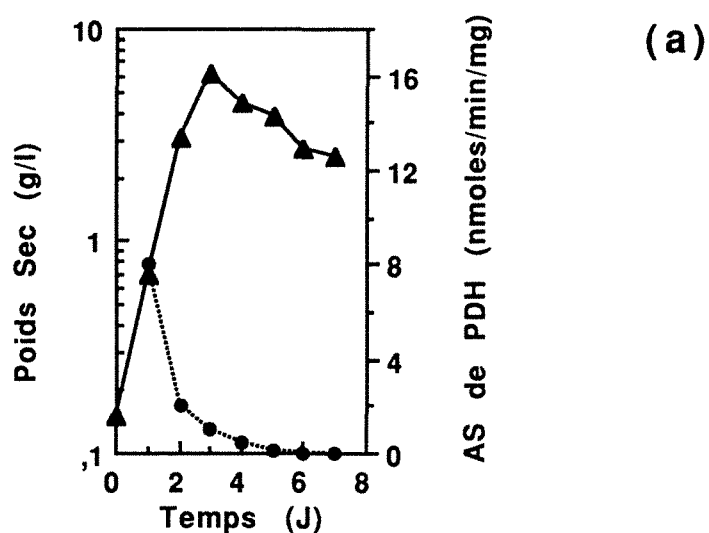


Figure 55 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité pyruvate déshydrogénase (PDH = formation du malonyl-CoA à partir du pyruvate). Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de la PDH (●) sur le milieu de culture avec 30 g.l⁻¹ de dextrines, en présence de NH₄Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

nmoles.min⁻¹.mg⁻¹. Cette activité est aussi présente en phase stationnaire avec une activité spécifique de 8,5 nmoles.min⁻¹.mg⁻¹.

D'après ces résultats, nous constatons l'effet inducteur de la valine sur la synthèse de la PDH, en phase stationnaire

IV. 2. 4. Oxaloacétate déshydrogénase

Une autre enzyme qui intervient dans la formation directe du malonyl-CoA est l'oxaloacétate déshydrogénase. L'oxydation de l'oxaloacétate en malonyl-CoA, réalisée par ce complexe déshydrogénasique, est une réaction analogue à celle qui oxyde le pyruvate en acétyl-CoA et CO₂. Elle met en jeu un mécanisme identique et nécessite la présence des mêmes cofacteurs: pyrophosphate de thiamine, acide lipoïque, HS-CoA, NAD⁺ et FAD. Le complexe oxaloacétate déshydrogénasique a une structure et des propriétés semblables à celles du complexe pyruvate déshydrogénasique.



Le dosage de l'activité oxaloacétate déshydrogénase (OADH) a été mis au point en utilisant l'HPLC. Comme dans le cas de PDC (cf IV. 2. 3), nous choisissons d'appeler l'activité oxaloacétate décarboxylase (OADC), pour la distinguer de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH), transformant l'oxaloacétate jusqu'au stade acétyl-CoA.

IV. 2. 4. 1. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'oxaloacétate décarboxylase (OADC)

L'oxaloacétate décarboxylase est étudiée de la même manière que la pyruvate décarboxylase.

Sur ammonium (Fig 56a), le suivi de l'évolution de l'activité spécifique de l'OADC montre que l'enzyme est moins présente en phase exponentielle de croissance qu'en phase stationnaire. En effet, cette activité spécifique est de 0,058 µmoles.min⁻¹.mg⁻¹ au premier jour de la culture. Elle chute en fin de croissance (0,030 µmoles.min⁻¹.mg⁻¹ au troisième jour), mais s'accroît pendant la phase stationnaire pour atteindre une valeur de 0,126 µmoles.min⁻¹.mg⁻¹.

Sur valine (Fig 56b), l'évolution de l'activité de l'OADC présente la même allure que celle observée sur ammonium. Cette

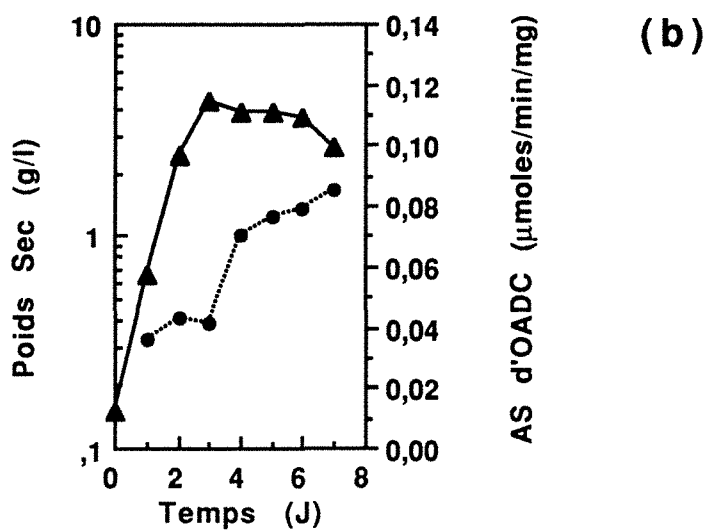
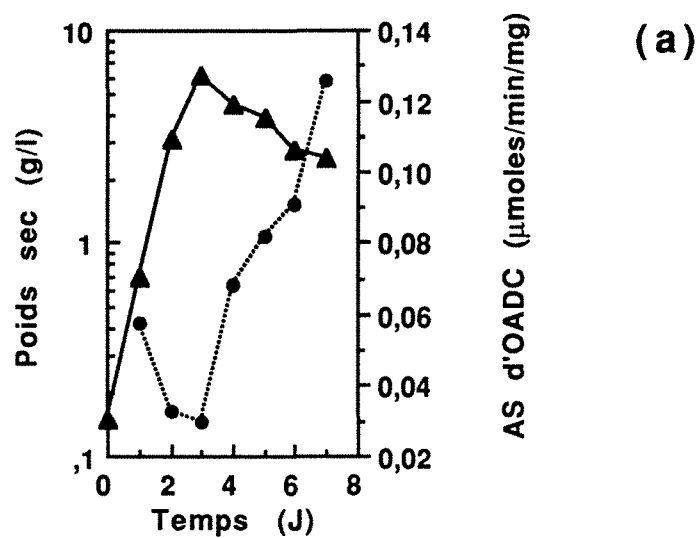


Figure 56 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité oxaloacétate décarboxylase (OADC).
Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'OADC (●) sur le milieu de culture avec 30 g.l⁻¹ de dextrines, en présence de NH₄Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

activité est la plus élevée en phase stationnaire de croissance, puisqu'elle atteint une valeur de $0,085 \mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

IV. 2. 4. 2. Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité spécifique de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH)

Le complexe de l'oxaloacétate déshydrogénasique est suivi par la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant l'oxaloacétate comme substrat. Cette réaction aboutit directement à la formation du malonyl-CoA.

Sur milieu avec ammonium (Fig 57a), l'évolution de l'activité spécifique présente deux *maxima* d'activité maximale: l'un en phase exponentielle de croissance ($5 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), l'autre en phase stationnaire ($4 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

Sur milieu avec valine (Fig 57b), l'activité spécifique de l'OADH présente un pic d'activité en phase exponentielle, puis cette activité diminue progressivement en phase stationnaire jusqu'à s'annuler au septième jour. Cette allure de l'activité de l'OADH sur valine est différente de celle sur ammonium.

Cette enzyme est donc présente dans les deux types de cultures étudiées et l'évolution de son activité spécifique dépend de la nature de la source d'azote fournie et de l'âge de la fermentation.

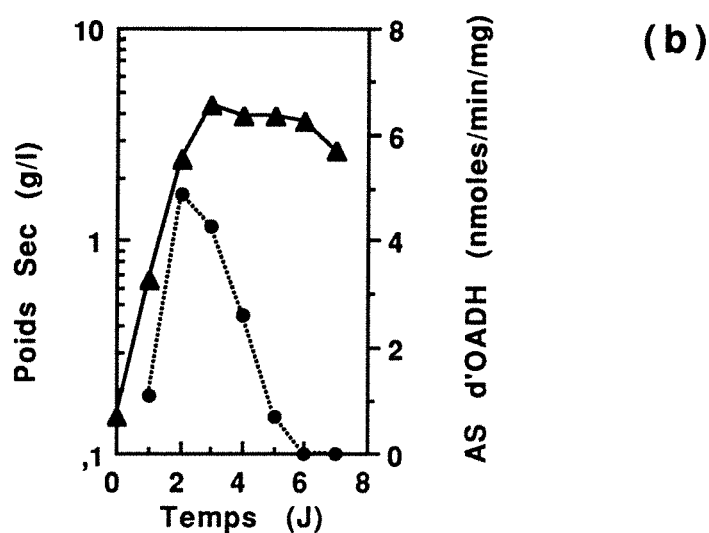
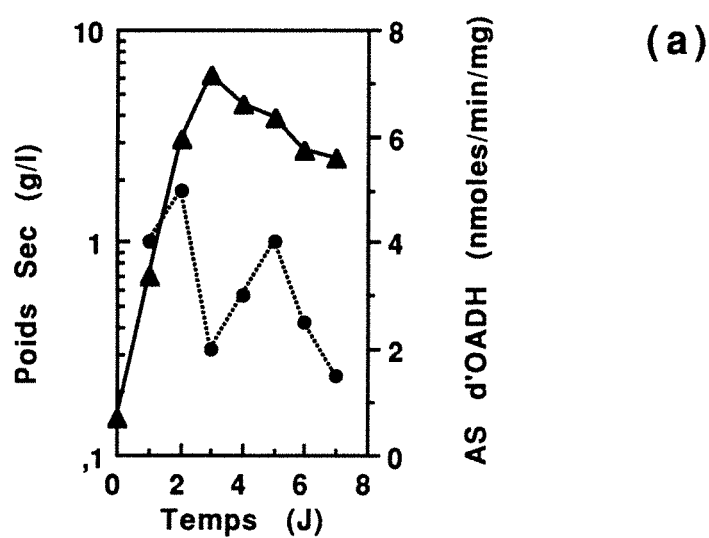


Figure 57 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité oxaloacétate déshydrogénase (OADH). Cinétique de croissance (▲) et évolution de l'activité spécifique (AS) de l'OADH (●) sur le milieu de culture avec 30 g.l⁻¹ de dextrines, en présence de NH₄Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

IV. 2. 5. Discussion et conclusions

L'acétyl-CoA carboxylase est considérée comme l'une des enzymes clés, à la fois, pour la synthèse des acides gras et pour la biosynthèse des macrolides. Etant donné ce rôle, en particulier chez les procaryotes, nous nous sommes intéressés à cette enzyme, en relation avec la biosynthèse de spiramycine chez *S. ambofaciens*.

Parmi les difficultés, que nous avons rencontrées lors de notre travail, citons l'instabilité de l'acétyl-CoA carboxylase. En général, les carboxylases font partie des enzymes les plus fragiles et exigent des conditions de conservation et de stockage bien précises. A cause de l'instabilité des carboxylases de *Streptomyces*, seulement une faible activité propionyl-CoA carboxylase a été détectée chez les organismes producteurs de l'antibiotique (Wawszkiewicz et Lynen, 1964). L'instabilité est un problème majeur surtout pour purifier et caractériser l'enzyme. L'ACC de *S. ambofaciens* perd 50 % de son activité au bout de quatre jours dans du tampon; nous avons pu la stabiliser avec 30 % de glycérol incorporé dans le tampon Tris-HCl. Hunaiti et Kolattukudy. (1982) ont signalé que les enzymes de *S. erythreus* sont exceptionnellement instables et particulièrement la propionyl-CoA carboxylase. Ces auteurs ont montré que cette enzyme perd 30 % de son activité en une nuit au congélateur. Quand ils utilisent 10 % de glycérol et 1 mM EDTA dans le tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,0, la propionyl-CoA carboxylase reste stable au moins deux semaines à -10 °C. Le même phénomène a été observé dans le cas de l'acétyl-CoA carboxylase de *Candida lipolytica* (Mashina et coll., 1976). Avec 50 % de glycérol, cette enzyme est stable au moins six mois. Il y a très peu de connaissance concernant le nombre, la nature et la spécificité des substrats des carboxylases chez ces organismes.

Chez *S. ambofaciens*, nous avons suivi l'évolution de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase à différents stades de croissance. Nous avons utilisé, d'abord, deux sortes de cultures ayant comme différence la source d'azote: l'une sur du chlorure d'ammonium et l'autre sur de la valine. Sur les deux fermentations, l'enzyme est très active en phase exponentielle de croissance, alors que *S. ambofaciens* assure ses fonctions biosynthétiques dont la biosynthèse des acides gras. Par contre, en phase stationnaire, l'activité spécifique de l'ACC est négligeable lorsque la bactérie croît sur le milieu contenant de NH_4Cl comme seule source d'azote. Cependant, sur milieu avec valine, l'ACC possède une activité spécifique très élevée. Ceci montre l'influence de la source d'azote sur l'activité de l'ACC en phase stationnaire de croissance. Cette même source d'azote a par ailleurs une influence sur la production

de spiramycine. En effet, la production de l'antibiotique est plus active sur valine que sur ammonium. Ceci montre une corrélation entre la présence active de l'ACC sur valine et la production de spiramycine, et par conséquent le rôle important que pourrait jouer l'ACC dans la biosynthèse de spiramycine chez *S. ambofaciens*.

Nous avons également montré l'effet bénéfique de l'ajout des acides gras sur l'activité spécifique de l'ACC. En effet, l'augmentation de la concentration d'isobutyrate stimule d'une part la synthèse de l'ACC et d'autre part la production de spiramycine par rapport à une culture sur ammonium sans ajout. Nous confirmons ainsi l'effet stimulateur des acides gras sur la production de spiramycine et en même temps nous démontrons leur effet stimulateur sur l'ACC. Dans d'autres conditions expérimentales, nous retrouvons une relation entre la production de l'antibiotique et l'activité de l'ACC.

L'addition de l'acétate et de l'isobutyrate dans une même fermentation reproduit pratiquement l'effet de la valine à la fois au niveau du taux de biosynthèse de l'antibiotique et de l'activité de l'enzyme.

Chez *S. erythreus*, la carboxylase purifiée catalyse la réaction de carboxylation de l'acétyl-CoA et du propionyl-CoA avec la même vitesse (Hunaiti et Kolattukudy, 1982). Ces auteurs suggèrent la formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA pendant la phase exponentielle de croissance, probablement pour la synthèse des lipides membranaires; puis la formation de méthylmalonyl-CoA à partir du propionyl-CoA, pendant la phase stationnaire, ceci pour la biosynthèse de l'érythromycine.

Les études de la régulation de l'ACC chez *S. ambofaciens* ont montré que cette enzyme présente deux activités maximales au cours de la croissance et que le deuxième maximum coïncide avec la production de spiramycine. A partir de ces constatations, une purification partielle de cette enzyme a été réalisée, afin de comparer les deux activités en fonction de la croissance du microorganisme.

La succession des étapes de purification effectuées nous a permis d'enrichir l'extrait enzymatique de 109 fois par rapport à l'extrait brut, avec un rendement de 65 %. Le protocole de purification utilisé est le même que celui de l'acétate kinase.

La propionyl-CoA carboxylase de foie de Bovins a été purifiée 11 fois avec un rendement de 36 % (Halenzen et Lane, 1960). L'ACC de Rat hepatoma 7777 a été enrichie de 67 fois avec un rendement de 11,5 %. La même enzyme obtenue de foie de Rat a été purifiée 164 fois avec un rendement de 23 % (Majerus et coll., 1968). L'ACC de *Isochrysis galbana* a été purifiée 308 fois avec un rendement de 8,8 % (Livne et Sukenik, 1990). L'ACC de foie de Poulet a été

purifiée 4090 fois (De Spiegeleer et coll., 1988). D'après cet aperçu, nous constatons que les degrés de purification ainsi que les rendements sont très variables selon le protocole choisi et l'origine de l'enzyme. En tout cas, les résultats obtenus avec notre protocole pouvaient permettre d'envisager une purification plus poussée de l'enzyme.

Par ailleurs, nous avons comparé les valeurs de K_m des substrats principaux des carboxylases d'origines différentes (Tableau 13).

La majorité des valeurs de K_m de ces différents substrats sont assez faibles, ce qui signifie que l'affinité de la plupart des acétyl-CoA carboxylases est bonne pour ces substrats.

Le citrate est l'un des acides tricarboxyliques qui jouent un rôle stimulateur vis-à-vis de l'ACC issue d'un certain nombre de mammifères. Par contre chez les microorganismes comme *E. coli* ou la levure, le citrate n'a pas d'effet stimulateur apparent (Alberts et Vagelos, 1972). Nous avons constaté chez *S. ambofaciens* que l'ACC n'était pas activée par le citrate, et pouvait même être inactivée par cette molécule.

La propionyl-CoA carboxylase, isolée de foie de Bovins, est stimulée 7 à 9 fois par des cations monovalents K^+ , Rb^+ et Cs^+ , alors que Na^+ et Li^+ montrent peu ou pas d'activation. La vitesse de carboxylation catalysée par l'enzyme de coeur de Porc a augmenté de 2 à 2,5 fois par la présence des cations monovalents (Alberts et Vagelos, 1972). Chez *S. erythreus*, la propionyl-CoA carboxylase est stimulée 3 à 4 fois par le Cs^+ , K^+ et Rb^+ . Par contre le Na^+ ne montre aucun effet sur l'enzyme, le Li^+ l'inhibe fortement (Hunaiti et Kolattukudy, 1982). Dans le cas de *S. ambofaciens*, le cation monovalent Cs^+ active l'ACC d'un facteur de 2 fois. Le Na^+ a un effet moyen alors que le K^+ n'a pas d'effet sur l'enzyme.

La température optimale de l'acétyl-CoA carboxylase de *S. ambofaciens* est de 37 °C, c'est la température choisie pour les conditions de l'essai standard.

Nous avons voulu évaluer les aptitudes de l'enzyme à carboxyler d'autres substrats et en particulier le propionyl-CoA et le butyryl-CoA. Cependant, nous avons rencontré un problème technique concernant l'indisponibilité des témoins commerciaux, afin d'identifier par HPLC les produits des réactions enzymatiques.

	Valeurs de K_m (mM) des substrats			
Origines d'ACC	Acétyl-CoA	ATP	Bicarbonate	Références
<i>Streptomyces erythreus</i> :	0,167	0,125	6	Hunaiti et Kolattukudy, 1982
<i>Isochrysis galbana</i> :	0,31	0,051	0,91	Livne et Sukenik, 1990
<i>Candida lipolytica</i>	0,26	0,07	3,7	Mashina et coll., 1976
Foie de Rat	0,025	0,015	2,5	Alberts et Vagelos, 1972
<i>Streptomyces ambofaciens</i> :	0,5	0,09	4	

Tableau 13: Comparaison de K_m des principaux substrats des carboxylases d'origines différentes.

Ceci nous a empêché de poursuivre notre objectif touchant cette partie de la caractérisation de l'enzyme. L'étude de l'ACC en phase stationnaire et sa comparaison avec la phase exponentielle a été suspendue jusqu'à ce que nous trouvions un remède à ce problème.

Le dosage de la PDH a été réalisé par mesure du malonyl-CoA, formé par action simultanée de ce complexe enzymatique et de l'ACC. Nous avons supposé que la PDH était limitante devant l'ACC. Cette activité a été mesurée à partir de cellules cultivées en présence d'ammonium ou de valine.

Sur milieu ammonium, cette activité PDH est présente en phase exponentielle de croissance. En phase stationnaire, elle est pratiquement nulle. Sur milieu valine, cette activité est présente pendant les deux phases de croissance. Dans les deux milieux de culture, l'activité PDC, présente en phase exponentielle est élevée également en phase stationnaire.

Pendant la phase stationnaire sur milieu ammonium, il y a augmentation de l'excrétion d'acétate. Il est envisageable de corréliser cette production au fonctionnement de la PDC, et à un non-fonctionnement de la PDH. Sur milieu valine, pendant la phase stationnaire, il y a fonctionnement de la PDC, de la PDH et de l'ACC (cf fig 50, 54 et 56). Pendant cette phase, il n'y a pas d'augmentation de l'excrétion d'acétate. L'acétate produit en phase exponentielle est réassimilé pendant la phase stationnaire (acétate -> acétyl-CoA -> malonyl-CoA).

Partant de l'hypothèse que le malonyl-CoA intervient directement dans la biosynthèse de spiramycine, il faudrait expliquer pourquoi, dans la culture sur ammonium en phase stationnaire, les activités spécifiques de l'ACC et de la PDH étant négligeables, il peut cependant y avoir production de l'antibiotique. Une explication pourrait être l'existence d'autres voies permettant d'aboutir au malonyl-CoA. Ceci nous a amené à rechercher des voies de formation du malonyl-CoA autres que la voie "pyruvate". Nous avons montré la mise en oeuvre de l'OADH sur milieu ammonium et valine. Cette mise en évidence d'une activité OADH pourrait laisser supposer que la transformation du pyruvate en malonyl-CoA se ferait, non pas nécessairement par couplage PDH-ACC, mais par carboxylation du pyruvate puis mise en oeuvre de l'OADH. La présence d'une activité OADH en phase stationnaire sur milieu ammonium et l'absence dans ces conditions de PDH conforte l'hypothèse que nous dosons effectivement la PDH lorsque le pyruvate est le substrat et non pas un ensemble réactionnel pyruvate -> oxaloacétate -> malonyl-CoA.

La formation du malonyl-CoA à partir de l'oxaloacétate est une voie directe. Sur milieu ammonium, l'évolution de l'activité

spécifique de l'OADH présente un pic en phase stationnaire. Ceci montre qu'il y a effectivement formation du malonyl-CoA à partir de l'oxaloacétate. Cette formation est parallèle à celle de spiramycine. De même, l'oxaloacétate décarboxylase est surtout présente en phase stationnaire de croissance. Sur milieu valine, cette voie de "l'oxaloacétate" n'a pas le même rôle que sur ammonium, puisque sa présence n'est pas corrélée avec la phase de production de spiramycine.

Chez *S. aureofaciens*, la comparaison des activités spécifiques des enzymes pyruvate kinase, pyruvate déshydrogénase (mesurée par la méthode colorimétrique comme PDC) et phosphoenolpyruvate carboxylase au cours de la culture, indiquent que la formation du malonyl-CoA ne s'effectue pas seulement par carboxylation de l'acétyl-CoA (Behal et coll., 1977). Ces auteurs ont établi le rôle important des systèmes PEP carboxylase et oxaloacétate déshydrogénase dans la formation du malonyl-CoA utilisé dans la biosynthèse de tétracycline.

Chez *S. ambofaciens*, nous avons montré qu'il existait deux voies permettant la formation du malonyl-CoA: voie pyruvate-acétyl-CoA et voie oxaloacétate. Ces deux voies dépendent essentiellement de l'âge de la culture et de la source d'azote fournie à la bactérie.

A partir de ces résultats, nous pourrions proposer un modèle concernant les différentes voies de formation du malonyl-CoA. Chez *S. ambofaciens*, cultivé sur milieu contenant du chlorure d'ammonium comme source d'azote, la voie de l'oxaloacétate fonctionnerait seule en phase stationnaire pour former le malonyl-CoA. Par contre, en phase exponentielle de croissance, la voie pyruvate-acétyl-CoA participerait aussi à cette formation, probablement en parallèle à la voie de l'oxaloacétate. La figure 58a rassemble l'évolution de l'ACC, PDC et la voie pyruvate-acétyl-CoA sur milieu ammonium. Sur milieu valine, nous pourrions déduire l'effet régulateur positif de cet acide aminé à la fois sur la voie pyruvate-acétyl-CoA et la production de spiramycine (Fig 58b). Ceci est résumé dans le schéma 2.

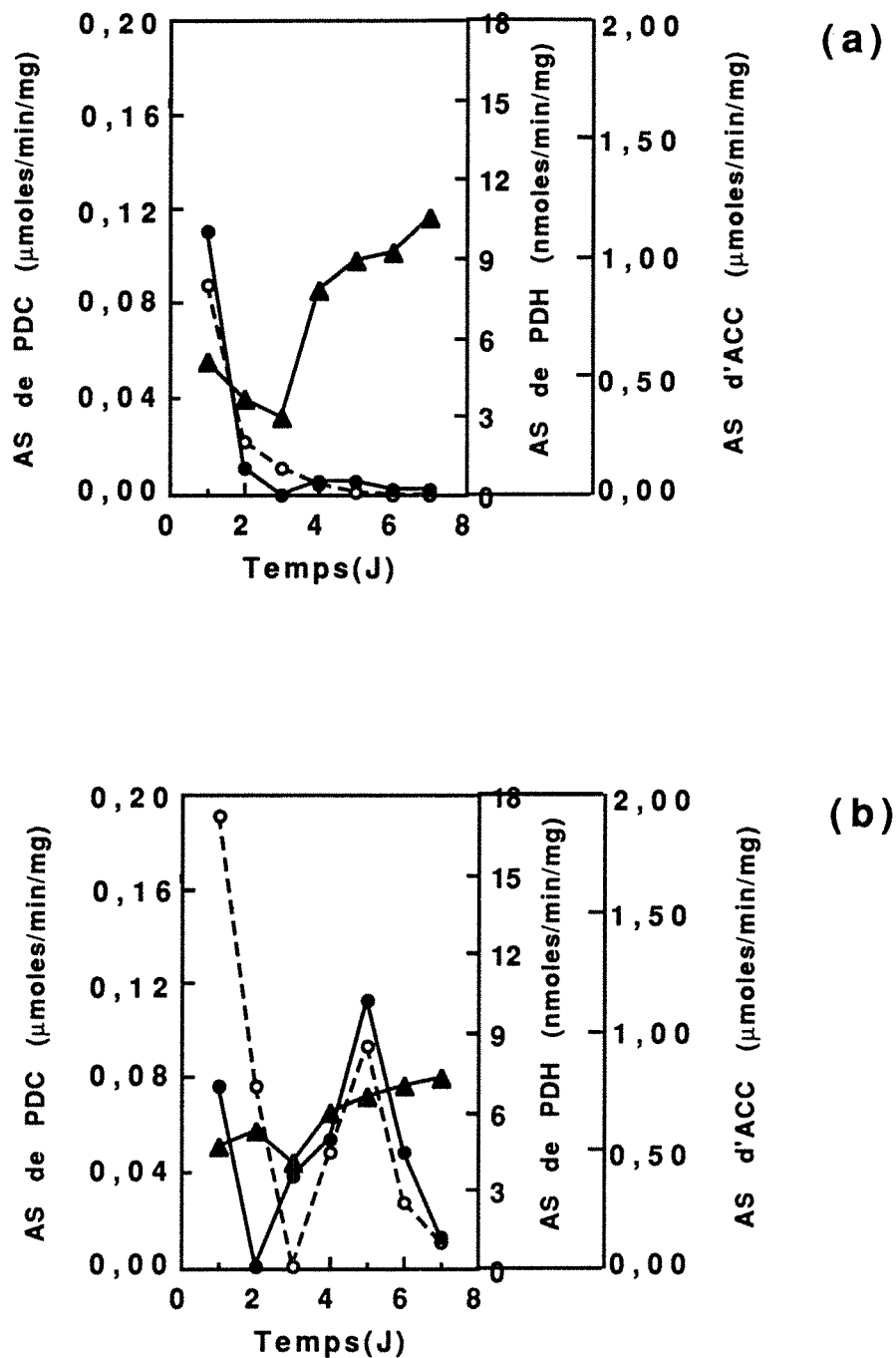


Figure 58 : Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité ACC, PDC et PDH.

Evolution de l'activité spécifique (AS) de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC: ●), de la pyruvate décarboxylase (PDC: ▲) et de la pyruvate déshydrogénase (formation du malonyl-CoA à partir du pyruvate) (PDH: ○) sur le milieu de culture avec 30 g.l^{-1} de dextrines, en présence de NH_4Cl 50 mM (a) et de valine 50 mM (b).

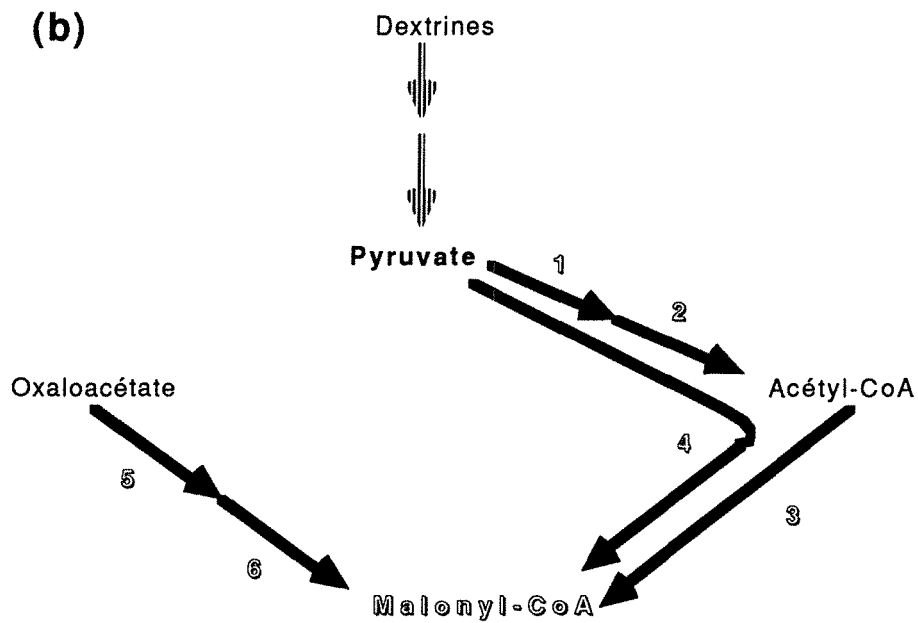
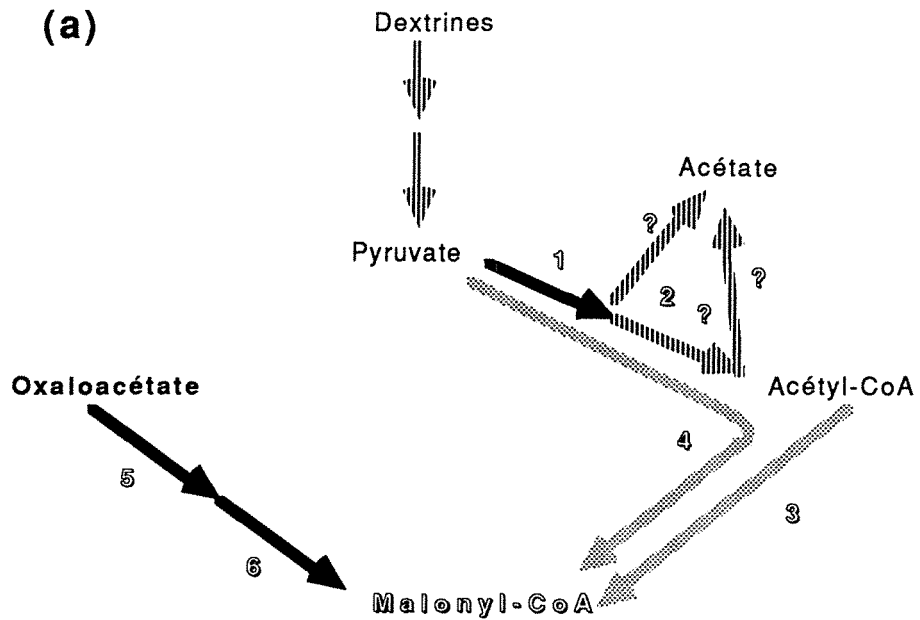


Schéma 2 : Activités productrices de malonyl-CoA en phase stationnaire dans les deux cultures de milieu: (a) = avec NH_4 ou (b) = avec valine

- | | | | | |
|---|--------------------------------|--|----------|---------|
|  | Activité enzymatique constatée | 1 : PDC | 2 : PDH | 3 : ACC |
|  | Activité enzymatique possible | 4 : "PDH" (dosée par notre méthode HPLC) | | |
|  | Activité enzymatique absente | 5 : OADC | 6 : OADH | |

V - CONCLUSION

GENERALE ET

PERSPECTIVES

V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A partir d'unités de base plus diversifiées que celles du métabolisme primaire, peut se construire une variété remarquable de métabolites secondaires dont la spiramycine produite par *Streptomyces ambofaciens*. Ces molécules intermédiaires sont soit issues du métabolisme primaire, soit plus fréquemment modifiées ou synthétisées.

La synthèse de ces molécules peut être soumise à des régulations au niveau enzymatique. Les réactions du métabolisme secondaire sont catalysées par des enzymes participant à l'assemblage des unités de base en structures plus complexes et à la transformation de ces dernières en produits finaux. Fondamentalement, elles possèdent les mêmes caractéristiques que les enzymes du métabolisme primaire: cinétique, régulation d'activité, affinité envers des substrats et inhibiteurs.

Chez *S. ambofaciens*, la formation des précurseurs acyl-thioesters (acétyl-CoA par exemple) par l'intermédiaire du système acyl-kinase (acétate kinase) et leur activation (malonyl-CoA, par exemple, par la carboxylation de l'acétyl-CoA) constitueraient les premières réactions dans la voie de biosynthèse de l'aglycone platénolide qui seraient communes à tous les macrolides.

L'étude de la régulation de l'acétate kinase extraite de cellules ayant poussé sur deux milieux contenant des sources d'azote différentes (chlorure d'ammonium, valine) a montré que cette enzyme présente deux *maxima* d'activité : l'un lors de la phase exponentielle de croissance, l'autre pendant la phase stationnaire, phase coïncidant avec la production de spiramycine.

Le fait que la production de spiramycine soit meilleure sur milieu valine que sur milieu ammonium serait dû à la disponibilité d'acides précurseurs présents dans le milieu et en particulier l'acétate et l'isobutyrate. Cependant, l'évolution de l'activité de l'acétate kinase n'est pas corrélée avec cette production élevée de l'antibiotique sur milieu valine. Ceci pourrait être attribué à une répression par l'ammonium excrété dans le milieu.

Cette étude de la régulation de l'acétate kinase a permis d'apprécier le rôle indispensable de cette enzyme, dans l'activation des acides gras à courtes chaînes, à la fois pour la croissance et la production de l'antibiotique.

La présence de deux *maxima* d'activité et d'une régulation différente de la synthèse de l'enzyme selon les phases de croissance nous a incité à purifier et caractériser partiellement l'enzyme.

Le protocole de purification adopté a permis de purifier l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance de 180 fois et de 96 fois en phase stationnaire.

La comparaison du comportement de l'enzyme issue des deux phases de croissance permettrait de supposer que l'activation des acides gras saturés, pour la croissance et la production de spiramycine chez *S. ambofaciens*, se réaliserait sous contrôle d'un seul équipement enzymatique ; l'acétate kinase. Mais afin de conclure d'une façon plus précise, il serait souhaitable d'approfondir cette étude en utilisant par exemple les moyens suivants :

- améliorer encore le protocole de purification; appuyer la purification par des gels d'électrophorèse; au cours de la chromatographie sur D.E.A.E. Séphacel, utiliser un gradient croissant continu de NaCl entre 0,1 et 0,2 M ;
- préciser la masse moléculaire de l'enzyme au cours des deux phases de croissance ;
- après la purification totale, prévoir un séquençage d'acides aminés en particulier pour approfondir la caractérisation de l'enzyme, surtout au niveau de son site actif

L'étude de la régulation de l'acétyl-CoA carboxylase extraite de deux milieux contenant des sources d'azote différentes a montré une corrélation entre la présence active de l'acétyl-CoA carboxylase sur valine et la production de spiramycine, et par conséquent le rôle important que pourrait jouer l'acétyl-CoA carboxylase dans la biosynthèse de spiramycine chez *S. ambofaciens*.

Pour étudier, caractériser et comparer l'acétyl-CoA carboxylase au cours des deux phases de croissance, une purification partielle en phase exponentielle a d'abord été réalisée et a permis d'enrichir l'extrait enzymatique de 109 fois par rapport à l'extrait brut. Ceci a permis une caractérisation partielle de l'enzyme dont l'étude plus approfondie pourrait avoir lieu après une purification plus poussée et la synthèse de produits témoins permettant d'identifier les produits de réactions de carboxylation.

Le malonyl-CoA constitue une unité de base importante à la fois dans la biosynthèse des acides gras et dans la biosynthèse des polykétides. Or, la carboxylation de l'acétyl-CoA n'est pas la seule voie conduisant au malonyl-CoA. Nous avons montré qu'il existe, chez *S. ambofaciens*, deux voies permettant la formation du malonyl-CoA: voie "pyruvate-acétyl-CoA" et voie "oxaloacétate". Nous avons proposé un modèle qui expliquerait la voie

préférentielle empruntée par la souche selon l'âge de la culture et la source d'azote. Ainsi, sur milieu ammonium la voie oxaloacétate fonctionnerait seule en phase stationnaire pour former le malonyl-CoA. En phase exponentielle, c'est la voie pyruvate qui participerait à cette formation.

L'étude de la régulation de ces deux systèmes enzymatiques et le suivi de l'évolution de leurs activités spécifiques a nécessité préalablement la mise au point d'une technique originale de dosage des activités de ces enzymes, en particulier les déshydrogénases, catalysant des réactions faisant intervenir de dérivés de HS-CoA. Ce dosage peut donc s'effectuer dans de bonnes conditions qualitatives et quantitatives en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Il serait envisageable, à moyen terme, de compléter le schéma donnant les différentes voies de formation du malonyl-CoA, notamment la partie faisant intervenir le phosphoenolpyruvate, et de confirmer notre modèle par utilisation de traceurs isotopiques.

D'autres enzymes intervenant dans la biosynthèse de spiramycine pourraient être étudiées comme en particulier l'isobutyryl-CoA isomérase qui permet la formation du butyryl-CoA par isomérisation de l'isobutyryl-CoA. Il serait important d'étudier, purifier et comprendre le mécanisme de réaction de cette enzyme.

Après l'étude des systèmes d'activation kinase et carboxylase et une meilleure connaissance des voies fournissant les précurseurs acyl-activés nécessaires à la synthèse de la partie aglycone de la spiramycine, il faudrait aborder l'étude du système polykétide synthétase, qui peut avoir des analogies avec celui des acides gras synthétases, étape primordiale dans la biosynthèse du platénolide chez *S. ambofaciens*. D'abord, il faudrait mettre au point la méthode de dosage de système enzymatique *in vitro*, puis d'étudier sa régulation en culture. Ensuite nous essayerons de purifier ce système enzymatique et de le caractériser. Enfin, un certain nombre d'étapes du processus de condensation serait à identifier et à élucider.

VI - REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ♥ Aceti. D. J., Ferry. J. G., (1988). Purification and characterization of acetate kinase from acetate grown *Methanosarcina thermophila*. J. Biol. Chem, **263**, 15444-15448.
- ♥ Alberts. A. W., Vagelos. P. R., (1972). Acyl-CoA carboxylases. In the enzymes (P. Boyer, eds), **VI**, 37-82.
- ♥ Ashy. M. A., Abou-Zeid. A. A., (1982). Fermentative production of spiramycins. Enz. Microb. Technol, **4**, 20-24.
- ♥ Baltz. R. H., Seno. E. T., Stonesifer. J., Wild. G. M., (1983). Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin a preferred pathway from tylactone to tylosin. J. Antibiot, **36**, 131-141.
- ♥ Behal. V., Jechova. V., Vanek. Z., Hostalek. Z., (1977). Alternate pathways of malonyl-CoA formation in *Streptomyces aureofaciens*. Phytochem, **16**, 347-350.
- ♥ Bhuwapathanapun. S., Gray. P. P., (1981). Production of the macrolide antibiotic tylosin in feed-batch culture. J. Ferment. Technol, **95**, 419-421.
- ♥ Brown. T. D. K., (1977). The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Echerichia coli*. J. Gen. Microbiol, **102**, 327-336.
- ♥ Bowman. C. M., Valdez. R. O., Nishimura. J. S., (1976). Acetate kinase from *Veillonella alcalescens*. Regulation of enzyme activity by succinate and substrates. J. Biol. Chem, **251**, 3117-3121.
- ♥ Buckner. J. S., Kolattukudy. P. E., (1975). Lipid biosynthesis in sebaceous glands. Regulation of the synthesis of n- and branched fatty acids by malonyl-coenzyme A decarboxylase. Biochem, **14**, 1768-1773.
- ♥ Cleland. W. W., (1970). In The enzyme (P. D. Boyer, ed). Aca. Press. Orlando. FL, **2**, 1-65.
- ♥ Corcoran. J. W., Chick. M., (1964). Some aspects of the biogenesis of erythromycin A-lactone from propionate and 2-methylmalonate. Antibiot. Congr. Prague. Abstr. Commun. 172.
- ♥ Corcoran. J. W., (1965). Speculation on the origin of macrolide antibiotics. In biogenesis of antibiotic substances. Publ. House Czech. Acad. Sci. Prague. 131-142.
- ♥ Corcoran. J. W., (1971). Erythromycin and bacterial ribosomes: A study of the mechanism of sensitivity and resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in *Bacillus subtilis*. In Macrolides Antibiotics and lincomycin. Univ. Tokyo. Press, **168**, 177-200.
- ♥ Corcoran. J. W., McAlpine. T. S., (1971). Enzymatic O-methylation of erythromycin C as the final step in the biogenesis of erythromycin A. Fed. Proc, **30**, 1168.
- ♥ Corcoran. J. W., (1974). Lipid and macrolide lactone biosynthesis in *S. erythreus*. Dev. Ind. Microbiol, **15**, 93-100.

- ♥ Corcoran. J. W., (1975). S-Adenosylmethionine: Erythromycin C O-methyl-transferase. *Methods. Enzymol*, **43**, 487-498.
- ♥ Corcoran. J. W., (1981). Biochemical mechanisms in the biosynthesis of the erythromycins. In *Antibiotics, IV, Biosynthesis*. (J. W. Corcoran, ed). 132-175.
- ♥ Collins. E. B., Bruhn. J. C., (1970). Roles of acetate and pyruvate in the metabolism of *Streptococcus diacetilactis*. *J. Bacteriol*, **103**, 541-546.
- ♥ D'Agnolo. G., Rosenfeld. I. D., Awaya. J., Omura. S., Vagelos. P. R., (1973). β -ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. *Biochem. Biophys. Acta*, **326**, 155-166.
- ♥ Dann. L. G., Brühn. H.G., (1974). The reaction of diethyl pyrocarbonate with pyruvate kinase. *J. Biochem*, **137**, 405-407.
- ♥ De Spiegeleer. B., Mannens. G., Slegers. G., Van Den Bossche. W., Claeys. A., (1986). Direct assay for phosphotransacetylase and acetyl-coenzyme A carboxylase by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem*, **158**, 195-200.
- ♥ De Spiegeleer. B., Lievens. D., Slegers. G., Van Den Bossche. W., De Moerloose. P., (1988). High-performance thin layer chromatography of short-chain coenzyme A derivatives on silica gel. *J. Planar. Chromat. Modern TLC*, **1**, 146-149.
- ♥ Dumenil. G., Sanglier. J. J., (1989). Physiologie de la production des antibiotiques. In *Biotechnologie des antibiotiques*. Chap,V. (Masson, ed). 195-217.
- ♥ Dutton. M. F., (1988). Enzyme of aflatoxin biosynthesis. *Microbiol. Rev*, **52**, 274-295.
- ♥ Fujimoto. M., Ichikawa. A., Tomiata. K., (1974). Purification and properties of adenosin 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from Baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys*, **161**, 54-63.
- ♥ Furumai. T., Takeda. K., Suzuki. M., (1975). Studies on the biosynthesis of basic 16 membered macrolide antibiotics, platenomycins. IV. *J. Antibiot*, **28**, 789-797.
- ♥ Greenspan. M. D., Macknow. R. C., Omura. S., (1977). The effect of cerulenin on sterol biosynthesis in *saccharomyces cerevesiae*. *Lipid*, **12**, 729-731.
- ♥ Halenz. D. R., Lane. M. D., (1960). Properties and purification of mitochondrial propionyl carboxylase. *J. Biol. Chem*, **235**, 878-884.
- ♥ Higashide. E., (1984). The macrolide properties, biosynthesis and fermentation. Chap, 15. In *Biotechnology of industrial antibiotics*(E. J. Vandamme, ed). 451-509.
- ♥ Hopwood. D. A., Sermonti. G., (1962). The genetics of *Sreptomycetes coelicolor*. *Advan. Genet*, **11**, 273-342.
- ♥ Hunaiti. A. R., Kolattukudy. E. P., (1982). Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomycetes erythreus*. *Arch. Biochem. Biophys*, **216**, 362-371.

- ♥ Hunaiti. A. R., Kolattukudy. E. P., (1984a). Source of methylmalonyl-coenzyme A for erythromycin synthesis: methylmalonyl-CoA mutase from *S. erythreus*. Antimicrob. Agents. Chemother, **25**, 173-178.
- ♥ Hunaiti. A. R., Kolattukudy. E. P., (1984b). Malonyl-CoA decarboxylase from *Streptomyces erythreus*: purification, properties and possible role in the production of erythromycin. Arch. Biochem. Biophys, **229**, 426-439.
- ♥ Hütter. R., Keller-Schierlein. W., Zähler. H., (1961). Zur systematik der Actinomyceten. 6. Die Produzenten von Makrolid-Antibiotika. Arch. Mikrobiol, **39**, 158-194.
- ♥ Jensen. A. L., Darken. M. A., Schultz. J. S., Shay. A. J., (1964). Relomycin: Flasks and tank fermentation studies. Antimicrob. Agents. Chemother, **1963**, 49-53.
- ♥ Jones. N. D., Chaney. M. O., Kirst. H. A., Wild. G. M., Baltz. R. H., Hamill. R. L., Paschal. J. W., (1982). Novel fermentation products from *Streptomyces fradiae*: X-ray crystal structure of 5-O-mycarosyl-tylactone and proof of the absolute configuration of tylosin. J. Antibiot, **35**, 420-425.
- ♥ Khaoua. S., (1990). Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Thèse. INPL. ENSAIA. Nancy.
- ♥ Khaoua. S., Lebrihi. A., Laakel. M., Schneider. F., Germain. P., Lefebvre. G., (1992). Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol, **36**, 763-767.
- ♥ Kitao. C., Ikeda. H., Hamada. H., Omura. S., (1979). Bioconversion and biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics XIII. Regulation of spiramycin I 3-hydroxylacylase formation by glucose, butyrate and cerulenin. J. Antibiot, **32**, 593-599.
- ♥ Kobuke. Y., Yoshida. J. I., (1978). Decarboxylative acylation of thiomalonate, a model for the biosynthesis of fatty acids and polyketides. Tetrahedron. Lett, **4**, 367-370.
- ♥ Larpent. J. P., Sanglier. J. J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques (Masson, ed).
- ♥ Livne. A., Sukenik. A., (1990). Acetyl-coenzyme A carboxylase from the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. Plant Cell Physiol, **31**, 851-858.
- ♥ Lowry. O. H., Rosebrough. N. J., Farr. A. L., Randall. R. J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem, **193**, 265-273.
- ♥ Lubbe. C., Wolfe. S., Demain. A. L., (1985). Repression and inhibition of cephalosporin synthetases in *S. clavuligerus* by inorganic phosphate. Arch. Microbiol, **140**, 317-320.
- ♥ Majerus. P. W., Jacobs. R., Smith. M. B., (1968). The regulation of fatty acid biosynthesis in Rat Hepatomas. J. Biol. Chem, **243**, 2588-3595.
- ♥ Mandal. S. K., Bandyopadhyay. A., Das. K., (1988). Synthesis of erythromycin by resting cells of *S. erythreus*. Indian. J. Experiment. Biol, **2**, 25-27.

- ♥ Mannens. G., Slegers. G., Claeys. A., (1988). Purification and immobilization of acetate kinase from *Desulfovibrio vulgaris*. Biotechnol. Lett, 10, 563-568.
- ♥ Martin. J. R., Perun. T. J., Girolami. R. L., (1966). Studies on the biosynthesis of the erythromycins. I. Isolation and structure of an intermediate glycoside, 3- α -L-mycarosylerythronolide B. Biochem, 5, 2852-2856.
- ♥ Martin. J. R., Egan. R. S., Goldstein. A. W., Collum. D., (1975). Extension of erythromycin biosynthetic pathway. Isolation and structure of erythromycin E. Tetrahedron, 31, 1985-1989.
- ♥ Martin. J. F., Demain. A. L., (1980). Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev, 44, 230-251.
- ♥ Masamune. S., Bates. G. S., Corcoran. J. W., (1977). Macrolides. Recent progress in chemistry and biochemistry. Angew. Chem. (Int. Ed. Engl), 16, 585-607.
- ♥ Mashina. M., Kamiryo. T., Tanaka. A., Fukui. S., Numa. S., (1976). Acetyl-coenzyme-A carboxylase of *Candida lipolytica*. 1. Purification and properties of the enzyme. Eur. J. Biochem, 71, 295-300.
- ♥ Masuma. R., Tanaka. Y., Omura. S., (1983). Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthesis regulation of antibiotic. J. Ferment. Technol, 61, 607-614.
- ♥ McGuire. J. M., Boniece. W. S., Higgins. C. E., Hoehn. M. M., Stark. W. M., Westhead. J., Wolf. R. N., (1961). Tylosin, a new antibiotic: I. Microbiological studies. Antibiot. Chemother, 11, 320-327.
- ♥ Nakajima. H., Suzuki. K., Imahori. K., (1978). Purification and properties of acetate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. J. Biochem, 84, 193-203.
- ♥ Neuzil. J., Hostalek. Z., (1986). Enzymes of secondary metabolism and the biosynthesis of macrolide antibiotics. Folia. Microbiol, 31, 402-421.
- ♥ Ninet. L., Verrier. J., (1960). Production of spiramycin. United States Patent office. 2, 943, 023.
- ♥ Nomura. S., Horiuchi. T., Hata. T., Omura. S., (1972). Inhibition of sterol and fatty acids biosynthesis by cerulenin in cell-free systems of yeast. J. Antibiot, 25, 365.
- ♥ Norwood. D., Bus. C. A., Millington. D. S., (1990). Combined high-performance liquid chromatographic-continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometric analysis of acyl coenzyme A compounds. J. Chromat, 527, 289-301.
- ♥ O'hagan. D., Robinson. J. A., Turner. D. L., (1983). Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin: origin of the oxygen atoms in tylactone. Chem. Soc. Commun, 1337-1340.
- ♥ Oizumi. J., Hayakawa. K., (1990). High-performance liquid chromatographic determination of four kinds of biotin-containing carboxylase. J. Chromat, 529, 55-63.

- ♥ Omura. S., Takeshima. H., (1974). Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin. *J. Biochem*, **75**, 193-195.
- ♥ Omura. S., Nakagawa. A., Takeshima. H., Atsumi. K., Miyazawa. J., Pirou. F., Lukacs. G., (1975a). Biosynthetic studies using ^{13}C enriched precursors of 16 membered macrolide antibiotic leucomycin A₃. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6600-6604.
- ♥ Omura. S., Nakagawa. A., Takeshima. H., Miyazawa. J., Kitao. C., (1975b). A ^{13}C nuclear magnetic study of the 16 membered macrolide antibiotic tylosin. *Tetrahedron. Lett*, **50**, 4503-4506.
- ♥ Omura. S., (1976). The antibiotic cerulenin, a new tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol. Rev*, **40**, 681-697.
- ♥ Omura. S., Takeshima. H., Nakagawa. A., Miyazawa. J., (1976). The biosynthesis of pikromycin using ^{13}C enriched precursors. *J. Antibiot*, **29**, 316-317.
- ♥ Omura. S., Takeshima. H., Nakagawa. A., Miyazawa. J., Pirou. T., Lukacs. G., (1977). Studies on the biosynthesis of 16 membered macrolide antibiotics using carbone-13 magnetic resonance spectroscopy. *Biochem*, **16**, 2860-2866.
- ♥ Omura. S., Kitao. C., Hamada. H., Ikeda. H., (1979a). Bioconversion and biosynthesis of 16 membered macrolide antibiotics. X. Final steps in the biosynthesis of spiramycin, using enzyme inhibitor: Cerulenin. *Chem. Pharm. Bull*, **27**, 176-182.
- ♥ Omura. S., Ikeda. H., Kitao. C., (1979b). Isolation and properties of spiramycin I 3-hydroxylacylase from *S. ambofaciens*. *J. Biochem*, **86**, 1753-1758.
- ♥ Omura. S., Kitao. C., Matsubara. H., (1980). Isolation and characterization of a new 16 membered lactone, protylonolide, from a mutant of tylosin-producing strain, *Streptomyces fradiae*, KA-427. *Chem. Pharm. Bull*, **29**, 1963-1965.
- ♥ Omura. S., Nakagawa. A., (1981). Biosynthesis of 16 membered macrolide antibiotics. In *antibiotics. Biosynthesis.* (J. W. Corcoran. ed), **IV**, 175-192.
- ♥ Omura. S., Sadakane. N., Matsubara. H., (1982). Bioconversion and biosynthesis of 16 membered macrolide antibiotics XXII: Biosynthesis of tylosin after protylonolide formation. *Chem. Pharm. Bull*, **30**, 223-229.
- ♥ Omura. S., Tanaka. Y., (1983). Macrolides. In *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics* (L. C. Vining, ed), Chap, **7**, 179-206.
- ♥ Omura. S., Tanaka. Y., Mamada. H., Masuma. R., (1983). Ammonium ion suppresses the biosynthesis of tylosin aglycone by interference with valine catabolism in *S. fradiae*. *J. Antibiot*, **36**, 1792-1794.
- ♥ Omura. S., Tanaka. Y., Mamada. H., Masuma. R., (1984a). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and aminoacids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot*, **37**, 494-502.

- ♥ Omura. S., Tomoda. H., Yamamoto. S., Tsukui. M., Tanaka. H., (1984b). Studies on two dioxygenases involved in the synthesis of tylosin in *S. fradiae*. Bioch. Biophys. Acta, **802**, 141-147.
- ♥ Pape. H., Brillinger. G., (1973). Stoffwechsel prdukite von Mikroorganismen. 113. Mitt. Biosynthese von Thymidin-diphospho-mycarose durch ein zellfreis System aus *Streptomyces rimosus*. Arch. Mikrobiol, **88**, 25-35.
- ♥ Pinnert-Sindico. S., (1954). Une nouvelle espèce. De *Streptomyces* produtrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp. caractères culturaux. Ann. Inst. Past, **87**, 702-707.
- ♥ Raczynska-Bojanowska. K., Ruczaj. Z., Ostrowska-Krysiak. B., Roszkowski. J., Gaworowska-Michalik. J., Sawnor-Korszynska. D., (1970). Precursors and control in erythromycin biosynthesis. Acta. Microbiol. Pol. Ser B 2, **19**, 103-110.
- ♥ Raczynska-Bojanowska. K., Ruczaj. Z., Sawnor-Korszynska. D., Rafalski. A., (1973). Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. Antimicrob. Agents. Chemother, **3**, 162-167.
- ♥ Raczynska-Bojanowska. K., Rafalski. A., Ostrowska-Krysiak. B., (1976). Carboxylation of propionyl-CoA in erythromycin biosynthesis. Acta. Biochem. Pol, **17**, 331-338.
- ♥ Reed. L. J., Williams. C. R., (1966). Purification and resolution of the pyruvate dehydrogenase complex (*Escherichia coli*). Methods in Enzymology (S. P. Colowick., N. O. Kaplan., eds). Acad. Press. New York, **9**, 247-265.
- ♥ Roberts. G., Leadlay. P. F., (1983). ³H-Tetrahydrocerulenin, a specific reagent for radio-labelling fatty acid synthases and related enzymes. FEBS. Lett, **159**, 13-16.
- ♥ Roberts. G., Leadlay. P. F., (1984). Use of ³H-Tetrahydrocerulenin to assay condensing enzyme activity in *S. erythreus*. Biochem. Soc. Trans, **12**, 642-644.
- ♥ Rossi. A., Corcoran. J. W., (1973). Identification of a multienzyme complex synthesizing fatty acids in the actinomycete *Streptomyces erythreus*. Biochem. Biophys. Res. Commun, **50**, 597-602.
- ♥ Ruczaj. Z., Sawnor-Korszynska. D., Raczynska-Bojanowska. K., (1969). Propionate and acetate kinase in *Streptomyces*. Bull. Acad. Pol. Sci, **17**, 531-533.
- ♥ Schirmer. R. H., Schirmer. I., Noda. L., (1970). Studies on the histidine residues of rabbit muscle myokinase. Biochim. Biophys. Acta, **207**, 165-177.
- ♥ Spizek. J., Chick. M., Corcoran. J. W., (1966). The biogenetic relationship of the erythromycins and the lactone of erythromycin B. Antimicrob. Agents. Chemother, **1965**, 138-143.
- ♥ Stark. W. M., Daily. W. A., Mc Guire. J. M., (1961). A fermentation study of the biosynthesis of tylosin in synthetic media. Sci. Rep. Super. Sanita, **1**, 340-354.
- ♥ Tago. K., Nagano. M., (1970). Mechanism of inhibition of protein synthesis by leucomycin. In Progress in Antimicrob. Antican. Chemother. Univer. Tokyo. Press, **1**, 199-205.

- ♥ Takeshima. H., Kitao. C., Omura. S., (1977). Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin. J. Biochem, **81**, 1127-1132.
- ♥ Tanaka. Y., Taki. A., Masuma. R., (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *S. fradiae*. J. Antibiot, **39**, 813-821.
- ♥ Vance. D., Goldberg. T., Mitsunashi. O., Blah. K., Omura. S., Nomura. S., (1972). Inhibition of fatty acid synthetases by antibiotic cerulenin. Biochem. Biophys. Res. Commun, **48**, 649-656.
- ♥ Vancura. A., Rezanka. A., Basarova. G., (1986). Effect of ammonium ion on the composition of fatty acids in *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. FEMS. Microb. Lett, **48**, 357-360.
- ♥ Vanek. Z., Majer. J., (1967). Macrolide antibiotics. In Antibiotics, II, Biosynthesis (J. W. Corcoran, ed). 154-188.
- ♥ Vazquez. D., (1967). Binding to ribosomes and inhibitory effect on protein synthesis of spiramycin antibiotics. Life. Sci, **6**, 845-853.
- ♥ Vu-Trong. K., Bhuwapathanapun. S., Gray. P. P., (1980). Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: Regulatory role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylosin precursors. Antimicrob. Agents. Chemother, **17**, 519-525.
- ♥ Vu-Trong. K., Bhuwapathanapun. S., Gray. P. P., (1981). Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: Phosphate control of tylosin biosynthesis. Antimicrob. Agents. Chemother, **19**, 209-212.
- ♥ Vu-Trong. K., Gray. P. P., (1987). Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. Enz. Microb. Technol, **9**, 590-593.
- ♥ Wawszkiewicz. E. J., Lynen. F., (1964). Propionyl-CoA dependent $H^{14}CO_3$ -exchange into methylmalonyl-CoA in extracts of *Streptomyces erythreus*. Biochem. Z, **340**, 213-227.
- ♥ Weete. J. D., (1980). Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum Press, New York. Chap, 4.
- ♥ White. A., Handler. P., Smith. E. L., Lehman. I. R., (1978). Principles of biochemistry. (McGraw-Hill, ed, New York). Caps 12, 14, 17.
- ♥ Woodward. R. B., (1957). Struktur und Biogenese der Makrolide. Eine neue Klasse von Naturstoffen. Angew. Chem, **69**, 50-58.

Figures	Titres	Pages
1	Structure chimique de la spiramycine	11
2	Articulation entre les métabolismes primaire et secondaire	13
3	Catabolisme de la valine de la leucine et de l'isoleucine.	14
4	Voies globales de la synthèse du platénolide	16
5	Représentation d'une colonie de <i>Streptomyces</i> poussant sur un milieu gélosé	19
6	Classification des macrolides à 16 membres basée sur la nature du noyau lactonique	22
7	Structure chimiques des principales érythromycines, macrolides à 14 membres	25
8	Voies de biosynthèse de l'érythromycine	26
9	Structure chimique de la tylosine	29
10	Biosynthèse de la tylosine par <i>Streptomyces fradiae</i> KA-427 et les mutants co-synthétiques 261 et NP-10	30
11	Voies de biosynthèse de la tylosine	31
12	Voie préférentielle de la conversion de la tylactone en tylosine	33
13	Voies de biosynthèse de spiramysine	35
14	Origine de la structure du platénolide (noyau lactonique = aglycone)	36
15	Incorporation du propionate et du 2-méthylmalonate marqués, dans l'érythronolide synthétisé par <i>S.</i> <i>erythreus</i>	40
16	Biosynthèse du palmitate	40
17	Cible de l'inhibition par la céruléine	42
18	Premières étapes de la biosynthèse de l'érythromycine.	43
19	Mécanisme d'action de l'érythronolide synthétase de <i>S</i> <i>erythreus</i>	44
20	Incorporation des précurseurs au niveau de l'aglycone par l'intermédiaire de certaines enzymes clés	46
21	Effet de l'ammonium et de la valine sur la production de spiramycine	67
22	Consommation et présence d'ammonium dans le milieu extracellulaire	68
23	Présence d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu extracellulaire	70
24	Présence d'acides gras à courtes chaînes dans le milieu extracellulaire	71
25	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité acétate kinase	73
26	Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur la production de spiramycine	75
27	Consommation et présence de l'ammonium dans le milieu	76
28	Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité acétate kinase.....	78
29	Filtration sur gel de Séphacryl S-200 (gamme de fractionnement : (5000-250000) de l'acétate kinase de <i>S.ambofaciens</i> en phase exponentielle de croissance	82

30	Chromatographie sur colonne D.E.A.E. Séphacel: activité acétate kinase de <i>S. ambofaciens</i> en phase exponentielle de croissance	83
31	Effet de la concentration du complexe ATP-Mg ²⁺ sur l'activité acétate kinase	91
32	Effet de la température sur l'activité de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance	91
33	Mécanisme réactionnel de l'acétate kinase	95
34	Représentation schématique linéaire de la réaction de l'acétate.kinase	96
35	Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC)	112
36	Formation du malonyl-CoA en fonction du temps d'incubation de la réaction de l'acétyl-CoA carboxylase..	113
37	Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase.	114
38	Profils d'élution du milieu réactionnel de l'acétyl-CoA carboxylase	115
39	Profils d'élution du milieu réactionnel de l'oxaloacétate déshydrogénase (OADH)	118
40	Profils d'élution du milieu réactionnel de la pyruvate déshydrogénase (PDH)	119
41	Profils d'élution du milieu réactionnel de la céto-isovalérate déshydrogénase (CIVDH)	120
42	Chromatographie sur couche mince de silice avec le système éluant acide	123
43	Chromatographie sur couche mince de silice avec le système éluant basique	124
44	Chromatogramme en trois dimensions (spectres en vol) (A) et spectre UV à un temps de rétention de 15,223 min (B) du témoin HS-CoA commercial	125
45	Chromatogramme en trois dimensions (spectres en vol) (A) et spectres UV à un temps de rétention de 13,159 min (B) du témoin Malonyl-CoA commercial.	126
46	Analyse de la pureté du malonyl-CoA par mesure des spectres UV à différentes régions du pic (Colonne Colosil C ₁₈)	128
47	Analyse de la pureté du malonyl-CoA par le rapport des spectres UV.....	129
48	Analyse spectrale du chromatogramme de la réaction de l'oxaloacétate déshydrogénase; identification du malonyl-CoA.....	130 et 131
49	Analyse spectrale du chromatogramme du témoin de la réaction de l'oxaloacétate déshydrogénase	132
50	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité acétyl-CoA carboxylase	137
51	Effet de l'ajout des acides gras à courtes chaînes sur l'activité acétyl-CoA carboxylase	139
52	Effet du citrate sur l'activité acétyl-CoA carboxylase	144
53	Effet de la température sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase	147
54	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité pyruvate décarboxylase (PDC)	149
55	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité pyruvate déshydrogénase (PDH = formation du malonyl-CoA à partir du pyruvate)	150

56	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité oxaloacétate décarboxylase (OADC)	152
57	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité oxaloacétate déshydrogénase (OADH)	154
58	Effet de l'ammonium et de la valine sur l'activité ACC, PDC et PDH	161
Schéma 1	Biosynthèse de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA.	109
Schéma 2	Activités productrices de malonyl-CoA en phase stationnaire dans les deux cultures de milieu : (a) = avec NH ₄ ou (b) = avec valine	162
Tableaux	Titres	Pages
1	Etapes de purification partielle de l'acétate kinase synthétisé par <i>S. ambofaciens</i> en phase exponentielle de croissance	84
2	Spécificité de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance	86
3	Paramètres cinétiques de l'acétate kinase en phase exponentielle de croissance	88
4	Effet de certains cations divalents sur l'activité acétate kinase en présence du complexe du complexe ATP-Mg ²⁺	89
5	Effet de certains réactifs sur l'activité de l'acétate kinase	92
6	Etapes de purification partielle de l'acétate kinase synthétisée par <i>S. ambofaciens</i> en phase stationnaire de croissance	99
7	Paramètres cinétiques de l'acétate kinase en phase stationnaire de croissance	101
8	Temps de réaction (Tr) de malonyl-CoA, HS-CoA et acétyl-CoA selon les types de colonnes et les conditions d'élution	117
9	Effets de certains facteurs stabilisateurs de l'ACC à +4°C et à -20°C	135
10	Etapes de purification partielle de l'acétyl-CoA carboxylase synthétisée par <i>S. ambofaciens</i> en phase exponentielle de croissance.....	141
11	Paramètres de l'acétyl-CoA carboxylase en phase exponentielle de croissance	142
12	Effet des cations monovalents sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase de <i>S. ambofaciens</i>	145
13	Comparaison de K _m des principaux substrats des carboxylases d'origines différentes	158

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DUMENIL Gérard, Professeur, Faculté de Pharmacie Marseille,
Monsieur SANGLIER J.Jacques, Chargé de Cours, SANDOZ S.A. BALE (Suisse).**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur LAAKEL Mohamed

**à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse
intitulée :**

**"Biosynthèse de la spiramycine par streptomyces ambofaciens : régulation de la
biosynthèse et caractérisation de l'acétate kinase et des systèmes fournisseurs du
malonyl-CoA"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"



Fait à Vandoeuvre le, 18 Juin 1992

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. GANTOIS

**Pour la Présidente
Le Vice-Président
M. MARTIN**

RÉSUMÉ

Ce travail se situe dans le cadre d'études sur les relations entre métabolisme primaire et secondaire chez *Streptomyces ambofaciens*, producteur de spiramycine.

L'étude de certains aspects de la régulation de l'acétate kinase a été réalisée. La présence de certains acides gras à courtes chaînes au cours de la croissance stimule la production de spiramycine, la nature de la source d'azote pouvant contrôler cette production par l'intermédiaire de ces précurseurs acides. La biosynthèse de l'acétate kinase en phase stationnaire est sensible à l'ajout d'acides gras dans le milieu. Elle n'est pas contrôlée par la nature de la source d'azote. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée partiellement pendant les deux phases de croissance.

Une méthode de dosage des activités enzymatiques impliquant les acyl-CoA a été mise au point (HPLC). Cette méthode a permis l'identification des différentes voies conduisant au malonyl-CoA, intermédiaire commun à la biosynthèse des acides gras et de l'antibiotique.

L'acétyl-CoA carboxylase a été étudiée. Au cours de la croissance, sa présence dépend de la source d'azote utilisée : son activité est très faible en phase stationnaire sur milieu avec ammonium, alors qu'elle est beaucoup plus élevée sur milieu avec valine. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée partiellement.

La régulation de la pyruvate déshydrogénase et de l'oxaloacétate déshydrogénase par la source d'azote (ammonium ou valine) a été analysée. Sur milieu avec valine, en phase stationnaire, cette étude conduit à montrer que la synthèse de malonyl-CoA, passe par l'acétyl-CoA, produit à partir de pyruvate ou d'acétate, et carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase. Sur milieu avec ammonium, pendant la phase stationnaire, la synthèse de malonyl-CoA est due uniquement à l'activité de l'oxaloacétate déshydrogénase.

MOTS CLES : *Streptomyces ambofaciens*, spiramycine, régulation, kinase, carboxylase, déshydrogénase, malonyl-CoA, HPLC.

SUMMARY

This work situates within the studies on the relations between primary and secondary metabolisms with *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin.

The study of certain aspects of the regulation of acetate kinase was realized. The presence of certain short-chain fatty acids during the growth stimulates the production of spiramycin, the nitrogen source's nature allowing to regulate this production by the intermediate of these acids precursor. The biosynthesis of acetate kinase in stationary phase is sensitive to the addition of fatty acids in the medium. It is not regulated by the nature of nitrogen source. This enzyme was partially purified and characterized during the two phases of growth.

A method of dosage of the enzymatic activities implying the acyl-CoA was settled (HPLC). This method was allowed the identification of different ways leading to malonyl-CoA, common intermediate of the biosynthesis of fatty acids and antibiotic.

The acyl-CoA carboxylase was studied. During the growth, his presence depends on the used nitrogen source : his activity is very weak in stationary phase on medium with ammonium, when it is much raised on medium with valine. This enzyme was partially purified and characterized.

The regulation of pyruvate dehydrogenase and oxaloacetate dehydrogenase by nitrogen source (ammonium or valine) was analysed. On the medium with valine, in stationary phase, this studies reads to show that the synthesis of malonyl-CoA, go through the acetyl-CoA, produce from pyruvate or acetate, and carboxylated by the acetyl-CoA carboxylase. On medium with ammonium, during the stationary phase, the malonyl-CoA synthesis is exclusively due to the activity of oxaloacetate dehydrogenase.

KEY-WORDS : *Streptomyces ambofaciens*, spiramycin, regulation, kinase, carboxylase, dehydrogenase, malonyl-CoA, HPLC.