



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>

96 INPLOG N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

THESE

présentée par

Anissa LOUNES

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

sujet :

**REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA SPIRAMYCINE CHEZ
STREPTOMYCES AMBOFACIENS PAR LES SOURCES AZOTEES,
CARBONEES ET LES IONS PHOSPHATE**

CONTROLE DU CATABOLISME DE LA VALINE

Soutenue publiquement le 3 JUIN 1994 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président :

M^r P. GERMAIN, Professeur à l'ENSAIA-INPL

Rapporteurs :

M^r C. DIVIES, Professeur à l'ENSBANA-Dijon

M. LEBEAULT, Professeur à l'UT-Compiègne

LEFEBVRE, Professeur à l'ENSAIA-INPL

LEBRIHI, Maître de conférences à l'ENSAIA-INPL

M^r L. LOUVEL, Chercheur à Rhône-Poulenc Rorer-Vitry-sur-Seine



D 136 001188 4

136 00 11 884

9h INPL 066N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire

THESE

présentée par

Anissa LOUNES

BIU NANCY

Service Commun de Documentation

INPL

2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

sujet :

[M] 1994 LOUNES, A.

**REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA SPIRAMYCINE CHEZ
STREPTOMYCES AMBOFACIENS PAR LES SOURCES AZOTEES,
CARBONEES ET LES IONS PHOSPHATE**

CONTROLE DU CATABOLISME DE LA VALINE

Soutenue publiquement le 3 JUIN 1994 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président :

M^r P. GERMAIN, Professeur à l'ENSAIA-INPL

Rapporteurs :

M^r C. DIVIES, Professeur à l'ENSBANA-Dijon

M^r J. M. LEBEAULT, Professeur à l'UT-Compiègne

Examineurs :

M^r G. LEFEBVRE, Professeur à l'ENSAIA-INPL

M^r A. LEBRIHI, Maître de conférences à l'ENSAIA-INPL

M^r L. LOUVEL, Chercheur à Rhône-Poulenc Rorer-Vitry-sur-Seine

À mes très chers parents,

qui ont non seulement su m'offrir le désir d'apprendre mais m'ont aussi permis grâce à leur amour, confiance, compréhension et encouragements..., qui n'ont à aucun moment fait défaut, d'aller toujours plus loin sans jamais s'en lasser.

À Nedjma et Fadila

À Nora, Mourad, Lilia et Nassim

À Karim, Houria et Sarah

À Arézki et Faïza

pour leur soutien qui m'a été fort précieux

À Dada Omar pour sa bonté

*À Nedjmo, Naïma et Zahir pour leur amitié, leur accueil
chaleureux et leur grande gentillesse*

J'adresse à tous un grand merci pour tout.

Je dédie affectueusement cette thèse.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Industrielle de l'ENSAIA (INPL) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Pierre GERMAIN. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il a su à la fois me laisser toute initiative et rester disponible pour me faire profiter de l'étendue de sa culture et la profondeur de ses idées tout au long de ma formation doctorale. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude pour les nombreux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer et la patience avec laquelle nous avons mené la rédaction de ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Gérard LEFEBVRE, Directeur du laboratoire de Microbiologie Alimentaire pour la qualité de son accueil et d'avoir bien voulu juger ce travail. A travers les conseils qu'il m'a prodigué au cours de cette thèse, j'ai apprécié sa compétence.

Je remercie Monsieur Charles DIVIES, Professeur à l'ENSBANA de Dijon et Monsieur Jean-Michel LEBEAULT, Professeur à l'UT de Compiègne, rapporteurs de cette thèse qui m'ont fait le grand honneur de bien vouloir juger mon travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur Luc LOUVEL, Chercheur à Rhône-Poulenc Rorer, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Monsieur Ahmed LEBRIHI, Maître de conférences, pour sa précieuse collaboration dans ce travail, son appui et ses nombreux conseils pratiques. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Professeur G. LINDEN, Directeur du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université de Nancy 1, pour m'avoir admis dans son laboratoire afin de réaliser la dernière partie de ce travail. Dans ce cadre, je tiens à remercier tout particulièrement les Dr Hayette LOUAILECHE et Humberto GONZALES pour m'avoir si aimablement initiée aux techniques de dosage de l'ATP et d'électrophorèse.

Je remercie le Dr D. Pichon (Laboratoire des Sciences du Génie Chimique), dont la collaboration m'a permis de découvrir les techniques d'analyse d'image.

J'adresse également mes vives remerciements à Madame J. MARCHAL, technicienne du laboratoire de Microbiologie Industrielle, Madame M. GAILLARD ainsi que le personnel de la bibliothèque de l'ENSAIA pour leur gentillesse.

Je remercie la Société Rhône-Poulenc Santé qui a gracieusement fourni au laboratoire des souches de microorganismes nécessaires à ce travail ainsi que les échantillons de spiramycine.

Je tiens à remercier tout particulièrement, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Gouvernement Algérien qui m'a octroyé une bourse durant mes années d'étude en France, ainsi que tous les enseignants qui m'ont prodigué tant de connaissances durant toute ma scolarité. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute considération.

Je ne saurais oublier tous mes collègues de laboratoire et le personnel du laboratoire de Microbiologie Industrielle et Alimentaire pour leur sympathie : Abdel-Madjid, Anne, Aung, Aziz, Aziza, Catie, Chouki, Farid, Fatima, Fatima-Zohra, Florence, François, Jean-François, Jean-Michel, Nadji, Nassr-Eddine, Nora, Ouafae, Pierre-Jean, Regis, Sophie, Valérie...

Je ne sais pas si j'arriverais à remercier assez mes amis (es), Abdel-Madjid, Afaf, Anissa, Chouki, Farid, Djouher, Fatima, Fatima-Zohra, Karim, Nabila, Nacéra, Nadji, Naïma, Nora, Nouria, Oum-Bilal, Pascal, Sanaa, Souham, Sultana, Yamina, Youssr,... Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié la plus sincère.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer à Nancy.

ABBREVIATIONS

ACP	: acyl carrier protein
ACV	: delta-(L-alpha-aminoadipyl-L-cystéinyl-D-valine)
ADP	: adénosine diphosphate
AMP	: adénosine 3',5'monophosphate
AMPc	: 3',5'-AMPcyclique
AS	: activité spécifique
ATP	: adénosine 5'-triphosphate
B.	: <i>Bacillus</i>
CIVDH	: cétoisovalérate déshydrogénase
C _n	: unité moléculaire à n atomes de carbone
CNP	: cellules non proliférantes
CoA	: coenzyme A
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
DMSO	: diméthylsulfoxyde
dTDP	: désoxy-thymidine diphosphate
DTT	: 1,4-dithio-DL-thréitol
EDTA	: acide éthylènediaminetétracétique
h	: heure
HPLC	: chromatographie liquide à haute pression
μ	: vitesse spécifique de croissance (ou taux de croissance)
max	: maximum
min	: minimum
min	: minute
μl	: microlitre
mM	: millimolaires
MOPS	: acide morpholinopropane sulfonique
MS	: matière sèche
NAD ⁺	: nicotinamide dinucléotide oxydée
NADH	: nicotinamide dinucléotide réduite
nm	: nanomètre
NTP	: nucléotide triphosphate
ORL	: oto-rhino-laryngologie
PABA	: acide para-amino benzoïque
PEP	: phospho-énol-pyruvate
PKS	: polykétide synthétase
ppGpp	: guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate
pppGpp	: guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate
prot	: protéine

PTA	: phosphoacétyl-transférase
q.s.p.	: quantité suffisante pour
Q _{dex}	: vitesse spécifique de consommation des dextrines (ou quotient métabolique)
Q _{glc}	: vitesse spécifique de consommation du glucose
Q _{gly}	: vitesse spécifique de consommation du glycérol
Q _{isobutyrate assimilation}	: vitesse spécifique de consommation de l'isobutyrate
Q _{isobutyrate production}	: vitesse spécifique de production de l'isobutyrate
Q _{NH₄Cl}	: vitesse spécifique de consommation du chlorure d'ammonium
Q _{spira}	: vitesse spécifique de production de spiramycine
Q _{val}	: vitesse spécifique de consommation de la valine
rpm	: rotation par minute
s	: seconde
<i>S.</i>	: <i>Streptomyces</i>
SDS	: sodium-dodécyl-sulfate
TCA	: acide trichloroacétique
TEMED	: N, N, N', N'-tétra-méthyléthylènediamine
VDH	: valine déshydrogénase
Y _{spira}	: rendement global de production en spiramycine (production volumétrique maximale de spiramycine/biomasse maximale)
[]	: concentration

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE1

Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	6
I. Présentation du métabolisme secondaire	8
I. 1. Définitions	8
I. 2. Voies de biosynthèse	10
I. 3. Génétique	12
I. 4. Résistance aux antibiotiques	13
II. Obtention de la spiramycine par fermentation	14
II. 1. Présentation du microorganisme producteur	14
II. 2. Procédé de fermentation	16
III. La spiramycine	18
III. 1. Classification	18
III. 2. Relation activité-structure	18
III. 3. Spectre d'action	18
III. 4. Mode d'action	19
III. 5. Resorption	19
III. 6. Place des macrolides en thérapeutique	19
III. 7. Toxicité et effets indésirables	20
III. 8. Résistance	20
IV. Biosynthèse des macrolides	21
IV. 1. Généralités	21
IV. 2. Biosynthèse de la tylosine	23
IV. 2. 1. Formation du protylonolide	23
IV. 2. 2. Conversion du protylonolide en tylosine	23
IV. 3. Biosynthèse de la spiramycine	26
IV. 3. 1. Biosynthèse du platénolide	26
IV. 3. 2. Conversion du platénolide en spiramycine	27
IV. 4. Origine des précurseurs	27
IV. 4. 1. Origine de l'acétate, du propionate et du butyrate	28

IV. 4. 1. 1. Substrat glucidique	28
VI. 4. 1. 2. Substrat aminé	29
VI. 4. 1. 3. Substrat lipidique	30
IV. 4. 2. Activation enzymatique des acides gras à courtes chaînes	31
IV. 4. 2. 1. Activation des acides acétique et propionique	31
IV. 4. 2. 2. Origine des unités malonyl-CoA, méthylmalonyl-CoA et éthylmalonyl-CoA	31
IV. 4. 3. Condensation des acyl-CoA	33
IV. 4. 4. Résidus glucidiques	34
V. Mécanismes généraux de régulation du métabolisme secondaire	35
V. 1. Initiation de la biosynthèse	35
V. 1. 1. Facteurs physico-chimiques	35
V. 1. 2. Inoculum	36
V. 1. 3. Facteurs nutritionnels	37
V. 1. 3. 1. Source de carbone	37
V. 1. 3. 2. Source d'azote	39
V. 1. 3. 3. Source de phosphate	41
V. 1. 3. 4. Autres sels inorganiques	48
V. 1. 3. 5. Oligoéléments	49
V. 1. 4. Taux de croissance	49
V. 1. 5. Facteurs d'induction de la biosynthèse des antibiotiques chez les Actinomycètes	50
V. 2. Arrêt de la biosynthèse	52
V. 2. 1. Dénaturation des enzymes	52
V. 2. 2. Rétroinhibition	52
CONCLUSION	53

Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES

I. Matériels	54
I. 1. Souches bactériennes	54
I. 2. Appareils	54
I. 3. Liste des produits	55
I. 4. Milieux	56
I. 4. 1. Milieu de sporulation	56
I. 4. 1. 1. Milieu de sporulation de <i>S. ambofaciens</i>	56
I. 4. 1. 2. Milieu de sporulation de <i>B. subtilis</i>	56
I. 4. 2. Milieu de culture	56
I. 4. 2. 1. Milieu de préculture	56
I. 4. 2. 2. Milieu synthétique de base	57
I. 4. 2. 3. Milieu de croissance de <i>B. subtilis</i>	57
I. 5. Stérilisation des milieux de culture	57
II. Méthodes	58
II. 1. Méthodes de conservation des souches	58
II. 1. 1. Conservation de <i>S. ambofaciens</i>	58
II. 1. 2. Conservation de <i>B. subtilis</i>	58
II. 2. Conduite des cultures	58
II. 2. 1. Propagation de <i>S. ambofaciens</i> en milieu liquide : préculture	58
II. 2. 2. Culture de <i>S. ambofaciens</i>	58
II. 2. 2. 1. Cultures en fioles d'Erlenmeyer	59
II. 2. 2. 2. Cultures en fermenteur	59
II. 3. Isolement d'un mutant de <i>B. subtilis</i> résistant à la streptomycine	59
II. 4. Préparation des cellules non proliférantes	60
II. 5. Méthodes analytiques	60
II. 5. 1. Estimation de la biomasse	60
II. 5. 2. Dosage de l'ADN	61
II. 5. 3. Dosage de l'ARN	62
II. 5. 4. Dosage de l'ATP	63

II. 5. 5. Dosage des substrats	65
II. 5. 5. 1. Carbonés	65
II. 5. 5. 2. Azotés	68
II. 5. 5. 3. Dosage des ions phosphate	70
II. 5. 6. Dosage de la spiramycine	72
II. 5. 6. 1. Dosage antibiographique	72
II. 5. 6. 2. Dosage par HPLC	73
II. 5. 7. Dosage des acides gras à courtes et moyennes chaînes	74
II. 6. Détermination des activités enzymatiques	75
II. 6. 1. Préparation des extraits acellulaires	75
II. 6. 2. Dosage de l'activité valine déshydrogénase (VDH)	75
II. 6. 3. Dosage de l'activité cétoisovalérate déshydrogénase (CIVDH)	76
II. 6. 4. Dosage des activités phosphatases alcalines	78
II. 7. Dosage des protéines	79
II. 8. Electrophorèse des protéines solubles	80
II. 9. Détermination des paramètres cinétiques et des rendements des fermentations	82
II. 9. 1. Fermentations en fioles d'Erlenmeyer	82
II. 9. 2. Fermentations en réacteur	83
II. 9. 2. 1. En discontinu	83
II. 9. 2. 2. En semi-continu	83

Chapitre 3 : RESULTATS

Partie III. 1. Effet de la valine et des ions ammonium sur la production de spiramycine

	84
INTRODUCTION	
RESULTATS	85
1. Comparaison des effets de deux sources d'azote sur la croissance de <i>S. ambofaciens</i> et la production de spiramycine	85
2. Origine de l'acétate et de l'isobutyrate	87
3. Effet de concentrations croissantes de valine sur la production de spiramycine et le développement de <i>S. ambofaciens</i>	92
4. Influence de la chélation des ions ammonium sur la production de spiramycine	96
5. Effet de l'addition d'ions ammonium sur la production de spiramycine par <i>S. ambofaciens</i>	98
6. Influence de l'effet stimulateur de l'isobutyrate, en présence d'un excès ou d'une limitation d'ammonium, sur la production de spiramycine	100
DISCUSSION	102

Partie III. 2. Effet des sources carbonées et des ions phosphate sur la production de spiramycine

INTRODUCTION	104
RESULTATS	105
1. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de spiramycine sur trois sources de carbone différentes	105
2. Effet de concentrations croissantes de glycérol ou de glucose sur la croissance et la production de spiramycine	108
2. 1. Effet de la concentration initiale du glycérol ou du glucose sur la croissance et la production de spiramycine	111

2. 2. Effet de l'addition de différentes concentrations de glycérol et de glucose en fin de phase exponentielle de croissance, sur la croissance et la production de spiramycine	111
3. Détermination de la nature de l'effet de la source carbonée	113
3. 1. Effet du temps d'addition du glycérol ou du glucose sur la production de spiramycine	113
3. 2. Comparaison de l'effet du temps d'ajout du glycérol et de la streptomycine sur la production de la spiramycine	116
3. 3. Suppression de la production de spiramycine par le glycérol dans le système de cellules non proliférantes	118
4. Effet du glucose et de ses analogues (le 2-désoxy-D-glucose et le 3-O-méthyl-D-glucose), sur la production de la spiramycine	120
5. Effet des ions phosphate sur les productions de biomasse et de spiramycine	122
5. 1. Effet des différentes concentrations initiales des ions phosphate sur les productions de biomasse et de spiramycine	122
5. 2. Effet du temps d'ajout des ions phosphate sur la production de spiramycine	123
6. Effet de la source énergétique et des ions phosphate sur la concentration intracellulaire d'ATP et la production de spiramycine	124
6. 1. Comparaison de la concentration d'ATP dans des cultures avec les dextrines ou le glycérol comme source de carbone	124
6. 2. Comparaison de la concentration d'ATP dans les cultures à faible et à forte concentration en phosphate	125
7. Quelques niveaux d'action des ions phosphate	127
7. 1. Comparaison des productions de biomasse, de spiramycine, des teneurs en ADN, en ARN et de biosynthèse des protéines intracellulaires dans des cultures en présence d'une faible ou d'une forte concentration en ions phosphate	127
7. 2. Biosynthèse de la VDH en présence d'une faible ou d'une forte concentration de phosphate	129
7. 3. Biosynthèse des phosphatases alcalines intracellulaires et extracellulaires en présence d'une faible ou d'une forte concentration de phosphate	130
DISCUSSION	131

Partie III. 3. Production de spiramycine en cultures semi-continues à ammonium et source carbonée contrôlés

INTRODUCTION	134
RESULTATS	135
1. Caractéristiques de croissance et de production de spiramycine d'une fermentation batch sur un milieu synthétique de base avec 10 g. l ⁻¹ de glycérol et 20 mM de NH ₄ Cl	135
2. Caractéristiques de croissance et de production de spiramycine de fermentations fed-batch avec alimentation continue à débit constant	137
2. 1. Alimentation continue de 40 g. l ⁻¹ de glycérol et 180 mM d'ammonium avec un débit de 19 ml. h ⁻¹	137
2. 2. Alimentation continue de 40 g. l ⁻¹ de glycérol et 66 mM d'ammonium avec un débit de 19 ml. h ⁻¹	141
2. 3. Alimentation continue de 25 g. l ⁻¹ de glycérol et 100 mM d'ammonium avec un débit de 27 ml. h ⁻¹	144
DISCUSSION	147

Partie III. 4. Régulation par les sources azotées et carbonées de deux enzymes du catabolisme de la valine : la valine déshydrogénase et la cétoisovalérate déshydrogénase

INTRODUCTION	149
RESULTATS	153
1. Effet des sources azotées sur la croissance et la production de spiramycine	153
2. Effet des sources carbonées sur la croissance et la production de spiramycine	156
3. Effet des sources azotées sur les biosynthèses de la VDH et de la CIVDH	156
4. Effet des sources carbonées sur les biosynthèses de la VDH et de la CIVDH	158
DISCUSSION	160

5. Effet des pulses d'ammonium et de valine sur la croissance et les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH	161
6. Effet du pulse de glycérol sur la croissance et les biosynthèses de la spiramycine, la VDH et la CIVDH	163
<i>DISCUSSION</i>	167
DISCUSSION GENERALE	168

Partie III. 5. Comparaison des profils électrophorétiques des protéines cellulaires totales dans les milieux favorables et défavorables à la production de spiramycine

INTRODUCTION	172
RESULTATS	173
1. Comparaison de l'évolution des profils électrophorétiques des protéines solubles de <i>S. ambofaciens</i> dans le milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l ⁻¹ et la valine à 25 mM (milieu producteur = milieu témoin n°1) et après additions de 100 mM d'ions ammonium ou 60 g. l ⁻¹ de glycérol à 12 h (milieux non producteurs de spiramycine)	173
2. Comparaison de l'évolution des profils électrophorétiques des protéines solubles de <i>S. ambofaciens</i> dans les milieux synthétiques de base contenant le glycérol à 10 g. l ⁻¹ et la valine à 50 mM en présence de 14 mM (milieu producteur de spiramycine = milieu témoin n°2) ou 100 mM d'ions phosphate (milieu non producteur de spiramycine)	173
DISCUSSION	178

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	180
-------------------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	184
-----------------------------	-----

Annexe : Suivi de l'évolution morphologique de *S. ambofaciens*, au cours d'une fermentation, par analyse quantitative d'images

INTRODUCTION	199
METHODE D'ANALYSE D'IMAGE	201
1. Acquisition des images	201
2. Analyse des images	201
RESULTATS	203
1. Ensemencement par préculture	203
1. 1. Milieu contenant la valine comme source d'azote (milieu producteur)	203
1. 1. 1. Contribution de chaque classe morphologique à la biomasse	204
1. 1. 2. Représentation de la fréquence en nombre de chaque classe	205
1. 1. 3. Evolution de l'aire moyenne des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupée par le noyau	206
1. 1. 4. Classification des individus en fonction du degré d'enchevêtrement	207
1. 1. 5. Résumé	208
1. 2. Milieu contenant l'ammonium comme source d'azote ("milieu non producteur")	213
1. 3. Comparaison des évolutions morphologiques sur les deux milieux	211
2. Ensemencement avec des spores	214
DISCUSSION	219
REFERENCES	220

COMMUNICATIONS

INTRODUCTION GENERALE

Les métabolites secondaires, dont les antibiotiques synthétisés par les microorganismes, sont produits par les souches sauvages en faible quantité. Pour augmenter leurs productions, deux approches sont utilisées : d'une part, l'optimisation du procédé de fermentation (composition du milieu, conditions physico-chimiques...), d'autre part la sélection de souches mutées à production améliorée.

Historiquement l'une et l'autre des approches ont été utilisées en parallèle sans se fonder initialement sur des connaissances physiologiques importantes. La recherche de meilleures conditions opératoires reposait sur le principe de la "boîte noire", la sélection de souches "améliorées" sur des criblages de mutants produits en aveugle. Le développement des connaissances physiologiques, en particulier celles qui conduisent à une meilleure compréhension des relations entre métabolismes primaire et secondaire, permet de mieux contrôler les procédés de fermentation, mais aussi de mieux cibler les programmes d'amélioration par manipulations génétiques (clonage, mutagenèse dirigée...).

Notre travail s'inscrit dans cette optique, meilleure connaissance des régulations reliant métabolismes primaire et secondaire. Il entre dans le cadre d'un projet de recherche du laboratoire de Microbiologie Industrielle (E.N.S.A.I.A.) qui porte sur l'étude de la régulation de la voie de biosynthèse de la spiramycine, antibiotique macrolide produit par *Streptomyces ambofaciens*. Même si la spiramycine est produite industriellement depuis une trentaine d'années, son métabolisme reste peu connu contrairement à celui de la tylosine (produite par *Streptomyces fradiae*), autre antibiotique macrolide présentant une grande analogie structurale avec la spiramycine. Comme pour tout produit commercialisé la spiramycine est soumise aux lois du marché et de la concurrence internationale d'autant qu'elle n'est plus protégée par son brevet et qu'elle commence à être concurrencée par un autre macrolide aux indications cliniques voisines, la josamycine, produite par une firme japonaise.

L'identification de l'origine des atomes de carbone du noyau aglycone de la spiramycine montre que cette partie a comme précurseurs plusieurs unités d'acides gras à courtes chaînes activées (acétyl-CoA, propionyl-CoA et butyryl-CoA) qui sont les produits finaux du catabolisme de certaines voies du métabolisme primaire (dégradation de certains acides aminés, d'acides gras à longues chaînes...) (Fig. 1). Tout métabolisme favorisant la production de ces précurseurs favorise la synthèse de spiramycine.

En industrie la production de spiramycine est réalisée sur milieu complexe contenant entre autres constituants de l'amidon, de la crème de levure et des huiles végétales. Pour cette étude, dont l'objectif principal est avant tout fondamental, l'utilisation d'un milieu chimiquement défini s'impose dans un premier temps. Ces milieux synthétiques représentent des modèles simplifiés maîtrisables. Ainsi par exemple la compréhension des effets des acides aminés de la crème de levure passe par l'emploi des ions ammonium et de chaque acide aminé comme seule source azotée, ceux des huiles végétales par l'utilisation de leurs produits d'hydrolyse (glycérol et acides gras) et celui de l'amidon par l'utilisation du glucose.

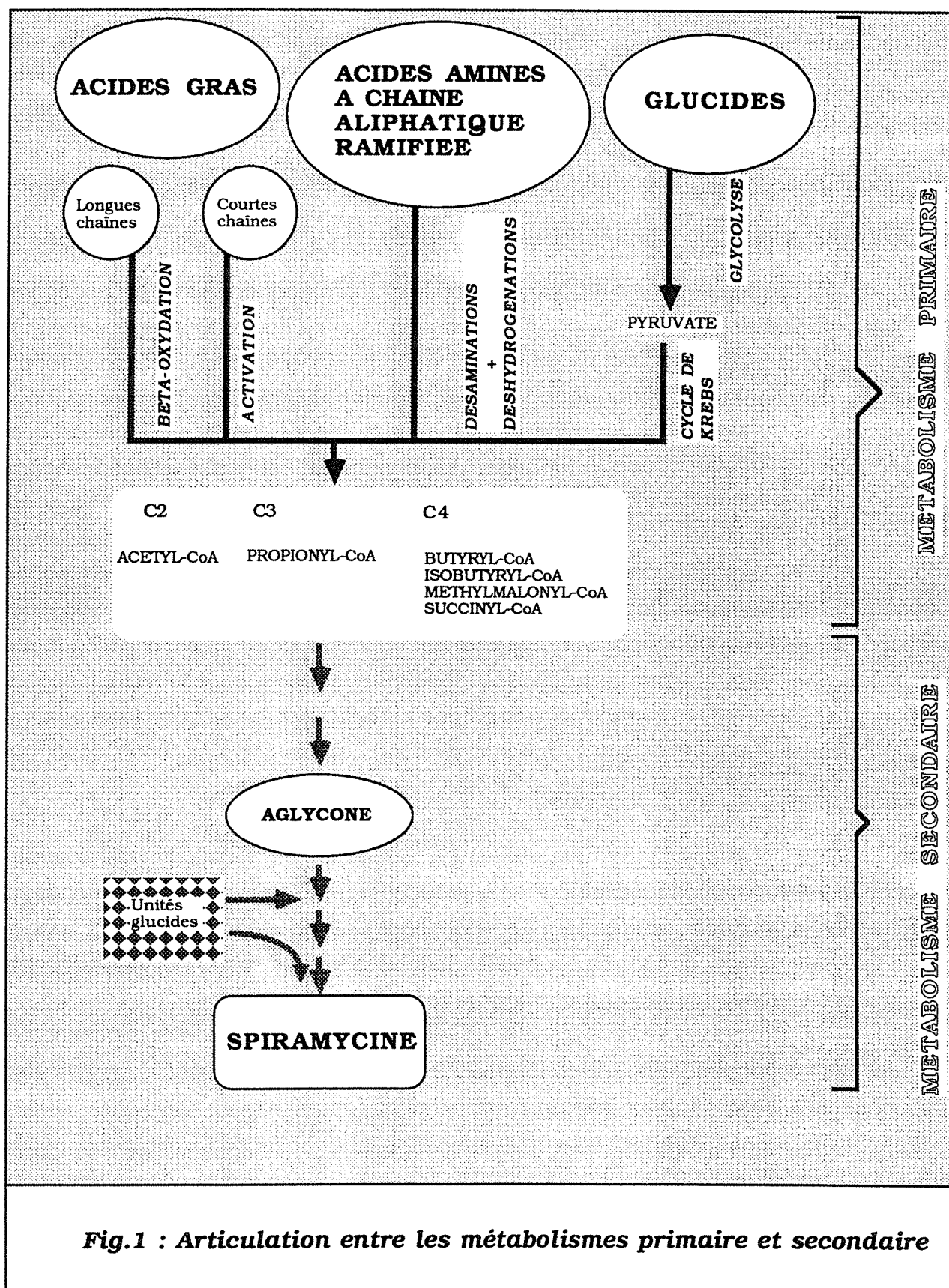


Fig.1 : Articulation entre les métabolismes primaire et secondaire

C'est pourquoi au laboratoire, le point de départ de ces travaux a été l'élaboration d'un milieu de culture synthétique après une étude des grandes lignes de la nutrition, de la croissance et du métabolisme central du microorganisme (Khaoua, 1990).

L'influence de la nature des nutriments sur la production de la spiramycine a été par la suite abordée.

Pour sa croissance, *S. ambofaciens* est capable d'utiliser une variété de sources d'azote : les sels d'ammonium, les nitrates et les acides aminés.

D'une façon générale, la production de spiramycine est stimulée par les nitrates qui assurent une faible croissance et défavorisée par les sels d'ammonium qui accélèrent la croissance (Lamsaïf, 1992 ; Untrau-Taghian, 1993). Une corrélation inverse entre le taux de croissance et la production a été proposée (Untrau-Taghian, 1993).

Selon la nature et la concentration des acides aminés utilisés, la production de la spiramycine est plus ou moins importante. Il semble que ceci puisse s'interpréter principalement grâce à deux éléments : la nature des processus du catabolisme de leur partie azotée menant ou non à de l'ammonium libre en quantité plus ou moins importante et la nature des résidus carbonés terminaux de leur catabolisme.

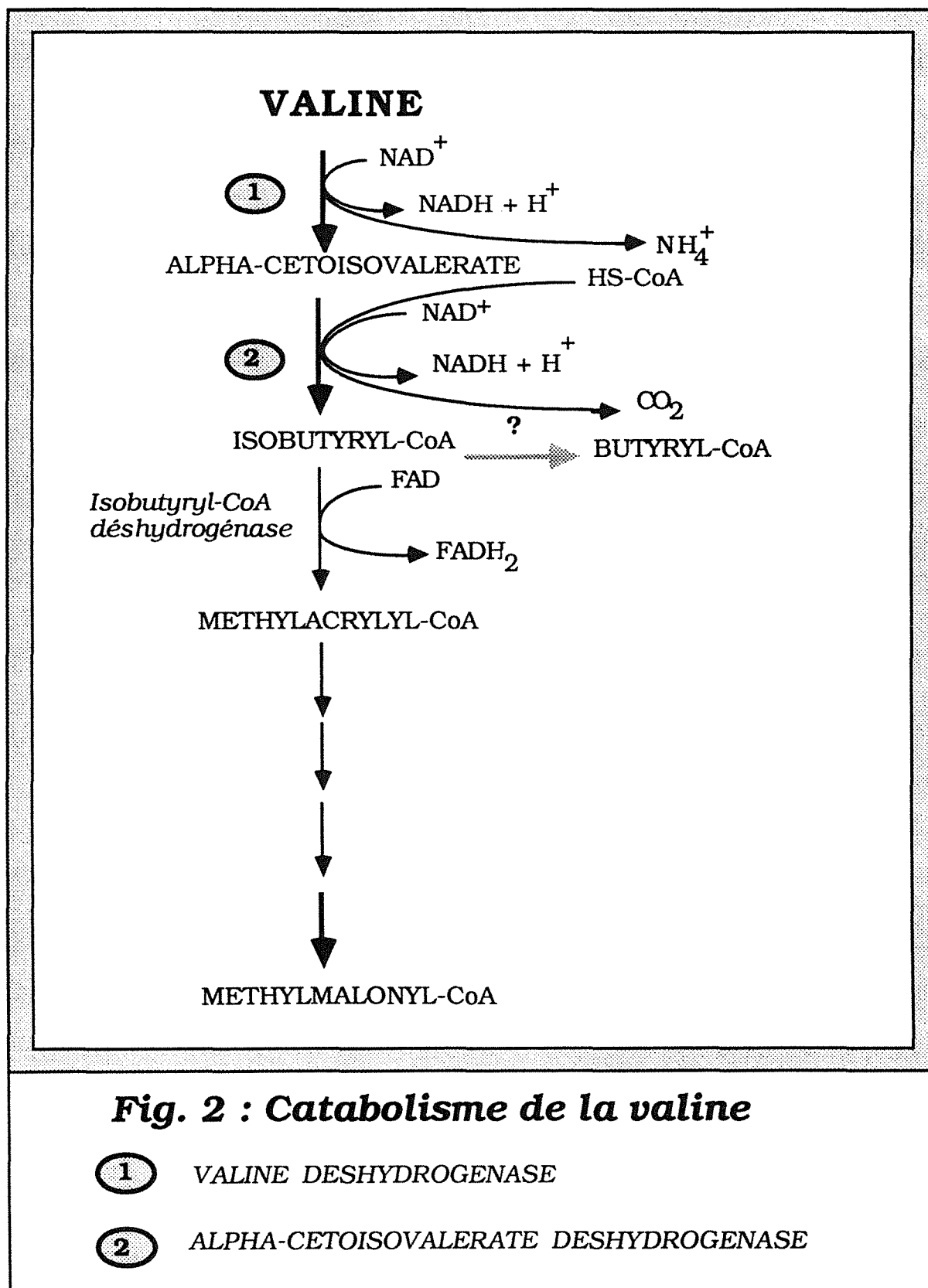
Pour aller plus avant dans la compréhension des relations entre l'utilisation des sources d'azote et la régulation de la biosynthèse de la spiramycine, il est nécessaire de mieux connaître les voies métaboliques d'assimilation de ces sources azotées. Trois sources azotées modèles (ions ammonium, lysine et valine) ont été choisies.

L'étude des voies d'assimilation des ions ammonium a montré que toutes les enzymes du cycle glutamate (glutamate déshydrogénase, glutamine synthétase, glutamate synthétase) sont présentes chez *S. ambofaciens* (Lamsaïf, 1992).

En ce qui concerne la lysine, excellente source pour la production de spiramycine, Untrau *et al.* (1992) ont montré que cet acide aminé subissait une transamination lors de son catabolisme ce qui explique son effet favorable pour la production de la spiramycine par la disponibilité des précurseurs issus de sa dégradation qui aboutit à l'acétate et à une faible excrétion d'ammonium.

Le cas de la valine est plus complexe car ses catabolites peuvent exercer un effet ambivalent : positif car son catabolisme mène à de bons précurseurs de l'aglycone (acylthioesters) ; négatif si une trop forte quantité d'ammonium est libérée suite à la désamination. Tout dépend de la concentration de la valine (Khaoua, 1990). *La première partie de cette thèse a consisté à confirmer et à mieux comprendre ce phénomène. Le catabolisme de la valine peut se décomposer en deux étapes : désamination oxydative permettant à la valine de servir de source d'azote, puis déshydrogénation conduisant aux précurseurs acides gras activés. La première étape est régulée par les sources d'azote, la deuxième étape liée au métabolisme carboné et énergétique est régulée par les sources d'énergie. Nous nous sommes fixés comme l'un des objectifs du présent travail, de préciser ces régulations. Pour ce faire, deux enzymes caractéristiques de ces deux étapes ont été*

choisies : la valine déshydrogénase et l' α -cétoisovalérate déshydrogénase (Fig. 2).



L'étude de la localisation des cibles d'action des ions ammonium a été déjà entreprise au laboratoire. Une répression et une inhibition de la valine déshydrogénase par les ions ammonium chez *S. ambofaciens* a été mise en évidence (Lebrihi *et al.*, 1992). Il a été également montré que l'acétate kinase et la phosphoacétyl-transférase (enzymes responsables de l'activation de l'acétate et du propionate) étaient réprimées en même temps que la biosynthèse de la spiramycine par les ions ammonium (Khaoua *et al.*, 1992).

Pour notre part, afin d'appréhender l'effet négatif des ions ammonium et dans le but d'améliorer la production de la spiramycine, nous avons envisagé d'utiliser différentes stratégies pour contourner ou éviter cet effet négatif : addition d'agent trappeur des ions ammonium, addition des acides gras et cultures semi-continues avec une alimentation contrôlée.

Quant à la source de carbone et d'énergie, un travail préliminaire a montré que les polysides lentement assimilables tels que les dextrines et l'amidon, entraînant une croissance lente étaient favorables à la production. Par contre des oses et diosides tels que le glucose, le galactose, le fructose et le lactose menant à une croissance plus rapide ne permettent qu'une moindre production d'antibiotique (Lamsaïf, 1992).

Notre second objectif a consisté en l'élucidation de la nature du mécanisme régulateur qui freine la production de spiramycine dans les cultures contenant une source carbonée rapidement assimilable. L'effet du glycérol en particulier nous a semblé intéressant à approfondir, étant donné l'intérêt qu'a porté dernièrement la Région Lorraine (premier producteur français de colza) sur la valorisation industrielle des produits agricoles dans le cadre du projet des biocarburants. En effet, le glycérol est un des résidus abondants lors de ce traitement des huiles de colza, et toute recherche visant à le valoriser est potentiellement intéressante.

Pour compléter notre étude sur l'influence des nutriments sur la production de la spiramycine, nous avons examiné l'effet des ions phosphate, les mécanismes impliqués et les interrelations entre les effets des sources de carbone et de phosphate.

A la suite de ces études physiologiques, l'ébauche d'une étude au niveau moléculaire a été entreprise. En effet, une présomption de l'existence d'un phénomène de remaniement cellulaire s'est dégagée, notamment de turnover des protéines lors du passage de la trophophase à l'idiophase. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en caractérisant l'évolution du profil des protéines lors de ces changements de phase, protéines dont certaines pourraient être des enzymes nécessaires à la production de spiramycine.

*Enfin dans le dernier volet de ce travail, suite à l'observation des modifications morphologiques de *S. ambofaciens* au cours des fermentations, nous avons contribué à une étude d'analyse quantitative d'images cherchant à établir une corrélation entre la morphologie de *S. ambofaciens* et la production de spiramycine.*

CHAPITRE

1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Historique

"La découverte de la pénicilline est devenue le sujet de nombreux mythes et légendes" écrivait Selwyn en 1979. Cette seule phrase résume l'incidence capitale de la découverte de ce premier antibiotique par Fleming en 1929, tant sur le plan thérapeutique que biotechnologique.

Au fil des temps, le monde des antibiotiques a connu une évolution rapide dont les principales étapes ont été :

- 1929-1944 : "début de l'antibiothérapie"
 - Développement clinique de la pénicilline et mise au point de sa production par fermentation de *Penicillium notatum*.
- 1945-1955 : "âge d'or"
 - Découverte des principales familles chimiques d'antibiotiques utilisées en antibiothérapie (Betina, 1983).
 - Développement des méthodes de criblage de ces métabolites et des techniques de fermentation.
- 1956-1965 : "période de transition"
 - Purification d'un petit nombre de nouveaux antibiotiques.
 - Apparition des antibiotiques semi-synthétiques.
 - Apparition des problèmes d'effets secondaires et de résistance.
- 1966-1993 : "temps modernes"
 - Remplacement progressif des antibiotiques naturels par leur dérivés semi-synthétiques correspondants, plus efficaces et moins toxiques.
 - Développement de la recherche et de l'utilisation d'antibiotiques pour l'agriculture et l'alimentation animale.
 - Recherche de propriétés antivirales et antitumorales des antibiotiques connus.
 - Amélioration des souches pour la surproduction des métabolites par des techniques de génie génétique (Schwab, 1988 ; Chater, 1990).
 - Formation de nouveaux antibiotiques par mutasynthèse (Rinehart, 1977) grâce à la connaissance des voies de biosynthèse.
 - Obtention de molécules hybrides après identification et clonage des gènes responsables de la synthèse des antibiotiques (Hopwood *et al.*, 1985 ; Floss, 1987).
- Futur :
 - Augmentation significative des taux de biosynthèse des antibiotiques par clonage des gènes de résistance aux antibiotiques (Crameri et Davies, 1986).
 - Production *in vitro*, en une seule étape, de nouveaux antibiotiques semi-

synthétiques en bioréacteur enzymatique (Jensen et Westlake, 1989).

Aujourd'hui, les antibiotiques en usage clinique suffisent dans la majorité des cas à guérir les infections habituelles. Toutefois, la recherche de molécules originales pour lutter contre les microorganismes résistants et les nouveaux microorganismes pathogènes opportunistes doit être poursuivie. Quant au développement des productions d'antibiotiques existants, il est également conditionné par la nécessité de mutants surproducteurs et d'améliorations des procédés de fermentation et d'extraction des produits (Smith, 1986).

Sources des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques et divers modes d'action. Ils sont généralement classés par familles sur la base de leur nature chimique (Berdy, 1974). Plus de 75% des antibiotiques sont d'origine microbienne : Streptomycètes (56%), Actinomycètes rares (8%), autres bactéries (13%) et champignons (23%) (Berdy, 1980). Le règne végétal constitue l'autre source d'antibiotiques. Le nombre d'antibiotiques naturels de structures connues dépasse aujourd'hui 6000 mais seulement 2% d'entre eux sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (Berdy, 1980 ; Vandamme, 1984 ; Zahner, 1987). Quant aux antibiotiques semi-synthétiques, pour le seul cas de la pénicilline, le nombre de dérivés préparés dépasse 30000 alors que le nombre de ces dérivés en usage clinique n'excède pas 30 (Berdy, 1980).

Intérêt économique

Le marché global des antibiotiques a été estimé à 10 milliards de deutsche mark par an (Zahner, 1987). Les parts de marché des différentes familles d'antibiotiques se répartissent comme suit (Frost et Sullivan, 1984) :

- Bêta-lactamines : 55%
- Tétracyclines : 14,5%
- Macrolides : 11%
- Aminoglycosides : 10,4%
- Autres : 9%

Applications

Les applications des antibiotiques sont aujourd'hui très diverses (Vandamme, 1984). Dans le domaine de la santé humaine, certains antibiotiques présentent, outre leur activité antimicrobienne, des propriétés intéressantes antivirales, antitumorales, voire hormonales (Betina, 1983). Par ailleurs, les antibiotiques sont utilisés dans les élevages industriels d'animaux comme agents antimicrobiens pour les besoins vétérinaires et comme promoteurs de croissance dans l'alimentation (Burg, 1982). Enfin, leurs applications phytosanitaires sont nombreuses : herbicides, pesticides, régulateurs de croissance (Miller *et al.*, 1983 ; Culter, 1988). Le marché des antibiotiques à usage non médical atteint aujourd'hui le volume du marché des antibiotiques à usage thérapeutique mais représente une valeur financière moindre.

La spiramycine

La spiramycine a été découverte en 1954 dans la culture de *Streptomyces ambofaciens* isolé d'un prélèvement de sol effectué dans la région de Péronne (France) (Pinneret-Sindico, 1954). Un brevet d'exploitation fut déposé dès 1960 par Ninet et Verrier. Elle est vendue par les laboratoires Spécia sous l'appellation de Rovamycine.

Les macrolides, dont la spiramycine, sont utilisés en médecine clinique depuis plus de trente ans et restent un élément important de la thérapeutique anti-infectieuse.

En France, les macrolides occupent la première place en médecine de ville. Ils représentent 30% du marché des antibiotiques.

I. PRESENTATION DU METABOLISME SECONDAIRE

I. 1. Définitions

Le terme de métabolisme secondaire, par opposition à celui de métabolisme primaire, a été initialement défini en 1891 par les physiologistes du règne végétal pour différencier les activités biochimiques d'une plante. Il a ensuite été introduit par Bu'Lock en 1961 dans le vocabulaire du microbiologiste. Aujourd'hui, il est même utilisé en physiologie animale (Malik, 1982 ; Campbell, 1984).

La première définition donnée repose sur la distribution des métabolites dans la nature : les métabolites primaires étant très largement répandus, les métabolites secondaires étant plus limités. Les microbiologistes ont donné, quant à eux, une définition temporelle du métabolisme secondaire par rapport à la cinétique de croissance des microorganismes. Les métabolites primaires sont synthétisés pendant la phase de croissance (ou trophophase) alors que la formation des métabolites secondaires (ou idiolites) est plus tardive, découplée de la

croissance (phase de production ou idiophase) (Bu'Lock *et al.*, 1965).

Aucune de ces deux définitions n'est en réalité entièrement satisfaisante. En effet, il est par exemple possible d'obtenir un couplage de la production de certains métabolites secondaires et de la croissance du microorganisme en faisant varier la composition du milieu de culture (Gray et Bhuwapathanapun, 1980). De nombreuses autres caractéristiques distinctives entre métabolites primaires et secondaires ont été proposées. Elles sont regroupées dans le tableau I. 1. Un métabolite secondaire sera ainsi défini par l'ensemble des critères.

<i>Métabolites primaires</i>	<i>Métabolites secondaires</i>
<ul style="list-style-type: none"> • nécessité pour la croissance du microorganisme • rôle physiologique connu • présence tout au long du cycle de développement de l'organisme • taux de renouvellement important • production dans diverses conditions de culture • ubiquité • enzymes spécifiques • synthèse d'un produit défini • concentrations élevées • structure chimique généralement simple • voies de synthèse simples et courtes 	<ul style="list-style-type: none"> • inutilité pour la croissance • rôle physiologique difficile à assigner • apparition à un moment précis du cycle de développement • taux de renouvellement pratiquement nul • production dans des conditions bien déterminées • spécificité • enzymes peu spécifiques • synthèse d'un mélange de produits de la même famille • concentrations faibles • structure chimique le plus souvent complexe • voies de synthèse compliquées et souvent longues
<p>Tableau I. 1 : Comparaison des caractéristiques des métabolites primaires et secondaires</p> <p>(D'après Martin et Demain , 1980 ; Campbell , 1984 ; Hutter, 1986)</p>	

Quelle est, par ailleurs, la fonction du métabolisme secondaire ?

Plusieurs hypothèses (Tableau I. 2) ont été émises dans la littérature pour répondre à cette question mais aucune n'est suffisante en elle-même pour rendre compte de la complexité des phénomènes mis en jeu.

- Produits de détoxification pour la cellule
- Sous-produits du métabolisme primaire
- Réponses à une perturbation du métabolisme
- Effecteurs des phénomènes de différenciation
- Médiateurs entre les différents organismes dans l'environnement
- Molécules ayant perdu leur fonction au cours de l'évolution

Tableau I. 2 : Fonctions des métabolites secondaires

(D'après Zahner, 1979 ; Campbell et al., 1982 ; Vining, 1986)

I. 2. Voies de biosynthèse

En dépit de leur très grande diversité, les métabolites secondaires dérivent biochimiquement d'un nombre relativement restreint de précurseurs, fournis par le métabolisme primaire (Martin et Demain, 1980 ; Okanishi et Hotta, 1980 ; Malik, 1982). Il existe ainsi quelques intermédiaires clés qui permettent de classer les métabolites secondaires en différents groupes selon la nature chimique de ces précurseurs (Fig. I. 1) et les voies principales de biosynthèse utilisées. Vining (1986) propose par exemple une classification des métabolites secondaires en quatre groupes sur la base du précurseur principal, à savoir : glucide, peptide, acétate ou acide nucléique. Il suggère en outre la création d'une cinquième classe pour les "ingroupables" d'origine biosynthétique multiple ou spécifique.

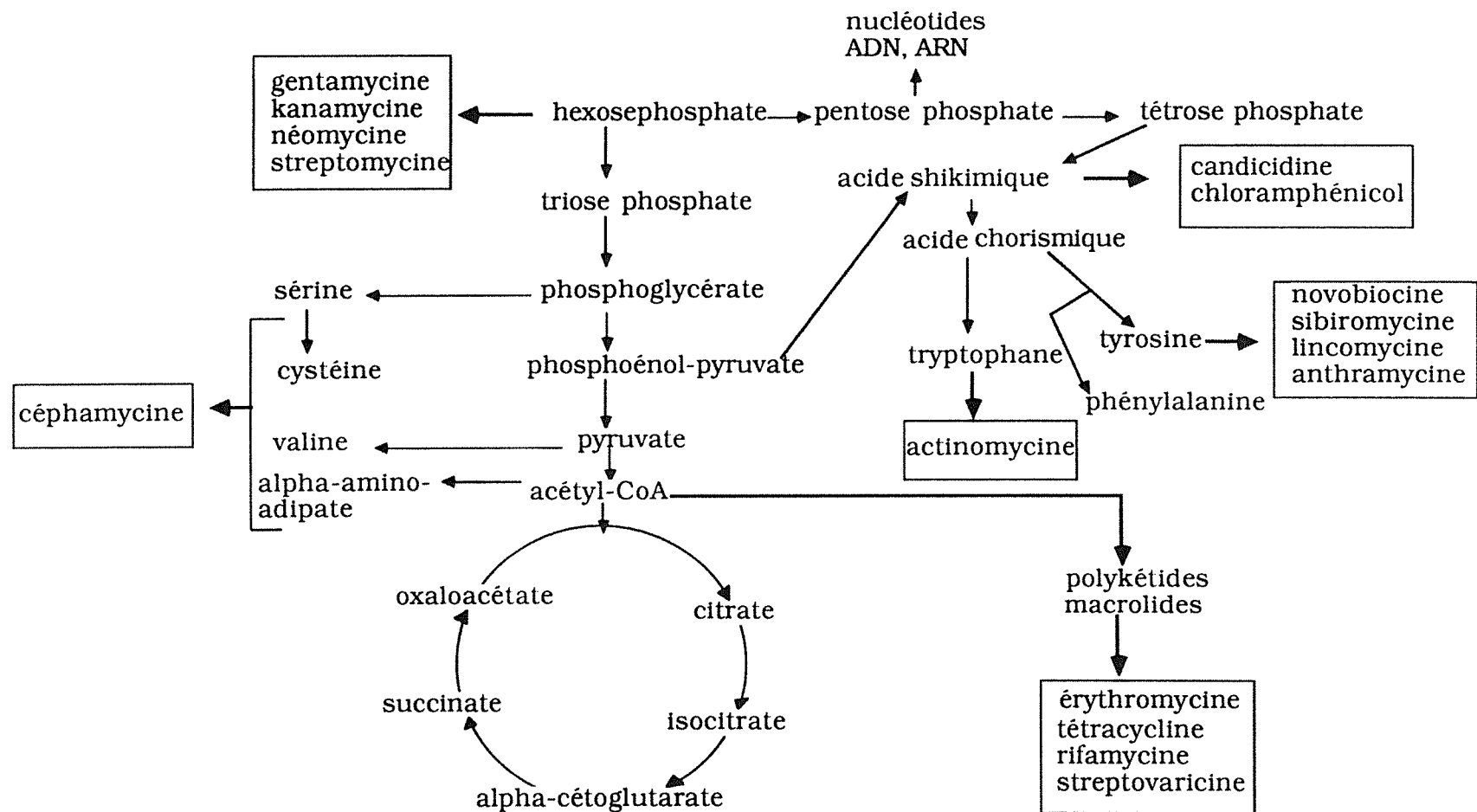


Fig. I. 1 . : Relations entre métabolismes primaire et secondaire

(Adapté d'après Malik, 1980)

I. 3. Génétique

La synthèse des métabolites secondaires met en jeu un grand nombre de gènes : plus de deux cents, par exemple, seraient impliqués dans la formation de la chlortétracycline. Ces gènes sont non seulement impliqués dans la formation des précurseurs et l'assemblage de la molécule, mais aussi dans les mécanismes de régulation de la synthèse, de transport du métabolite et de résistance au produit formé si celui-ci est toxique pour la cellule productrice (cas des antibiotiques) (Malik, 1982). Ils sont généralement localisés dans une même région du chromosome, constituant ainsi un "cluster" en terminologie anglo-saxonne ou groupe de gènes (Wright et Hopwood, 1977 ; Hopwood *et al.*, 1986 ; Martin et Liras, 1989).

De nombreux auteurs avaient attribué une nature plasmidique aux gènes du métabolisme secondaire en raison principalement du caractère instable de ce métabolisme. En réalité, les gènes seraient de nature chromosomique et l'implication de gènes plasmidiques dans le métabolisme secondaire serait rare (Sermonti et Lanfaloni, 1982 ; Malik, 1986) (Tableau I. 3).

<i>Antibiotique</i>	<i>Microorganisme</i>
Aclacinomycine	<i>S. galilaeus</i>
Aureothricine	<i>S. kasugaensis</i>
Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>
Chlortétracycline	<i>S. aureofaciens</i>
Holomycine	<i>S. clavuligerus</i>
Istamycine	<i>S. tenjimariensis</i>
Kanamycine	<i>S. kanamyceticus</i>
Kasugamycine	<i>S. kasugaensis</i>
Lankacidine	<i>Streptomyces sp</i>
Leucomycine	<i>S. reticuli</i>
Méthylénomycine A	<i>S. coelicolor</i>
Néomycine	<i>S. fradiae</i>
Oxytétracycline	<i>S. rimosus</i>
Paromomycine	<i>S. rimosus ssp. paromomycinus</i>
Pyromycine	<i>S. alboniger</i>
Spiramycine	<i>S. ambofaciens</i>
Streptomycine	<i>S. bikiniensis</i>
Streptomycine	<i>S. griseus</i>
Turimycine	<i>S. hygroscopicus</i>
<p>Tableau I. 3 : Quelques antibiotiques dont la biosynthèse impliquerait des plasmides</p> <p><i>S. : Streptomyces</i> (D'après Betina, 1983)</p>	

Le développement de la génétique du métabolisme secondaire est lié à l'intérêt que suscitent les produits formés. Les méthodes de biologie moléculaire les plus performantes peuvent maintenant être utilisées pour étudier les voies de biosynthèse et les mécanismes de régulation et essayer d'obtenir des souches surproductrices (Hopwood *et al.*, 1986 ; Malik, 1986 ; Hutter et Eckhardt, 1988). De nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques et de pigments ont été clonés ces dernières années (Martin et Liras, 1989).

I. 4. Résistance aux antibiotiques

La production d'agents antibiotiques implique chez les microorganismes producteurs, une résistance à cet antibiotique (Chater et Hopwood, 1989).

Les mécanismes biochimiques conduisant à la résistance des bactéries aux antibiotiques sont essentiellement de quatre types :

- Modification de la cible potentielle de l'antibiotique.

Ainsi par exemple, dans le cas où la cible est l'ARN ribosomal, une méthylation spécifique de celui-ci protège le producteur.

- Modification de la perméabilité cellulaire.

L'antibiotique est excrété hors de la cellule contre un gradient de concentration (cas des céphalosporines, du chloramphénicol). Une diminution de la perméabilité durant l'idiophase pourrait protéger le producteur.

- Synthèse d'un antibiotique inactif.

L'antibiotique est synthétisé dans le producteur sous forme inactive. Une activation finale de l'antibiotique est associée à l'excrétion de celui-ci hors de la cellule productrice. Ainsi, dans le cas de la méthylénomycine synthétisée par *Streptomyces coelicolor*, le gène de résistance code pour une protéine transmembranaire qui exporte l'antibiotique.

- Modification de l'antibiotique.

Beaucoup de producteurs d'antibiotiques possèdent des enzymes capables de convertir leur antibiotique en une forme inactive. Ainsi, la streptomycine streptidinokinase est une enzyme intracellulaire synthétisée lors de l'idiophase qui phosphoryle la streptomycine, la rendant inactive.

La transcription des gènes de résistance est étroitement coordonnée à celle des gènes de biosynthèse de l'antibiotique et s'opère simultanément. Cette simultanéité assure que la biosynthèse d'un antibiotique létal ne se fera pas sans l'expression du gène de résistance.

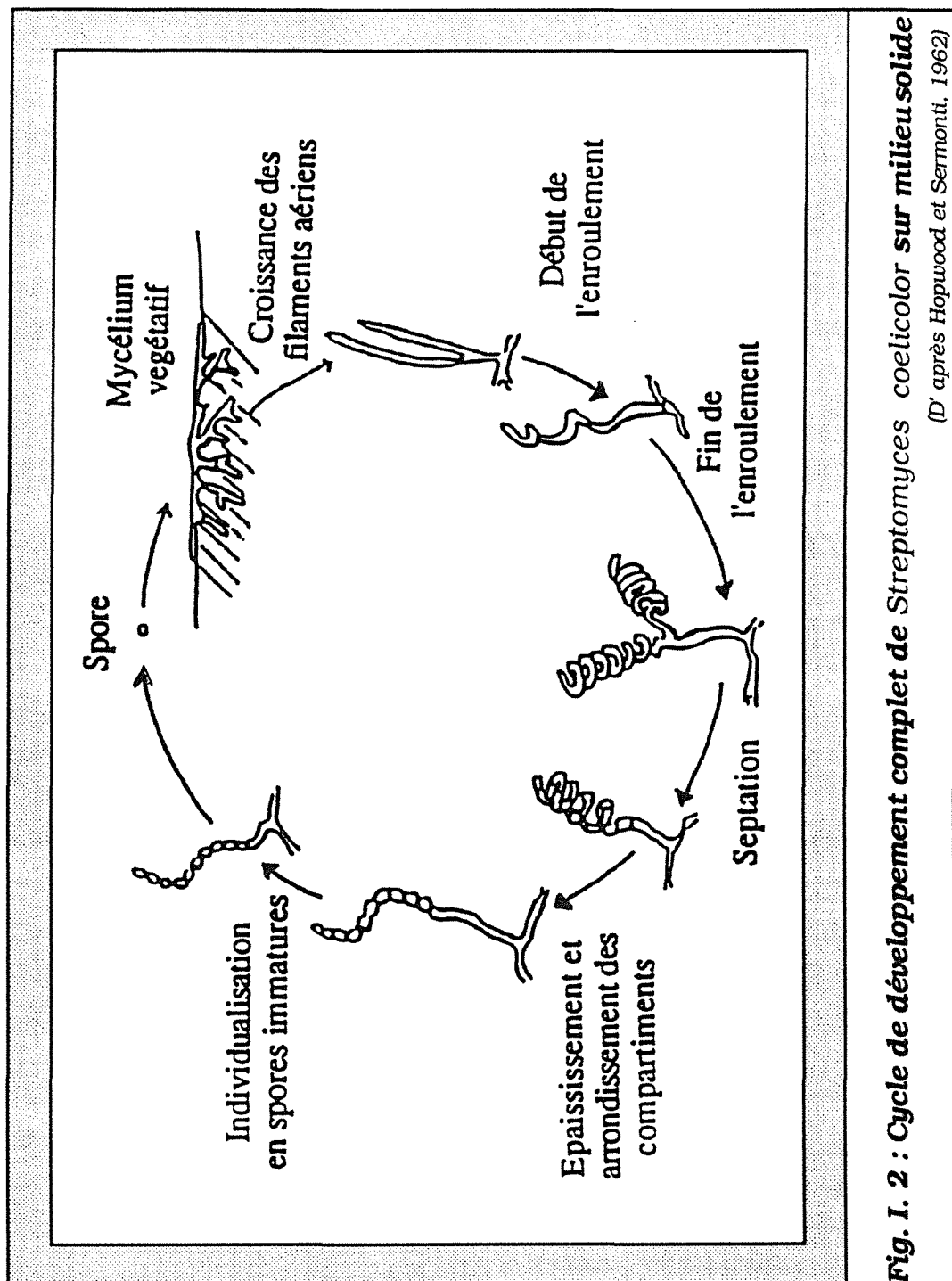
II. OBTENTION DE LA SPIRAMYCINE PAR FERMENTATION

II. 1. Présentation du microorganisme producteur : *Streptomyces ambofaciens*

Streptomyces ambofaciens, producteur de spiramycine, appartient au groupe des Actinomycètes et au genre *Streptomyces*. Ce sont des bactéries filamenteuses, à Gram positif avec une paroi de type I (LL-DAP), immobiles, aérobies, chimiohétérotrophes, sporulantes et avec un G+C % de leur ADN supérieur à 55% (Buchanan et Gibbons, 1974). La morphologie de leurs colonies évoque celle des colonies des champignons. Les *Streptomyces* sont des bactéries largement répandues dans la nature, en particulier dans les sols (20% des microorganismes) où elles subsistent sous forme de spores (Mayfield *et al.*, 1972). Ces microorganismes présentent un cycle de développement cellulaire complexe qui peut se décomposer en plusieurs étapes (Locci et Sharples, 1984 ; Hirsch et McCann-McCormick, 1985). Le cycle de développement sur milieu solide commence par la germination d'une spore au niveau de laquelle un tube de germination va croître. Celui-ci va donner des hyphes qui se ramifient intensément et constituent le mycélium primaire qui se développe sur et dans le substrat. Sur ce mycélium primaire va se développer un mycélium secondaire aérien. L'extrémité des hyphes aériens se spiralise, puis les hyphes du mycélium secondaire vont se cloisonner. Les parois des cloisons vont s'épaissir pour délimiter des spores haploïdes, unités de survie et de dissémination des *Streptomyces* (Hopwood et Sermonti, 1962) (Fig. I. 2). Les ornements externes à la surface des spores permettent en partie d'identifier l'espèce. Les étapes de germination et de sporulation non seulement dépendent des conditions physico-chimiques et nutritionnelles (Kalakoutski et Agre, 1976 ; Ensign, 1978) mais elles sont également soumises à l'action de facteurs autorégulateurs comme le facteur A. La sporulation des *Streptomyces* en milieu liquide n'est pas courante bien qu'existante. Quelques cas ont été décrits (Kendrick et Ensign, 1983 ; Koepsel et Ensign, 1984 ; Huber *et al.*, 1987 ; Peroz-Collignon, 1993).

Le métabolisme central de *S. ambofaciens* a été étudié au laboratoire (Khaoua, 1990). Cette bactérie possède les enzymes de plusieurs voies glycolytiques : phosphofructokinase et aldolase de la voie d'Embden-Meyerhof et glucose 6-phosphate déshydrogénase de la voie de Warburg Christian. Ces activités enzymatiques sont fortes dans la cellule lors de la phase active de croissance. Elle a également un cycle de Krebs et une chaîne respiratoire fonctionnels et très actifs pendant la trophophase. Elle a sans doute la possibilité d'utiliser aussi le cycle glyoxylique, étant donné l'existence d'une isocitrate lyase.

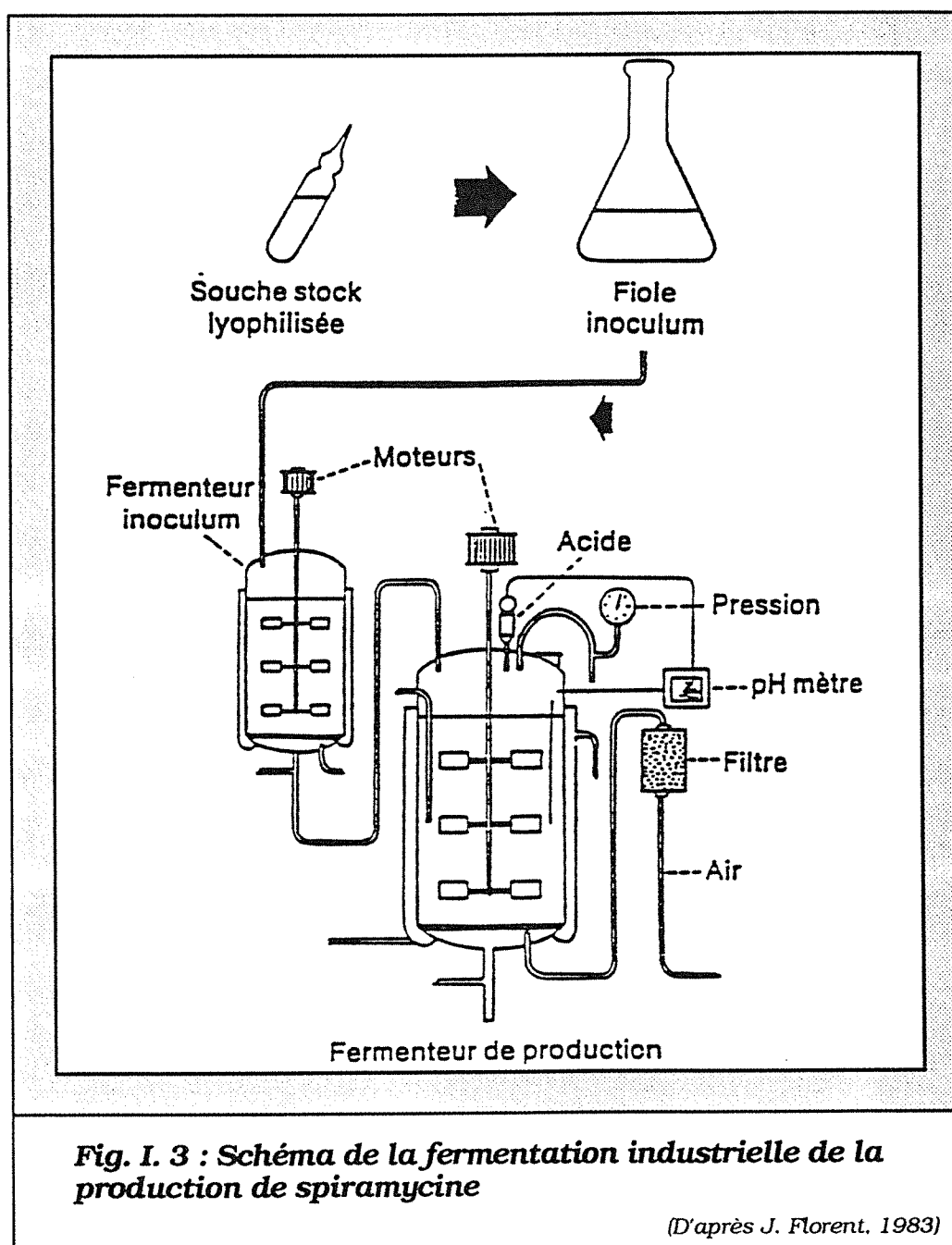
Les *Streptomyces*, en plus de leur "chromosome" possèdent des plasmides, circulaires pour la plupart (Hutter et Eckhardt, 1988). Leur génome contiendrait $5,5 \times 10^3$ paires de base ($3,7$ à $5,2 \times 10^9$ Da), soit 1,5 à 2 fois supérieur à celui d'*Escherichia coli* (Galdek et Zakrzewska, 1984). Les *Streptomyces* présentent en outre une grande variabilité phénotypique liée à une instabilité génomique chromosomique et plasmidique (Hutter et Hintermann, 1985).



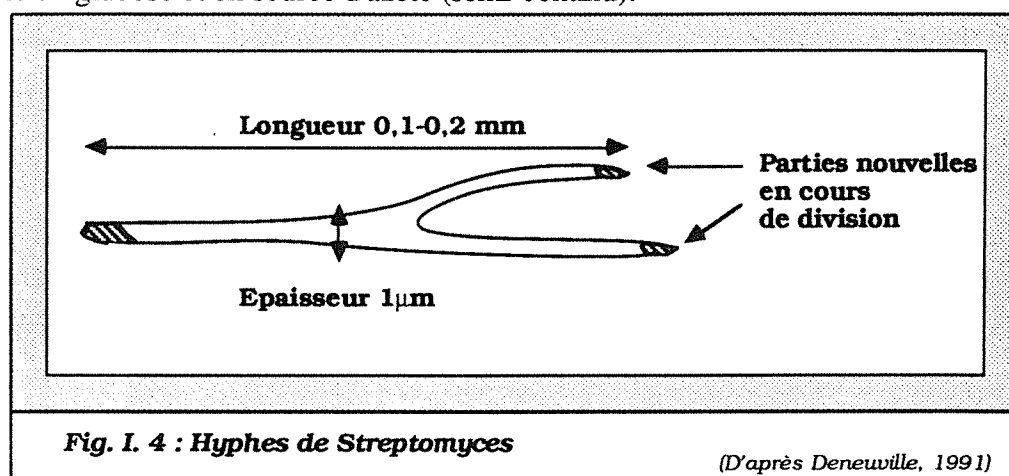
Grâce à la richesse de leur métabolisme secondaire, les *Streptomyces* sont capables de produire non seulement de nombreux antibiotiques, inhibiteurs enzymatiques, antitumoraux, herbicides, insecticides... mais aussi différentes enzymes de premier intérêt : glucoamylase, glucose-isomérase (Young *et al.*, 1980), protéase (Pokorny *et al.*, 1979), cellulase, ligninase ... (Piret et Demain, 1988), ainsi que de nombreux composés à haute valeur ajoutée comme les vitamines. Malgré l'intérêt industriel particulièrement important de ces microorganismes, le développement des études physiologiques et biochimiques des *Streptomyces* est relativement récent et il a fallu attendre 1982 pour voir apparaître les bases de la biologie moléculaire des *Streptomyces* (Hopwood, 1982).

II. 2. Procédé de fermentation

Le protocole industriel de production de spiramycine utilise deux réacteurs fonctionnant en discontinu (Fig. I. 3). Les matières premières, peu onéreuses, sont principalement des sous-produits d'origine agricole. Le premier réacteur sert à produire de la biomasse cellulaire, sur un milieu amidon, glucose, ammonium, cornsteep, minéraux... Le deuxième réacteur (production de spiramycine) contient un milieu amidon, cornsteep, minéraux, complémenté avec de la "crème de levures" et des huiles... L'état physiologique des cellules au moment du transfert entre les réacteurs est critique pour la production. L'instant de transfert est déterminé par la vitesse de consommation de l'O₂. Dans le réacteur de production, la synthèse de spiramycine commence en fin de phase de ralentissement et se poursuit plusieurs heures en phase stationnaire.



Pour maintenir les hyphes dans un état de croissance lente (après la phase exponentielle) favorable à la production de la spiramycine au niveau des extrémités actives (Fig. I. 4), la méthodologie généralement adoptée en industrie consiste à limiter la concentration en biomasse à la fin de la croissance rapide (Xrpg=biomass rapid growth phase) et à permettre ensuite une phase de croissance lente par installation d'une alimentation limitante en glucose et en source d'azote (semi-continu).



La production de spiramycine par *S. ambofaciens* dans un fermenteur pilote de 15 litres dans des conditions proches de celles utilisées en industrie a été décrite par Deneuville (1991). Plusieurs facteurs de la sécrétion de spiramycine ont été retenus :

1. La composition du milieu de culture

• Les éléments essentiels sont :

- le glucose apporté sous forme d'amidon.
- les acides gras sous forme d'huile de maïs.
- les acides aminés sous forme de levure pressée.
- les ions NH_4^+ sous forme de chlorure d'ammonium.

2. Un profil de température (30°C pendant la phase exponentielle de croissance et 25°C pendant la production) est appliqué pour atteindre l'optimum de productivité ; *S. ambofaciens* produit de la spiramycine après une phase de croissance de 30 heures à 30°C et pendant une phase de production de 120 heures à 25°C.

3. Les conditions d'aération du fermenteur doivent satisfaire la demande en O_2 des cellules anciennes et nouvellement formées. Le problème apparaît surtout pendant la phase de production : le mycélium de plus en plus concentré forme des "pelotes" dans lesquelles l' O_2 diffuse moins bien. Il est donc important de prévoir une valeur Xrpg telle que la vitesse de croissance et donc le transfert d' O_2 soient encore suffisants en phase de production. Dans le cas contraire, il en résulte une altération cellulaire et une diminution de la vitesse spécifique de production. En industrie, la phase de croissance rapide réalisée sans régulation d' O_2 dissous permet d'observer le "puits" d' O_2 . Pendant la phase de production l'oxygène dissous est régulé à des concentrations de l'ordre de 30 à 50% de saturation.

4. Le pH optimum de production de spiramycine se situe entre 6 et 7.

III. LA SPIRAMYCINE

III. 1. Classification

La spiramycine appartient à la famille des macrolides. Le terme macrolide regroupe les antibiotiques basiques lipophiles dont la structure chimique est formée d'un macrocycle lactonique, sans atome d'azote (Woodward, 1957). A ce cycle sont liés un à trois 6-désoxyhexoses parfois N-méthylés. Ces macrolides sont classés selon le nombre d'atomes du squelette du macrocycle lactonique (membres), en macrolides à 12, 14, 16 et 17 membres. La majeure partie des macrolides est regroupée dans la catégorie des macrolides à 16 membres. Une classification basée sur la nature des oses et la maturation du cycle a été établie. Il en ressort 5 classes (Omura et Nakagawa, 1981 ; Crandall et Hamill, 1986). La spiramycine appartient à la classe de la magnamycine et de la leucomycine ; elle est caractérisée essentiellement par la nature du radical fixé en position 3 du cycle lactone et par la présence en position 4" du résidu mycarose. La partie aglycone (macrocycle) possède une structure spécifique entre les carbones 9 et 13.

III. 2. Relation activité-structure

L'activité antibactérienne de l'antibiotique est liée à certaines fonctions de sa structure chimique. Ainsi le macrocycle lactonique seul est exempt de toute activité biologique. La fonction aldéhyde en C8 souvent présente chez les macrolides à 16 membres assure le maximum d'activité. En effet, la réduction de cette fonction aldéhyde en fonction alcool diminue fortement son activité (Kirst *et al.*, 1982). Les résidus osidiques sont nécessaires à l'activité antibiotique de la molécule. Leur acylation est importante dans le degré d'efficacité. Une augmentation de la taille du groupe alkyle (de méthyle à isovaléryle) en position 4" du mycarose favorise l'activité antibactérienne de la leucomycine (Martin, 1979). Dans le cas des macrolides à 16 membres, l'absence du groupement diméthylamine du mycaminose rend la molécule inerte.

III. 3. Spectre d'action

Comme l'ensemble des antibiotiques macrolides, la spiramycine est active contre des bactéries Gram-positives (*Staphylocoques*, *Pneumocoques*, *Corynébactéries*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*), quelques bactéries Gram-négatives (*Neisseria*, *Campylobacter sp*, *Legionella sp*), certaines bactéries particulières comme les chlamydies et les mycoplasmes (*Mycoplasma pneumoniae*). Elle agit également sur les toxoplasmes (forme végétative de *Toxoplasma gondii*).

III. 4. Mode d'action

Les macrolides agissent par inhibition de la synthèse protéique chez les bactéries. Lors de ces synthèses non inhibées, le complexe acide aminé-ARN de transfert se fixe sur la fraction 50 S du ribosome pour la lecture de l'ARN messager. Ce complexe fixé au niveau d'un site accepteur (A), subit une translocation vers le site donneur (P) grâce à une enzyme, la translocase. La translocation se déroule en trois étapes :

- évacuation du peptidyl-t-ARN du site A.
- déplacement du peptidyl-t-ARN vers le site P.
- positionnement adapté du peptidyl-t-ARN sur le site P.

Les macrolides de grande taille (spiramycine, josamycine...) inhibent les premières étapes de la synthèse protéique, ce qui se traduit par un défaut de fixation des aminoacyl-t-ARN. Les macrolides de petites tailles (érythromycine, oléandomycine, ...) agissent à un stade plus tardif en inhibant la translocation (Larpent et Sanglier, 1989).

Les macrolides, dont la spiramycine, se fixent sur le site donneur avec une stoechiométrie apparente de 1 : 1. Cette fixation sur le ribosome bactérien particulièrement stable semble dans le cas de la spiramycine être responsable du phénomène de bactériopause : des concentrations inférieures aux CMI (concentration minimale inhibitrice) conservent une activité bactériostatique sur les cocci à Gram positif (Videau et Jonchere, 1957).

Les macrolides agissent aussi au niveau des ribosomes mitochondriaux et chloroplastiques des cellules eucaryotes.

III. 5. Résorption

La présence sur le cycle lactonique de radicaux en position 6, 8 et 9 confère à la spiramycine une bonne résistance à l'hydrolyse acide. Administrée *per os*, elle n'est donc pas inactivée au pH gastrique (Fernandez, 1987).

III. 6. Place des macrolides en thérapeutique

Les macrolides sont des antibiotiques de première intention. Ils constituent une alternative de choix aux pénicillines de type G en cas d'allergie à celles-ci. Les macrolides seront prescrits en première et deuxième intention selon le type de germes à éradiquer et selon la tolérance des sujets à traiter aux pénicillines. Ils sont utilisés dans le traitement des infections O.R.L. et méningées.

En dehors des indications communes aux macrolides, la spiramycine connaît deux indications qui lui sont propres :

- toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*).
- méningites à méningocoques.

La spiramycine se voit utilisée dans d'autres pathologies en raison de son efficacité par rapport à d'autres produits notamment dans le traitement de la cryptosporidiose chez les malades immunodéprimés et dans les pathologies de la cavité buccale où elle est très largement utilisée.

La spiramycine est également utilisée sous forme d'acide embonique dans l'alimentation animale où elle favorise l'assimilation des éléments nutritifs et améliore ainsi l'indice de conversion (poids de viande produite par rapport au poids de nourriture consommée).

III. 7. Toxicité et effets indésirables

Malgré l'absence de véritable toxicité, la spiramycine est quelquefois responsable d'effets indésirables.

- Les perfusions d'adipate de spiramycine peuvent provoquer des réactions locales (veinites, thrombophlébites) et générales, surtout lors d'une perfusion trop rapide d'une solution concentrée.
- Les réactions allergiques (éruptions) sont rares.
- Des troubles digestifs mineurs, dose-dépendants, sont parfois observés : anorexie, nausées, vomissements, diarrhées (Maur et Newman, 1990).

III. 8. Résistance

III. 8. 1. Résistance naturelle à la spiramycine

Tous les bacilles à Gram négatif à l'exception de *Legionella*, *Campylobacter* et *Haemophilus* sont résistants à la spiramycine. La résistance naturelle est due à l'impossibilité pour la spiramycine de franchir la paroi de ces bactéries (Rouveix *et al.*, 1988).

III. 8. 2. Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle de certaines espèces, est apparue une résistance acquise de souches à l'intérieur d'espèces théoriquement sensibles. C'est à la suite de l'utilisation de la spiramycine que ce type de résistance s'est développé et a modifié le spectre initial de cet antibiotique. Cette résistance acquise peut résulter soit d'une mutation chromosomique qui est un événement rare, soit d'une mutation plasmidique qui est plus fréquente (80% à 90% des résistances acquises). Cette résistance extrachromosomique recouvre deux mécanismes d'inégale importance, la résistance par modification de l'antibiotique, et la résistance par altération de la cible de l'antibiotique.

IV. BIOSYNTHESE DES MACROLIDES

Dans cette partie, avant de décrire la biosynthèse de la spiramycine, celle de la tylosine, autre macrolide à 16 membres, plus étudiée, sera présentée.

La structure chimique de ces deux macrolides montre une grande analogie (Fig. I. 5a et I. 5b). On note dans les deux cas la présence d'une fonction aldéhyde nécessaire pour l'activité antibiotique, ainsi que celle d'un sucre aminé (mycaminose) et d'un déoxysucre (mycarose). Le troisième sucre accroché au macrocycle lactonique de chacun de ces deux antibiotiques est le mycinose dans le cas de la tylosine et la forosamine dans le cas de la spiramycine. On note la présence d'un radical R en position 3 du macrocycle lactonique de la spiramycine. Celui-ci peut être un hydrogène, un acétyle ou un propionyle conduisant, respectivement, à la formation des spiramycines I, II ou III.

IV. 1. Généralités

La biosynthèse des macrolides s'effectue en deux étapes : formation de l'aglycone par condensation d'unités acyl-CoA puis conversion de l'aglycone en macrolide par greffage des sucres et modifications terminales : oxydations, réductions et méthylations du macrocycle.

Trois classes de macrolides ont été définies en fonction de leurs précurseurs (Neuzil et Hostalek, 1986) :

- les macrolides dont le cycle n'est synthétisé qu'à partir d'unités propionates (ex : érythromycine).
- les macrolides dérivant d'unités acétate et propionate (ex : méthymycine).
- les macrolides dérivant d'unités acétate, propionate et butyrate (ex : carbomycine, spiramycine et tylosine).

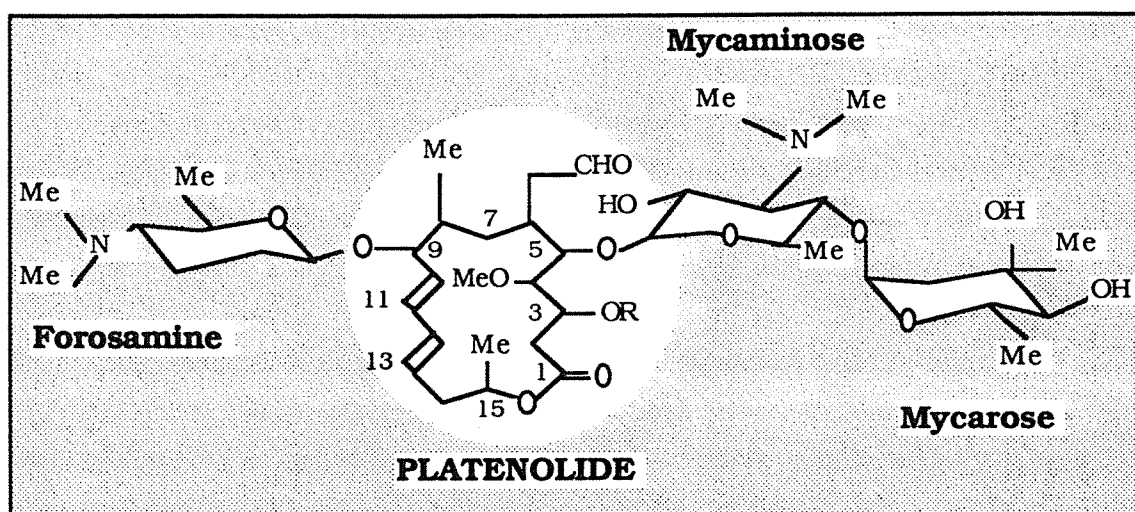


Fig. I. 5a : Structure chimique de la spiramycine

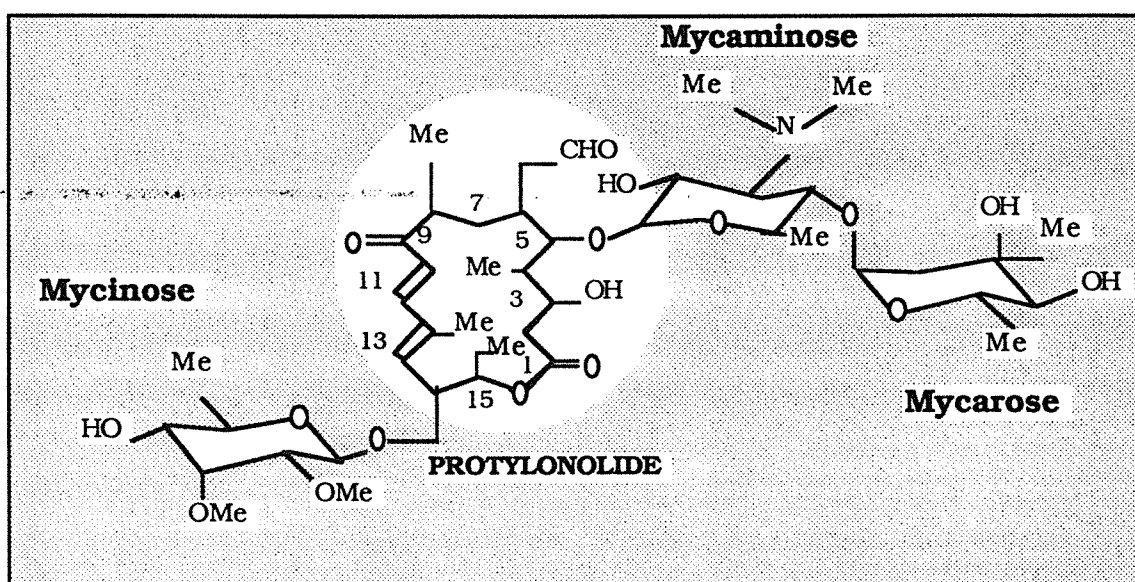
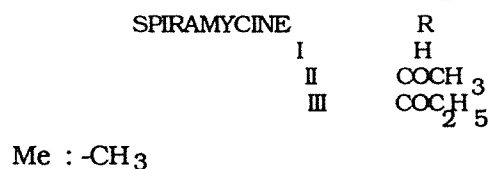


Fig. I. 5b : Structure chimique de la tylosine

IV. 2. Biosynthèse de la tylosine

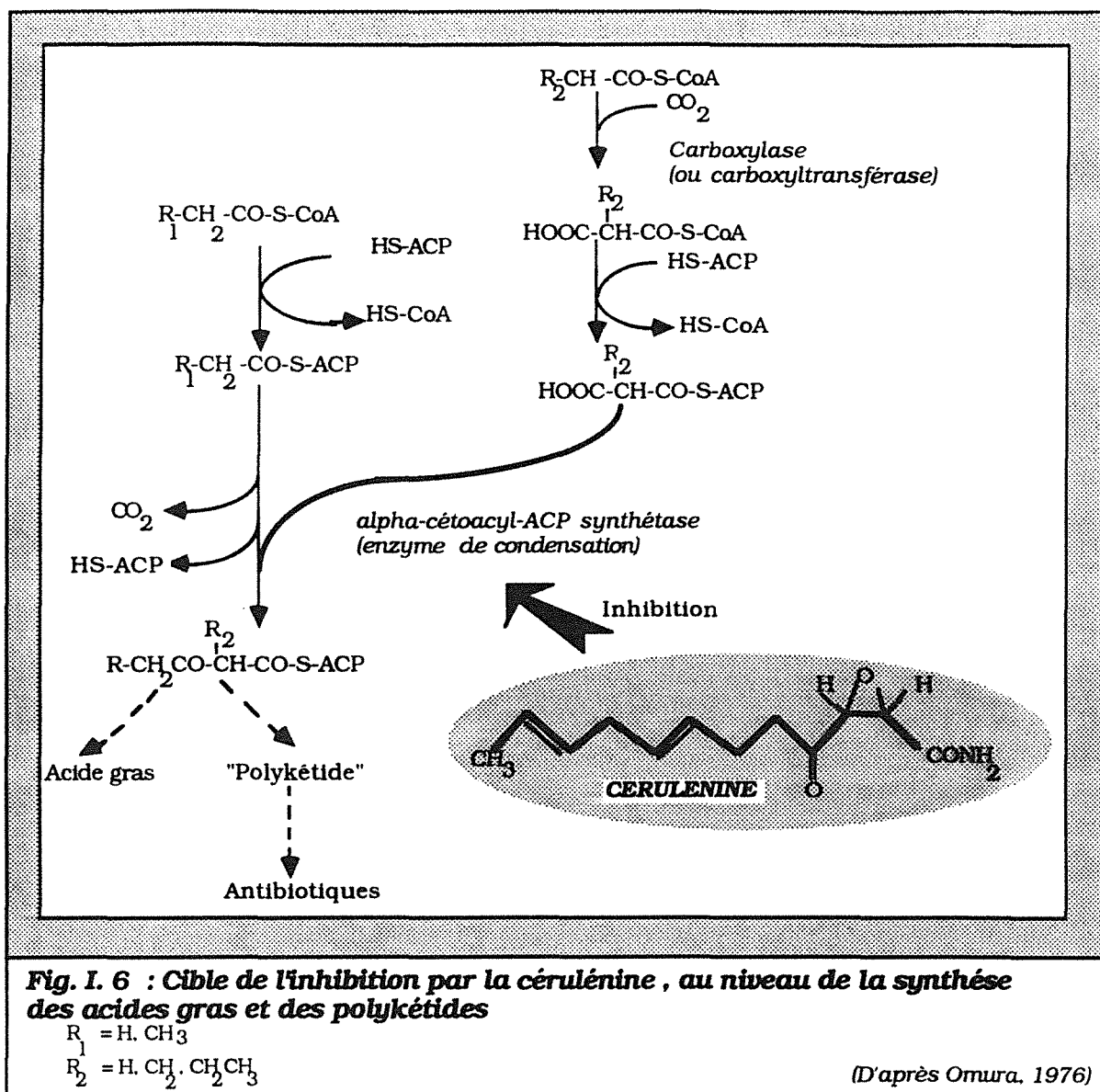
IV. 2. 1. Formation du protylonolide

L'étude de l'incorporation des précurseurs radioactifs dans la tylosine indique que le protylonolide est formé suite à la condensation de cinq propionates, deux acétates et un butyrate (Omura *et al.*, 1975 et 1977). Masumane *et al.* (1977) indiquent que cette condensation s'effectue selon un mécanisme semblable à la biosynthèse des acides gras à longues chaînes. Cette hypothèse fut confirmée par Omura *et al.* (1978) en étudiant l'inhibition de la tylosine par la céruléine. Cette dernière est un antibiotique, produit par *Cephalosporium caerulens*, inhibiteur de la synthèse des acides gras (Omura, 1976) (Fig. I. 6). Cependant aucune étude sur la "protylonolide synthétase" n'a été publiée jusqu'à présent. Des travaux plus récents de O'Hagan *et al.* (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 acyles marqués (^{13}C , ^{18}O) dans la tylactone accumulée par un mutant incapable de convertir cette dernière en tylosine. Ils suggèrent que la biosynthèse du protylonolide est semblable à celle de l'érythronolide. Elle s'effectuerait suite à une condensation successive des précurseurs (malonyl-CoA, méthylmalonyl-CoA, éthylmalonyl-CoA). Cette condensation serait suivie d'une réduction permettant la formation des groupements hydroxyles en position C3, C5 et C15.

IV. 2. 2. Conversion du protylonolide en tylosine

La conversion du protylonolide en tylosine passe d'abord par la formation de la tylactone. Cette dernière est le résultat de deux oxydations dont la première aboutit à la formation de la fonction aldéhyde à partir du méthyle en position C20. La deuxième oxydation correspond à l'hydroxylation du méthyle en position C23. La glycosylation par le mycarose de la tylactone ainsi formée conduit à la formation de la tylosine.

L'utilisation de la céruléine et des mutants de *S. fradiae* bloqués à différents niveaux de la biosynthèse de la tylosine a permis d'élucider les différentes étapes de conversion du protylonolide en cet antibiotique. En effet, la céruléine agissant en amont du protylonolide (Fig. I. 6) empêche toutes nouvelles biosynthèses de ce dernier, sans influencer les étapes ultérieures. Ceci permet de vérifier l'aptitude de certains dérivés du protylonolide à être convertis en tylosine par *S. fradiae*. L'attachement du mycaminoxyde à la tylactone est la première réaction permettant de convertir cette dernière en tylosine (Baltz et Seno, 1981).



Baltz *et al.* (1983) sont arrivés, grâce à l'utilisation de plusieurs mutants bloqués, à déterminer la voie préférentielle permettant la biosynthèse de la tylosine à partir de la tylactone (Fig. I. 7) :

- attachement du mycaminose à la tylactone, suivi par l'hydroxylation du méthyle en position C20.
- conversion du groupement hydroxyméthyle ainsi formé en formyle grâce à une déshydrogénation.
- hydroxylation du méthyle en position C23.
- addition du 6-désoxy-D-allose au groupement hydroxyméthyle en position C23.

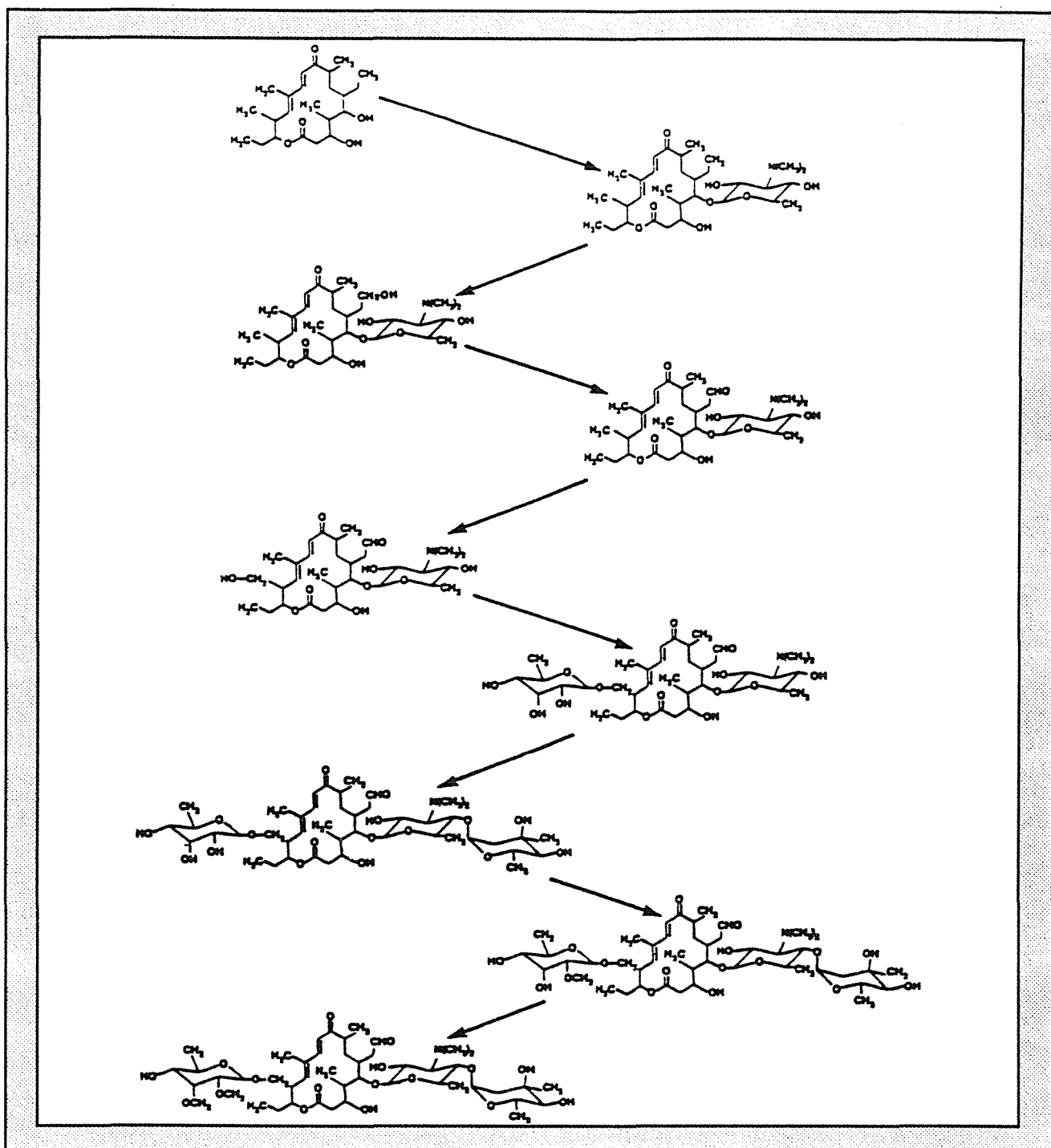


Fig. I. 7 : Etapes de la biosynthèse de la tylosine à partir de la tylactone

tylactone \longrightarrow O-mycamynosyl tylactone \longrightarrow 23-désoxy-20-dihydro-O-mycaminosyl tylonolide
 \longrightarrow 23-désoxy-O-mycaminosyl tylonolide \longrightarrow O-mycaminosyl tylonolide \longrightarrow
 diméthyllacténocine \longrightarrow diméthylmacrocine \longrightarrow macrocine \longrightarrow **tylosine**

(D'après Baltz et al., 1983)

- addition du mycarose au groupement 4-hydroxyle du mycaminose formant ainsi la diméthylmacroïne.

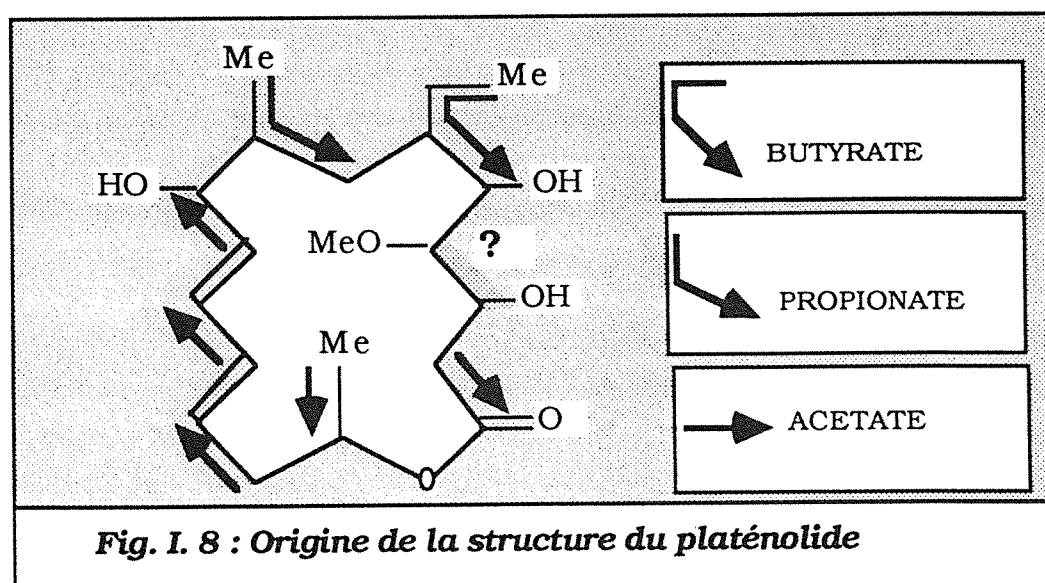
- méthylation de la diméthylmacroïne pour donner la macroïne, objet à son tour d'une nouvelle méthylation conduisant à la tylosine. Par la suite l'utilisation d'extraits acellulaires de *S. fradiae* par Omura *et al.* (1984 c) a indiqué que les deux enzymes catalysant l'hydroxylation des groupements méthyles en position C20 et C23 sont des dioxygénases utilisant l'alpha-cétoglutarate et l'O₂ comme substrats.

Enfin, la biosynthèse des désoxysucres et des aminosucres attachés aux aglycones des macrolides est effectuée à partir du glucose (Corcoran, 1981).

IV. 3. Biosynthèse de la spiramycine

IV. 3. 1. Biosynthèse du platénolide

Le groupement aglycone de la spiramycine est identique à celui de la leucomycine. Ce dernier a fait l'objet de plusieurs études. L'utilisation du ¹³C-acétate a permis à Omura *et al.*, (1975 et 1977) de montrer que cet acide gras est le précurseur direct des carbones 1, 2, 9, 16, 20 et 21 de la leucomycine. Par ailleurs, un faible enrichissement par le ¹³C-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 (C7, C8, C19) ou du butyrate (C6 et C18). Le travail effectué par Furumai *et al.* (1975) montre que le groupement formyle 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 5 unités acétate, une unité propionate et une unité butyrate. Seule l'origine des carbones en position 3 et 4 reste inconnue (Fig. I. 8).



Par ailleurs, la biosynthèse de la leucomycine et de la spiramycine sont inhibées par la céruléine (Omura et Takeshima, 1974 ; Takeshima *et al.*, 1977). La céruléine agit en amont du platénolide ; ainsi la biosynthèse de ce dernier serait due à l'action d'une polykétide synthétase.

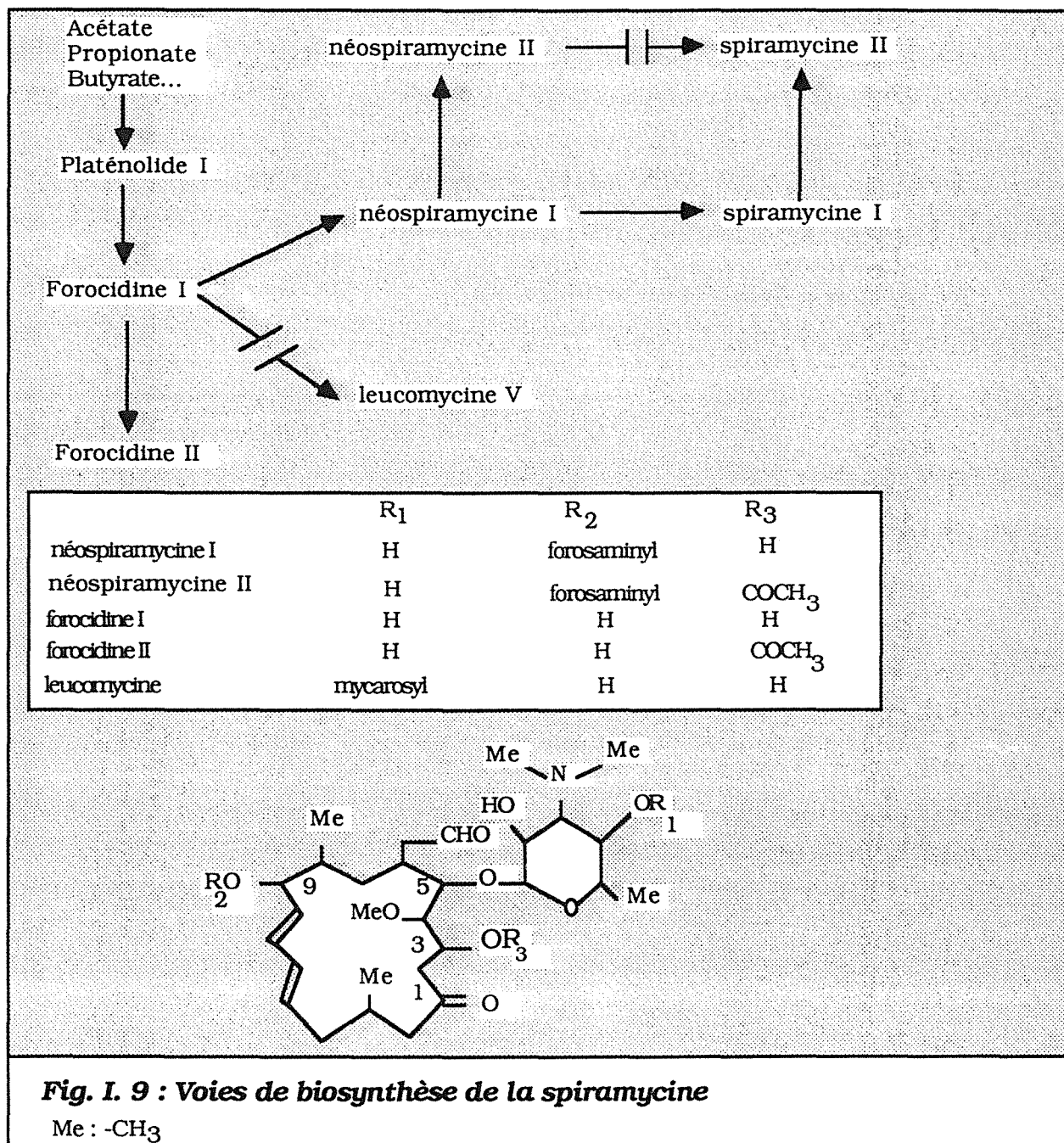
IV. 3. 2. Conversion du platénolide en spiramycine

En utilisant la céruléine lors de la synthèse de la spiramycine, différents intermédiaires ont été mis en évidence (Fig. I. 9). Ces études et la comparaison avec la biosynthèse de la leucomycine et de la tylosine, ont permis de proposer la voie de biosynthèse de la spiramycine dont les principales étapes sont :

- platénolide I
- forocidine I : •• glycosylation de l'hydroxyle en C5 par le mycaminose.
 - oxydation du C20 en fonction aldéhyde.
 - réduction du C9 de la fonction cétone en fonction alcool.
- néospiramycine I : glycosylation de la fonction hydroxyle du C9 par la forosamine.
- spiramycine I : osylation en position 4' du mycaminose par le mycarose. La formation des spiramycines II et III est la dernière étape dans cette biosynthèse. Elle est catalysée par la spiramycine I 3-hydroxylacylase qui transfère l'acétyle et le propionyle respectivement (Neuzil et Hostalek, 1986).

IV. 4. Origine des précurseurs

La spiramycine et la tylosine (Omura *et al.*, 1975) ont comme précurseurs les acides gras en C2, C3 et C4. Les acides gras activés en C2, C3 et C4 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 de 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 le métabolisme primaire et secondaire.



IV. 4. 1. Origine de l'acétate, propionate et butyrate

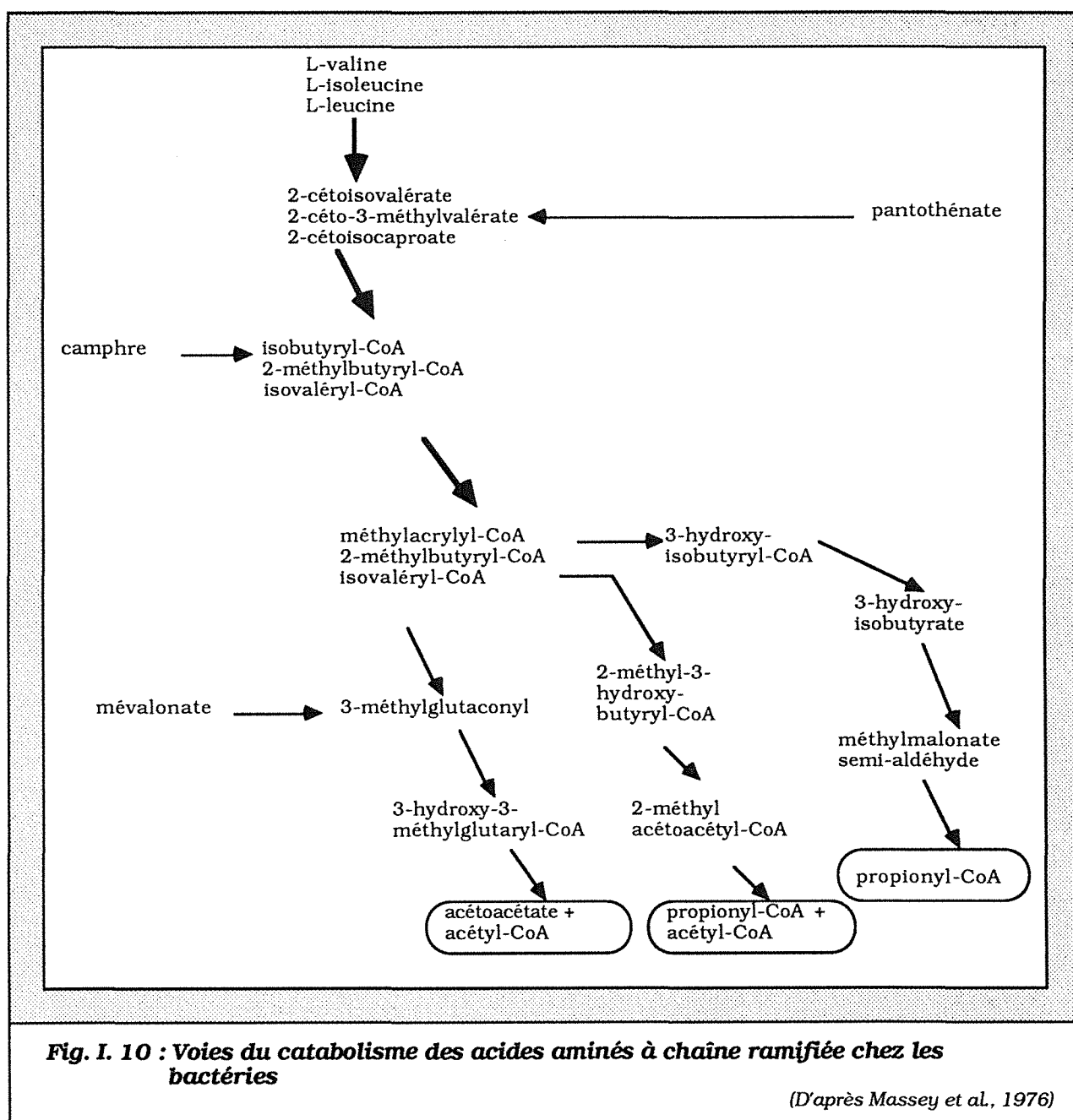
IV. 4. 1. 1. Substrat glucidique

Le catabolisme des sucres par la voie de la glycolyse est une source d'acétyl-CoA ; les travaux de Hseih et Matele (1970) montrent que le glucose est dégradé en pyruvate qui donne après l'action de la pyruvate-déshydrogénase, l'acétyl-CoA précurseur de l'aflatoxine qui est un polykétide dont la biosynthèse est proche de celle des macrolides.

Les mono-, di- et polysaccharides sont parfaitement métabolisés par *S. ambofaciens*, mais également le glycérol bien que n'étant pas un glucide (Ninet et Verrier, 1960). Ce dernier est engagé dans la glycolyse par l'intermédiaire de la dihydroxy acétone-phosphate puis du glycéraldéhyde-3-phosphate.

IV. 4. 1. 2. Substrat aminé

Un certain nombre d'acides aminés sont d'excellents précurseurs de la tylosine et de la spiramycine (Fig. I. 10).



Dans le cas de la tylosine, la valine, l'isoleucine et la méthionine sont catabolisées en propionyl-CoA ou méthylmalonyl-CoA, molécules directement liées à la synthèse de l'aglycone. Des études d'incorporation des aminés marqués au ^{14}C ont montré leur participation dans la formation de la tylactone (Dotzalf *et al.*, 1984).

La leucine et la phénylalanine sont intégrées dans la tylosine via l'acéto-acétyl-CoA produit. Cette molécule peut être scindée en deux acétyl-CoA ou réduite pour former du butyryl-CoA. Les résultats obtenus par Vancura *et al.* (1988) ont indiqué l'intervention du catabolisme de la thréonine comme source d'acétyl-CoA dans la biosynthèse de la tylosine.

La valine outre le propionyl-CoA, fournit auparavant de l'isobutyryl-CoA incorporé dans l'aglycone sous forme de butyrate (Omura *et al.*, 1983a et 1984c). Le butyrate pourrait aussi avoir comme origine la condensation de deux unités acétate. Cette voie est suggérée être une source de butyrate pour la biosynthèse de plusieurs polyéthers (Westley, 1981).

En revanche, la proline, l'arginine, l'asparagine la glutamine et le glutamate ont un faible taux d'incorporation dans le macrocycle.

Par ailleurs, l'alanine marquée permet l'enrichissement isotopique du carbone de la tétracycline dont l'unité de base est l'acétyl-CoA (Behal *et al.*, 1983). Plusieurs acides aminés sont dégradés jusqu'au stade final d'acétyl-CoA : l'alanine, la cystéine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine ... Le propionate peut être fourni par la dégradation de certains acides aminés tels que, la méthionine, la thréonine, la valine et l'isoleucine. Il peut aussi dériver du succinate fourni par le cycle de Krebs (Corcoran, 1981).

IV. 4. 1. 3. Substrat lipidique

L'oxydation des acides gras à longues chaînes apporte les unités nécessaires à la formation du cycle lactonique. Les acides gras à nombre pair de carbones fournissent l'acétyl-CoA ou le butyryl-CoA si on suppose une dégradation incomplète. Les acides gras à nombre impair de carbones sont catabolisés en propionyl-CoA et acétyl-CoA. Les acides gras à longues chaînes comme le palmitate, l'oléate et le méthyl-oléate stimulent la production de spiramycine (Khaoua, 1990). L'utilisation de précurseurs radioactifs montre l'incorporation des atomes de carbone provenant de l'acide hexanoïque (Dutton, 1988) et de l'acide palmitique (Tanaka *et al.*, 1986) dans la tylosine. Le propionate peut être fourni par la dégradation d'acides gras à nombre impair de carbone, d'acides gras ramifiés ou insaturés.

Les unités acides gras à courte chaîne en C2 ou C3 peuvent également servir de précurseurs après activation.

IV. 4. 2. Activation enzymatique des acides gras à courtes chaînes

L'incorporation de l'acétate, du propionate et du butyrate au niveau des macrolides s'effectue sous forme de malonyl-CoA, de méthylmalonyl-CoA et d'éthylmalonyl-CoA.

IV. 4. 2. 1. Activation des acides acétique et propionique

Chez les *Streptomyces*, elle peut se faire par l'intermédiaire de deux systèmes enzymatiques. Le premier système se fait en deux étapes. Au cours de la première étape, acétate et propionate sont phosphorylés en acétyl-phosphate et propionyl-phosphate par une kinase. Au cours de la deuxième étape, les acyl-phosphate sont transformés en acyl-CoA par une acylphosphotransférase. Le deuxième système d'activation fait intervenir des acyl-CoA synthétases.

Chez *S. ambofaciens*, le premier système est actif durant la phase de croissance et durant la phase de production de la spiramycine, alors que le deuxième système n'est actif que durant la phase exponentielle. La biosynthèse du premier système chez *S. ambofaciens* est stimulée par l'addition d'acides gras (acétate, propionate et butyrate) en début de phase de croissance et début de phase stationnaire ; parallèlement, la production de spiramycine est augmentée (Khaoua *et al.*, 1992).

IV. 4. 2. 2. Origine des unités malonyl-CoA, méthylmalonyl-CoA et éthylmalonyl-CoA

IV. 4. 2. 2. 1. Malonyl-CoA

La régénération du malonyl-CoA peut avoir lieu de deux façons différentes :

- par carboxylation de l'acétyl-CoA catalysée par l'acétyl-CoA-carboxylase, enzyme nécessitant la présence de magnésium et de l'ATP.
- par décarboxylation oxydative de l'oxaloacétate. Ce dernier peut être produit suite à l'action de la phospho-énol-pyruvate-carboxylase, à partir du phospho-énol-pyruvate.

Chez *S. ambofaciens*, il a été montré que sur milieu contenant de la valine comme unique source d'azote, la synthèse du malonyl-CoA passait par l'acétyl-CoA, provenant du pyruvate ou de l'acétate, et carboxylé par l'acétyl-CoA-carboxylase (Laakel, 1992).

IV. 4. 2. 2. 2. Méthylmalonyl-CoA et éthylmalonyl-CoA

Le méthylmalonyl-CoA peut être produit par plusieurs voies :

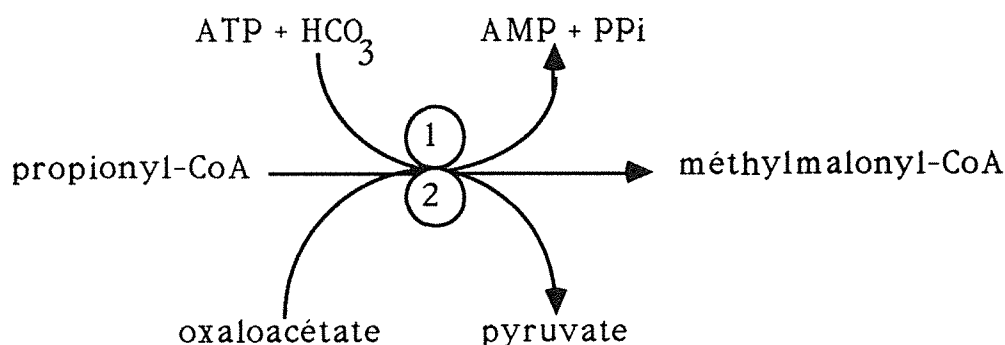
- par catabolisme de la valine.
- par carboxylation du propionate sous l'action d'une carboxylase ou d'une carboxyltransférase.
- par isomérisation du succinate, intermédiaire du cycle de Krebs .

L'acide aminé le plus étudié comme précurseur de méthylmalonyl-CoA, aussi bien pour la biosynthèse des polyéthers que celle des macrolides, est la valine. Omura *et al.* (1983a) montrent que le mode d'incorporation de cet acide aminé dans la tylosine prouve qu'il est d'abord converti en butyrate avant de donner le méthylmalonate. Ils proposent la voie suivante :

Valine \longrightarrow isobutyrate \longrightarrow butyrate \longrightarrow méthylmalonyl-CoA

Les travaux de Reynolds et Robinson (1985) sur *Streptomyces cinnamonensis*, producteur de monensine A, ont montré que l'isobutyrate peut être converti soit en butyrate soit en méthylmalonyl-CoA par un réarrangement interne. Pour la conversion du butyrate en méthylmalonyl-CoA, Omura *et al.* (1976) avaient suggéré une réaction en deux étapes : par gamma-oxydation, le butyrate donnerait le succinate qui serait isomérisé en méthylmalonate par l'action d'une méthylmalonyl-CoA-mutase.

La carboxylation du propionyl-CoA peut se faire selon deux réactions : par une propionyl-CoA carboxylase avec consommation d'ATP ou par une méthylmalonyl-CoA-carboxyltransférase (Martin, 1979) :



1 : propionyl-CoA-carboxylase

2 : méthylmalonyl-CoA-carboxyltransférase

Bien que ces deux systèmes de carboxylation du propionyl-CoA soient présents chez *S. fradiae*, celui mettant en jeu la carboxyltransférase est plus actif que le premier (Gray et Buwapathanapun, 1980). Les activités des deux carboxylases sont corrélées avec la production de la tylosine (Vu-Trong et Gray, 1982 et 1984).

Chez *S. erythreus*, la carboxylation du propionyl-CoA en méthylmalonyl-CoA est catalysée par la propionyl-CoA-carboxylase dont l'activité est corrélée avec la production de l'érythromycine (Raczynka-Bojanowska *et al.*, 1973).

L'intervention du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique en tant que sources de succinate précurseurs des polykétides a été proposée dans le cas de la leucomycine (Omura *et al.*, 1976) et de la rifampicine (Lancini et Grandi, 1981). Dans ces cas, le succinate est isomérisé en méthylmalonyl-CoA sous l'action de la méthylmalonyl-CoA mutase. L'activité de cette enzyme a été montrée chez *Streptomyces erythreus* ; elle est corrélée à la biosynthèse de l'érythromycine (Hunaiti et Kolattukudy, 1982).

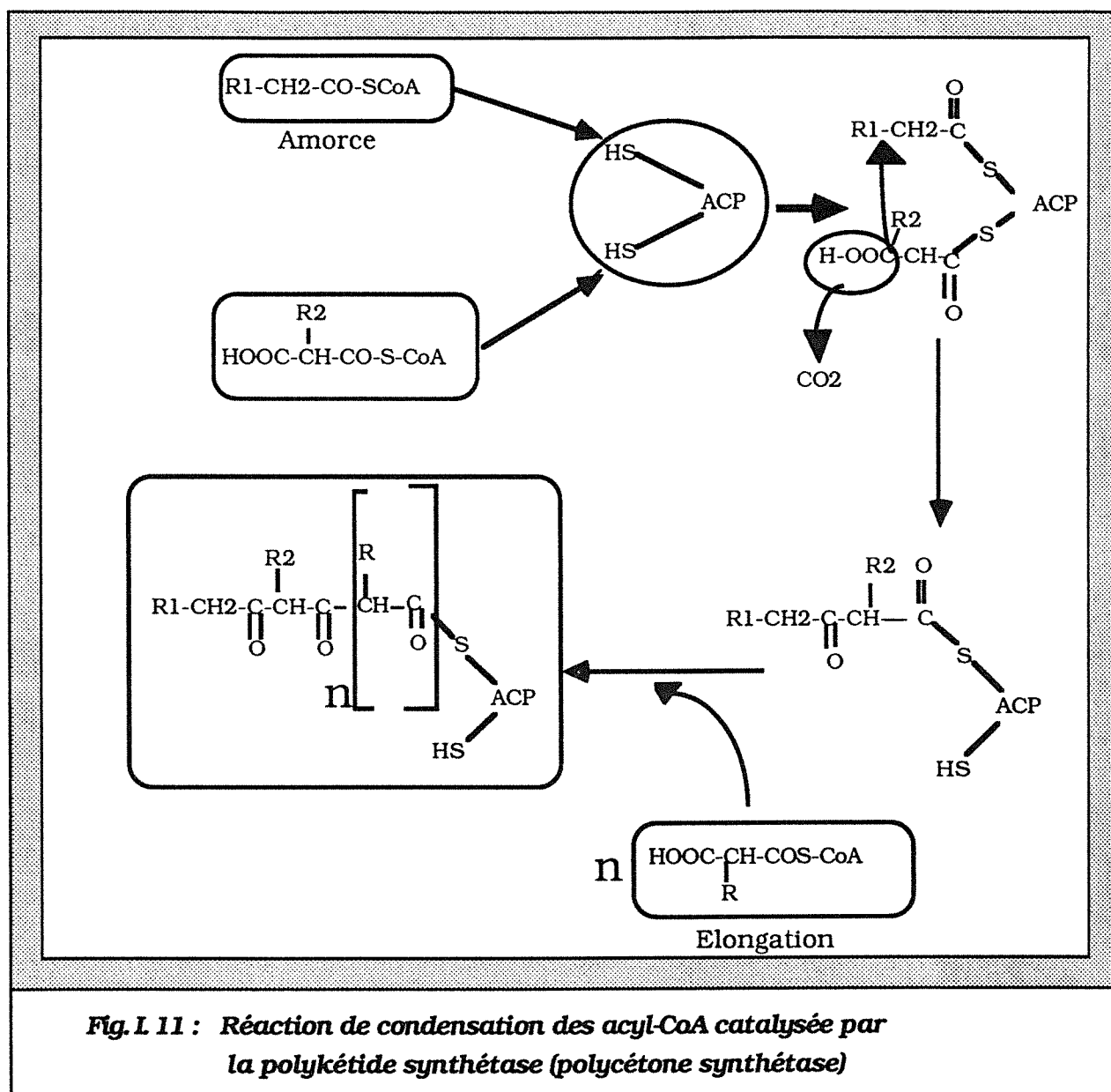
La conversion du butyrate en éthylmalonate est mentionnée chez certaines espèces productrices de macrolides à 16 membres (Omura et Nakagawa, 1981).

IV. 4. 3. Condensation des acyl-CoA

La polykétide synthétase est un complexe enzymatique similaire à celui nécessaire à la condensation des acides gras (bêta-céto-acyl-ACP synthétase) (Fig. I. 6). En effet, tout deux sont inhibés par la cérulénine. Peu d'études ont été faites sur cette enzyme. Chez *S. erythreus*, producteur de l'érythromycine, macrolide à 14 membres, ce complexe enzymatique a été partiellement identifié (Roberts et Leadlay, 1984). Malgré l'instabilité du complexe, les auteurs ont détecté un polypeptide de 37 kDa actif envers la ³H-tétrahydro-cérulénine. Ce pourrait être une sous-unité d'un dimère de masse moléculaire de 75 kDa trouvé par ces auteurs. Son mécanisme d'action est représenté sur la Fig. I. 11.

De nombreuses études en génétique moléculaire portant sur la biosynthèse de certains macrolides telles que l'érythromycine, la tylosine et la spiramycine sont en cours. Les techniques utilisées sont entre autres : la création et la caractérisation de mutants bloqués, la complémentation génique de ces mutants ainsi que le séquençage des régions PKS (Polykétide synthétase).

Dans le cas de la biosynthèse de la spiramycine par *S. ambofaciens* de nombreux gènes PKS et certains gènes codant pour les étapes tardives de la biosynthèse de la spiramycine, associés à un gène de résistance, ont été identifiés sur un segment de 40 kb (Hopwood et Sherman, 1990).



IV. 4. 4. Résidus glucidiques

Les unités glucidiques dérivent du glucose. Les travaux de Pape et Brillinger (1973) ont montré que le mycarose se fixait sur l'aglycone de la tylosine de *Streptomyces rimosus* sous forme de dTDP-mycarose. Cet ose activé est le résultat de l'association du dTDP-glucose et de la S-adénosyl-L-méthionine (Madry et Pape, 1982). Les méthylations de l'hexose s'effectuent lors des dernières étapes de synthèse de la tylosine par la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), par action de la macrocine O-méthyl transférase (Seno et Baltz, 1981 ; Bauer *et al.*, 1988).

V. MECANISMES GENERAUX DE REGULATION DU METABOLISME SECONDAIRE

La synthèse des métabolites secondaires est soumise à tout un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. La régulation s'exerce soit directement et spécifiquement sur les gènes ou les enzymes de synthèse des métabolites secondaires, soit indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires précurseurs. Les facteurs influençant la production d'un métabolite secondaire sont généralement mis facilement en évidence mais les gènes ou les enzymes cibles restent souvent méconnus. Les différents mécanismes de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires, en particulier des antibiotiques, ont été abondamment répertoriés par Piret et Demain (1988).

V. 1. Initiation de la biosynthèse

V. 1. 1. Facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements n'est pas à négliger. Peu d'études sont rapportées dans la littérature vraisemblablement du fait de l'optimisation le plus souvent empirique de ces paramètres. D'autre part, les mêmes facteurs physico-chimiques déterminent la cinétique de croissance du microorganisme producteur et leur choix est généralement réalisé en fonction de celle-ci.

La température peut avoir une influence notable sur la production des antibiotiques. L'optimisation de la température peut conduire soit à une amélioration des titres en métabolites secondaires soit à une diminution de la durée de la fermentation. Ainsi, la fermentation de *S. erythreus* pour la production d'érythromycine peut être raccourcie d'une centaine d'heures sans perte significative sur la production en antibiotique lorsque la température est régulée à 37°C au lieu de 32°C (Cheruy et Durand, 1979). Les températures optimales pour la croissance et pour la biosynthèse des métabolites secondaires pouvant par ailleurs différer, l'application d'un profil variable de températures au cours de la fermentation est envisageable (Weinberg, 1982).

En milieu non tamponné, le pH varie tout au long de la fermentation par suite du métabolisme cellulaire. Vandamme *et al.* (1981) ont montré que l'augmentation du pH au cours de la culture de *Bacillus brevis* inhibait la croissance et la production de gramicidine S. Une valeur de pH à 7,3, valeur moyenne entre la valeur optimale pour la croissance (7,0) et la valeur optimale pour l'activité des enzymes de synthèse de l'antibiotique (7,6), a été choisie, et

sa régulation a permis d'augmenter les titres de gramicidine S. La gamme de pH optimale pour la biosynthèse des métabolites secondaires peut parfois être très étroite : c'est le cas de la production de thiostrepton par *Streptomyces laurentii* qui nécessite une régulation du pH entre 6,0 et 6,2 (Suzuki *et al.*, 1987).

L'oxygène peut constituer un important facteur limitant. La variable opératoire à maîtriser est en fait l'oxygène dissous dont l'effet sur la biosynthèse des métabolites secondaires serait modulé par la composition du milieu. Par exemple, la production de céphamycine C par *Streptomyces clavuligerus* est maximale en milieu complexe lorsque la saturation en oxygène dissous est atteinte, elle est par contre défavorisée en milieu chimiquement défini par des niveaux d'oxygène dissous trop élevés (Rollins *et al.*, 1988 et 1989). Concernant la synthèse de gramicidine S par *B. brevis*, la même observation avait été faite par Vandamme *et al.* (1981) qui suggéraient le rôle de la viscosité des milieux dans les transferts d'oxygène vers les cellules et par suite dans la modulation du taux de croissance et de l'activité des enzymes de synthèse de l'antibiotique. L'effet propre de l'oxygène dissous a été déterminé pour *S. clavuligerus* en milieu glycérol-asparagine : de faibles niveaux d'oxygène dissous entraînent une diminution du taux de croissance du microorganisme et parallèlement une augmentation de la vitesse de production et des productions maximales de céphamycine (Rollins *et al.*, 1989). La formation de céphalosporine C par *Cephalosporium acremonium* est également soumise à une régulation par l'oxygène qui est le cofacteur d'une enzyme de la voie de biosynthèse (Scheidegger *et al.*, 1988). Une étude récente de l'influence des pressions totale et partielle en oxygène sur la croissance et la formation des métabolites secondaires chez des Actinomycètes met en évidence des comportements différents (stimulation ou inhibition) selon le microorganisme considéré (Liefke *et al.*, 1990). La teneur en oxygène dissous apparaît donc comme un paramètre important de régulation qu'il est facile de contrôler en fermenteur.

V. 1. 2. Inoculum

L'importance de l'inoculum pour la productivité ultérieure des cultures est depuis longtemps reconnue, toutefois peu d'études de fond ont été consacrées à ce sujet (Foster, 1949 ; Calam, 1976). L'importance quantitative et l'âge de l'inoculum sont généralement les deux seuls paramètres considérés (Brown et Zainudeen, 1978). La qualité de l'inoculum définie par des propriétés physiologiques et biochimiques reste rarement évoquée. Les caractéristiques morphologiques pour les microorganismes filamenteux sont également à prendre en compte (Whitaker et Long, 1973). L'influence de l'inoculum peut s'expliquer par une "mémoire biochimique" des cellules acquise au cours de leur croissance et un effet d'apport au milieu de production de différents métabolites élaborés dans le milieu de préculture (Meyrath et Suchanek, 1972).

Une étude intéressante a été réalisée par Smith et Calam (1980) concernant les productions de pénicilline et de griséofulvine par des souches de *Penicillium*. D'une part, ils ont montré d'un point de vue morphologique que les pelotes de mycélium denses conduisaient à de plus faibles productivités que les pelotes ouvertes. Ils ont d'autre part caractérisé les inocula à fort et faible rendement en antibiotique par des activités enzymatiques isocitrate et glucose-6-phosphate déshydrogénases différentes : les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les deux activités étaient équilibrées (Novikova et Makarevich, 1984). La potentialité optimale de l'inoculum correspond ainsi à une activité respiratoire maximale. De même, les inocula les plus performants de *Streptomyces antibioticus*, producteur d'oléandomycine, se caractérisent par un taux de croissance élevé, une activité succinate déshydrogénase importante et un niveau d'ATP maximum (Rudakova et Malkov, 1987).

V. 1. 3. Facteurs nutritionnels

Alors qu'une bonne croissance des microorganismes est généralement obtenue dans des milieux de culture divers, la production des métabolites secondaires nécessite des milieux spécifiques. La composition du milieu va non seulement influencer les rendements en un métabolite donné mais aussi les proportions des différents constituants lorsque le métabolite secondaire est synthétisé sous forme d'une famille de produits (Chopra *et al.*, 1979; Malik, 1982).

Il est couramment admis que le métabolisme secondaire s'exprime lorsque la croissance du microorganisme producteur devient limitée par un des substrats essentiels du milieu. Les sources de carbone, d'azote et de phosphate sont les trois principaux facteurs limitants. Les sels minéraux ont également un rôle de régulation non négligeable (activation ou inhibition des enzymes de synthèse des idiolites) mais leur épuisement ne suffirait pas à initier le métabolisme secondaire.

V. 1. 3. 1. Source de carbone

La plupart des milieux contiennent une source de carbone, telle que le glucose, rapidement métabolisable par les microorganismes pour leur croissance. Or cette source de carbone peut exercer une répression et/ou une inhibition du métabolisme secondaire en régulant la biosynthèse ou l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des métabolites. De nombreuses productions d'antibiotiques sont ainsi soumises à la répression catabolique, par le glucose le plus généralement, ou par le glycérol, voire le citrate (Martin et Demain, 1980 ; Demain, 1982 ; Bushell, 1989).

Les mécanismes moléculaires de cette régulation ne sont pas encore totalement élucidés. Des effets indirects ont parfois été mis en évidence. Par exemple,

l'inhibition de la production de la bacitracine par le glucose chez *Bacillus licheniformis* est due à une diminution du pH du milieu, occasionnée par la formation d'acides organiques au cours du métabolisme du glucose (Haavik, 1974). D'autres cas sont répertoriés par Vining et Doull (1988).

Les effets directs concernent la répression de la synthèse, l'inhibition de l'activité ou l'inactivation des enzymes spécifiques de biosynthèse (ou "synthétases") des métabolites secondaires (Demain, 1982). Les cas décrits par la littérature sont répertoriés dans la tableau I. 4.

Quel est le véritable effecteur de la répression par la source de carbone ? La question reste le sujet de controverses. Dans aucun cas le rôle du 3,5-adénosine monophosphate cyclique (AMPC) n'a pu être clairement mis en évidence comme cela a été démontré pour la répression catabolique du métabolisme primaire chez les entérobactéries principalement. L'addition de l'AMPC à des cultures de *Streptomyces kanamyceticus* supprime en effet la répression exercée par le glucose sur la production de kanamycine (Sato *et al.*, 1976). Elle ne lève cependant pas la répression du glucose sur les actinomycines synthétases chez *S. antibioticus* (Brown *et al.*, 1983). Le rôle de la glucokinase ou d'un produit de cette enzyme (glucose phosphorylé) dans le mécanisme de régulation du métabolisme secondaire par la source de carbone a été proposé (Piret et Demain, 1988 ; Vining et Doull, 1988).

Pour contrevenir aux effets négatifs de concentrations trop élevées en sources carbonées aisément utilisables, des procédés de fermentations optimisés, utilisent des sources de carbone lentement assimilées par la souche, ou un apport contrôlé de la source carbonée rapidement métabolisée ainsi que des autres constituants du milieu (procédé semi-continu).

Certaines voies de biosynthèse ne sont pas marquées par un tel contrôle. La biosynthèse de la plupart des aminoglycosides (dérivés du glucose) et celle du chloramphénicol ne sont pas bloquées par un excès de ce substrat (Malik, 1982).

<i>Antibiotique</i>	<i>Microorganisme</i>	<i>Enzyme ou processus réprimé</i>	<i>Nutiment répresseur</i>
Actinomycine	<i>S. antibioticus</i>	Phénoxazinone synthétase	Glucose
	<i>S. parvulus</i>	Hydroxy-kynuréninase	
	<i>S. parvulus</i>	Kynurénineform-amidase II	Glucose, glycérol
		Tryptophane pyrrolase	Glucose, glycérol
Céphamycine	<i>S. parvulus</i> <i>Nocardia lactamdurans</i>	Désacétoxy-céphalosporine C synthétase (expandase)	Glucose
Céphamycine	<i>S. clavuligerus</i>	Désacétoxy-céphalosporine C synthétase (expandase)	Glycérol
Désacétyl-Céphalosporine C	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Céphalosporine C acétylhydrolase	
Kanamycine	<i>S. kanamyceticus</i>	N-acétylkanamycine amidohydrolase	Glucose, mannose, Fructose, maltose, Lactose
Néomycine	<i>S. fradiae</i>	Phosphatase	Glucose
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Incorporation de [¹⁴ C] valine	
Puromycine	<i>S. alboniger</i>	O-Déméthyl-puromycine O-méthyltransférase	Glucose
Streptomycine	<i>S. griseus</i>	Mannosidostreptomycinase	Glucose, dextrines Galactose, Mannose
Tétracycline	<i>S. ambofaciens</i>	Anhydrotétracycline oxygénase	Glucose
Tylosine	<i>S. fradiae</i>	Carboxyltransférase Carboxylase	Glucose

Tableau I. 4 : Quelques exemples de cibles enzymatiques réprimées par les sources carbonées

S. : Streptomyces (Adapté d'après Martin, 1989)

V. 1. 3. 2. Source d'azote

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe nettement sur les rendements de production. De même que pour la source de carbone, la biosynthèse des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables, en particulier par les sels d'ammonium (Aharonowitz, 1980 ; Okanishi et Hotta, 1980). Les acides aminés constituent alors souvent des sources d'azote de choix car leur lente dégradation entretient une limitation en azote.

L'action des ions ammonium peut se situer au niveau du taux de croissance, au niveau de l'activité ou de la formation des enzymes du métabolisme primaire et au niveau plus direct de la formation ou du fonctionnement des enzymes responsables du métabolisme secondaire.

Le point central de ce métabolisme est l'ammonium apporté sous forme de sel ou produit au cours du métabolisme des acides aminés, des protéines, des nitrates.

Beaucoup d'antibiotiques possédant un atome d'azote dans leur structure, des mécanismes de contrôle très fins doivent réguler les voies du catabolisme et d'assimilation de la source d'azote afin d'assurer un apport de cet élément aussi bien pour la croissance que pour le métabolisme secondaire (Aharonowitz, 1980).

Le tableau I. 5 résume des exemples de répression spécifique par la source d'azote de certaines enzymes du métabolisme secondaire ainsi que d'autres enzymes qui synthétisent des précurseurs du métabolisme secondaire.

<i>Antibiotique</i>	<i>Microorganisme producteur</i>	<i>Cible d'action</i>
Céphamycine Céphalosporine	<i>S. clavuligerus</i> <i>Cephalosporium acremonium</i>	cyclase, expandase cyclase, expandase
Tylosine Leucomycine Patuline	<i>S. fradiae</i> <i>Streptovercillium kitasatoensis</i> <i>Penicillium urticae</i>	valine déshydrogénase valine déshydrogénase m-hydroxybenzyl alcool déshydrogénase
Tableau I. 5 : Quelques cibles d'action de la régulation par la source d'azote		
S. : <i>Streptomyces</i>		(D'après Martin, 1989)

En relation avec le métabolisme de l'azote des acides aminés et la synthèse de protéines, les messagers nucléotidiques polyphosphorylés, ppGpp (guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate) et pppGpp (guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate) ont retenu l'attention des spécialistes du métabolisme secondaire ces dernières années. En effet, ces molécules sont des facteurs très importants de régulation du métabolisme général des bactéries chez lesquelles ils ont été mis en évidence dans des conditions de limitation en acides aminés. Ils ont pour effet de moduler la synthèse de l'ARN et par suite celle des protéines en fonction de la disponibilité en acides aminés dans le milieu environnant (Cashel, 1975 ; Ingraham *et al.*, 1983). Leur rôle dans l'initiation du métabolisme secondaire a maintenant été proposé chez *B. subtilis* ; Ochi et Ohsawa (1984) ont montré que le démarrage de la production d'antibiotique était conditionné par un épuisement du milieu en aspartate et s'accompagnait d'une augmentation des concentrations en ppGpp et pppGpp. Quant aux *Streptomyces*, la mise en évidence de la présence de ppGpp et de pppGpp chez de nombreuses espèces laissait déjà supposer que ces molécules avaient également une fonction importante pour ces microorganismes "spécialisés" dans le métabolisme secondaire (An et Vining, 1978). L'étude de la synthèse de formycine chez *Streptomyces sp* MA406-A-1 dans différentes conditions nutritionnelles prouve le rôle (direct ou indirect) de la guanosine tétraphosphate dans l'initiation de la production de l'antibiotique. Lorsque la souche est transférée d'un milieu riche dans un milieu pauvre en acides aminés, la concentration intracellulaire en ppGpp

augmente et la production en formycine est multipliée par huit dans le même temps. L'isolement de mutants incapables d'accumuler les guanosines polyphosphorylées en milieu limité en azote confirme ce résultat ; ces mutants sont également incapables de synthétiser l'antibiotique (Ochi, 1986). D'autres mutants du type décrit ont été depuis isolés chez *S. antibioticus* et *Streptomyces griseoflavus*, producteurs respectivement d'actinomycine et de bicozamycine, (Ochi, 1988). Ces différents travaux ont également mis en évidence le rôle des nucléotides polyphosphorylés dans la régulation de la différenciation cellulaire de ces microorganismes.

L'effet négatif des sources d'azote peut être éliminé par le choix dans le milieu de culture d'un substrat naturel approprié (farine de soja) ou d'acides aminés lentement métabolisés (cas de la proline pour la production de streptomycine). L'addition d'agents trappeurs des ions ammonium tels que le phosphate de magnésium ou le zéolite permet dans certains cas d'augmenter la production de divers antibiotiques en piégeant l'excès d'ions ammonium présents dans le milieu de culture (Omura, 1986b). En effet, les productions de tylosine et de cérulénine sont améliorées respectivement de 3 et 7 fois quand la fermentation est additionnée de 1% de zéolite naturel (Omura et Tanaka, 1986b).

V. 1. 3. 3. Source de phosphate

Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate. Les biosynthèses d'antibiotiques appartenant à différents groupes biosynthétiques, soumises à une régulation par le phosphate inorganique ont été répertoriées par Liras *et al.* (1990) (Tableau I. 6). L'examen des gammes de concentrations en phosphate autorisant une production des antibiotiques révèle qu'au delà de 10 mM, le phosphate est généralement inhibiteur. Il existe toutefois des exceptions notables ; la thiopeptine (Miyairi *et al.*, 1970) et la nocardicine (Aoki *et al.*, 1976) ont été mises en évidence dans des milieux de culture contenant 100 à 200 mM de phosphate. Dans de nombreux cas, la synthèse de l'antibiotique débute lorsque le milieu est carencé en phosphate (ex : candidicine, tétracycline, tylosine).

<i>Antibiotique</i>	<i>Microorganisme producteur</i>	<i>Cible enzymatique</i>	<i>Mécanisme de régulation</i>
Candidine	<i>S. griseus</i>	p-aminobenzoate synthétase	R
Céphalosporine C	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Désacétoxycephalosporine C synthétase	
Céphamycine	<i>S. clavuligerus</i>	Désacétoxycephalosporine C synthétase	R
		Isopénicilline N synthétase	I
		α -aminoadipyl-cysteinyl-valine-synthétase	I
Céphamycine	<i>S. lactamdurans</i>	Désacétoxycephalosporine C synthétase	I
Gramicidine S	<i>Bacillus brevis</i>	Gramicidine S synthétase	
Néomycine	<i>S. fradiae</i>	Néomycine phosphate phosphotransférase	R
Streptomycine	<i>S. griseus</i>	Streptomycine-6-phosphate phosphotransférase	R
Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Anhydrotétracycline oxygénase	R
Tylosine	<i>S. fradiae</i>	Valine déshydrogénase	
		Méthylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase	
		Propionyl-CoA carboxylase	
		Protylonolide synthétase	
	<i>S. T59-235</i>	dTDP-D-glucose-4,6-déshydratase	R
		dTDP-mycarose synthétase	R
		Macroline O-méthyltransférase	R

Tableau I. 6 : Exemples de régulation par les phosphates des enzymes impliquées dans la biosynthèse des antibiotiques

S. : Streptomyces ; R: répression ; I: inhibition

(D'après Liras et al., 1990)

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet phosphate sur la production des métabolites secondaires (Martin, 1977) :

- Les ions phosphate favorisent le métabolisme primaire. Lorsqu'ils sont limitants, une baisse du métabolisme primaire déréprime le métabolisme secondaire. Pour comprendre l'effet inhibiteur des phosphates sur le métabolisme secondaire, il est nécessaire de considérer en premier lieu le rôle des phosphates en tant qu'effecteur de plusieurs réactions enzymatiques du métabolisme primaire. Les phosphates contrôlent la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines, le métabolisme carboné, la respiration cellulaire ainsi que le niveau d'ATP chez les producteurs. Ainsi, Hostalek (1964) observa qu'une augmentation de la concentration en phosphates lors de la production d'antibiotiques entraînait une augmentation de la respiration et au même moment l'arrêt de la biosynthèse de chlortétracycline. L'addition des phosphates entraîne donc une transition du métabolisme secondaire (production d'antibiotiques) vers le métabolisme primaire (croissance végétative).

- Les ions phosphate réorientent les voies du catabolisme carboné. Cette hypothèse suggère que des concentrations croissantes en phosphate dans le milieu diminuent l'activité de la voie des pentoses-phosphates et favorisent la glycolyse. En effet, des inhibiteurs de la glycolyse stimulent la biosynthèse de la chlortétracycline (Herold et Hostalek, 1965).

- Les ions phosphate limitent la synthèse des inducteurs des voies de biosynthèse des antibiotiques. Ainsi, Robbers *et al.* (1972) suggèrent qu'une forte concentration en phosphate limite la formation du tryptophane. Ce dernier est un inducteur de la production d'alcaloïdes chez *Aspergillus fumigatus*.

- Les ions phosphate inhibent la formation des précurseurs des antibiotiques. La biosynthèse des antibiotiques polykétides et les macrolides est sensible aux phosphates (Corcoran, 1973). En effet, la formation d'unités malonyl-CoA et/ou méthylmalonyl-CoA se fait soit par carboxylation d'acétyl-CoA grâce à une acétyl-CoA carboxylase ou par une réaction de transcarboxylation dans laquelle l'oxaloacétate est le groupement donneur de carboxyle. Or, la formation d'oxaloacétate par l'action de la PEP-carboxylase est une étape inhibée par les phosphates et l'ATP.

Chez les souches surproductrices de chlortétracycline, la diminution de l'activité enzymatique du cycle de Krebs est corrélée avec la diminution de la capacité de la chaîne respiratoire et un faible taux d'ATP formé (Hostalek, 1964). En effet, certains intermédiaires carbonés formés durant le métabolisme carboné ne passent pas par le cycle de Krebs mais entrent directement dans la biosynthèse de chlortétracycline. Les phosphates qui activent la chaîne respiratoire et la synthèse de macromolécules augmentent les activités enzymatiques du cycle tricarboxylique et ainsi abaissent la concentration en précurseurs nécessaires à la biosynthèse de l'antibiotique.

- Les ions phosphate inhibent ou répriment les phosphatases nécessaires à la biosynthèse de certains antibiotiques. Ainsi, dans la biosynthèse de la streptomycine (Miller et Walker, 1970) et de la néomycine (Majumdar et Majumdar, 1970), certains intermédiaires sont phosphorylés alors que les produits terminaux ne le sont pas. Les phosphatases qui clivent les intermédiaires phosphorylés peuvent être régulées par rétroinhibition ou par répression par le phosphate inorganique.

La répression d'enzymes de biosynthèse d'antibiotiques autres que les phosphatases, a également été rapportée (Tableau I. 7).

En outre il faut mentionner les effets indirects possibles du phosphate tels que le piégeage des ions métalliques essentiels (calcium, magnésium, fer) (Weinberg, 1978) et des ions ammonium (Omura *et al.*, 1980b) conduisant à une limitation du milieu en ces éléments.

Une question essentielle se pose, à savoir si le phosphate est l'effecteur

direct de la régulation ou s'il existe un autre effecteur intracellulaire dont l'action serait modulée par le phosphate. Dans cette optique, le rôle de l'ATP, en tant qu'effecteur intracellulaire commun par l'intermédiaire duquel les différents mécanismes agissent a été proposé.

Il a été observé chez différents microorganismes que les concentrations en ATP diminuaient brusquement lors du passage à l'idiophase (Martin et Demain, 1980 ; Bushell, 1989).

L'hypothèse d'une corrélation entre la charge énergétique de la cellule, telle qu'elle a été définie par Atkinson (1969),

$$Ec = \frac{(ATP) + 1/2(ADP)}{(ATP) + (ADP) + (AMP)}$$

et le métabolisme secondaire reste un sujet de controverse. En effet, la valeur de ce paramètre ne varie pas dans des proportions significatives, à la différence du niveau en ATP, lorsqu'un excès de phosphate est ajouté à des cellules en phase de production (Martin *et al.*, 1988).

Le niveau en ATP dans les cellules serait contrôlé par les phosphates au niveau de l'ATPase cytoplasmique qui serait réprimée par les phosphates. D'après Martin (1977), l'épuisement des phosphates dans le milieu de culture mène à une chute du niveau d'ATP dans les cellules, accompagnée par une levée de l'inhibition ou dérepression des enzymes de la biosynthèse des antibiotiques. Seule une augmentation de l'activité de l'ATPase en même temps qu'une accumulation de précurseurs de la biosynthèse de l'antibiotique peut expliquer le début de la synthèse de l'antibiotique. L'ATP agit en contrôlant les enzymes clés du catabolisme carboné telles que phosphofructokinase, citrate synthétase, NAD(P)H isocitrate déshydrogénase, contrôlant ainsi le métabolisme général des cellules.

Gersch *et al.* (1979) ont montré que les phosphates agissaient chez *Streptomyces hygroscopicus* en empêchant la synthèse de certaines protéines dont des enzymes nécessaires à la production de turymycine. La synthèse de ces protéines est restaurée par l'addition d'AMPc. Chez *S. fradiae*, le niveau d'AMPc est plus faible (1,5 fois) chez un mutant faiblement producteur de tylosine que chez un mutant surproducteur (Colombo *et al.*, 1984). Martin et Demain (1977) montrent que l'addition de nucléotides inhibent la synthèse de candicidine de la même manière que les phosphates. Tous les nucléotides testés sont inhibiteurs alors que les nucléosides correspondants ne le sont pas. Ceci suggère que l'effet inhibiteur est relié au groupement phosphate contenu dans les nucléotides. D'après Ochi (1987) chez *S. griseus*, ppGpp serait un signal précoce produit en réponse à une limitation nutritionnelle qui déclencherait des événements tels que la production de streptomycine. La formation de ppGpp est régulée par un deuxième type de signal, autorégulateur, le facteur A. Généralement ce mécanisme de contrôle, qui s'exerce au niveau transcriptionnel, implique une répression des synthétases durant la phase de croissance rapide. Leur formation n'a lieu que lorsque le taux de croissance chute. Ce mécanisme intervient sur plusieurs enzymes

impliquées dans la biosynthèse des antibiotiques (Tableau I. 7).

<i>Antibiotiques</i>	<i>Enzymes réprimées</i>
Actinomycine	phénoxazinone synthétase
Bacitracine	bacitracine synthétase
Candidine	PABA-synthétase
Céphalosporine	céphalosporine C acéthylhydrolase
Gramicidine	gramicidine S synthétase
Néomycine	néomycine-phosphatase
Pénicilline	acyltransférase
Streptomycine	amidino-transférase
Toyocamycine	GTP-8-formylhydrolase
Tylosine	TDP-glucose oxydoréductase
	TDP-céto-6-désoxy-D-glucose transméthylase

Tableau I. 7 : Exemples d'enzymes du métabolisme secondaire réprimées durant la phase de croissance

(D'après Demain et al., 1983)

V. 1. 3. 4. Régulation au niveau transcriptionnel de la biosynthèse des antibiotiques par les phosphates.

Le contrôle de la biosynthèse des antibiotiques par les phosphates se fait au niveau transcriptionnel, par un mécanisme similaire à celui impliqué dans le contrôle (répression) des phosphatases et autres enzymes "phosphate régulées" (Liras *et al.*, 1990).

Une importante conclusion qui émerge des études récentes portant sur la régulation par les phosphates est que l'expression de gènes codant pour les antibiotiques synthétases qui catalysent des réactions dans lesquelles les phosphates ne sont ni un substrat ni un produit de réaction, est réprimée par les phosphates (Martin *et al.*, 1988).

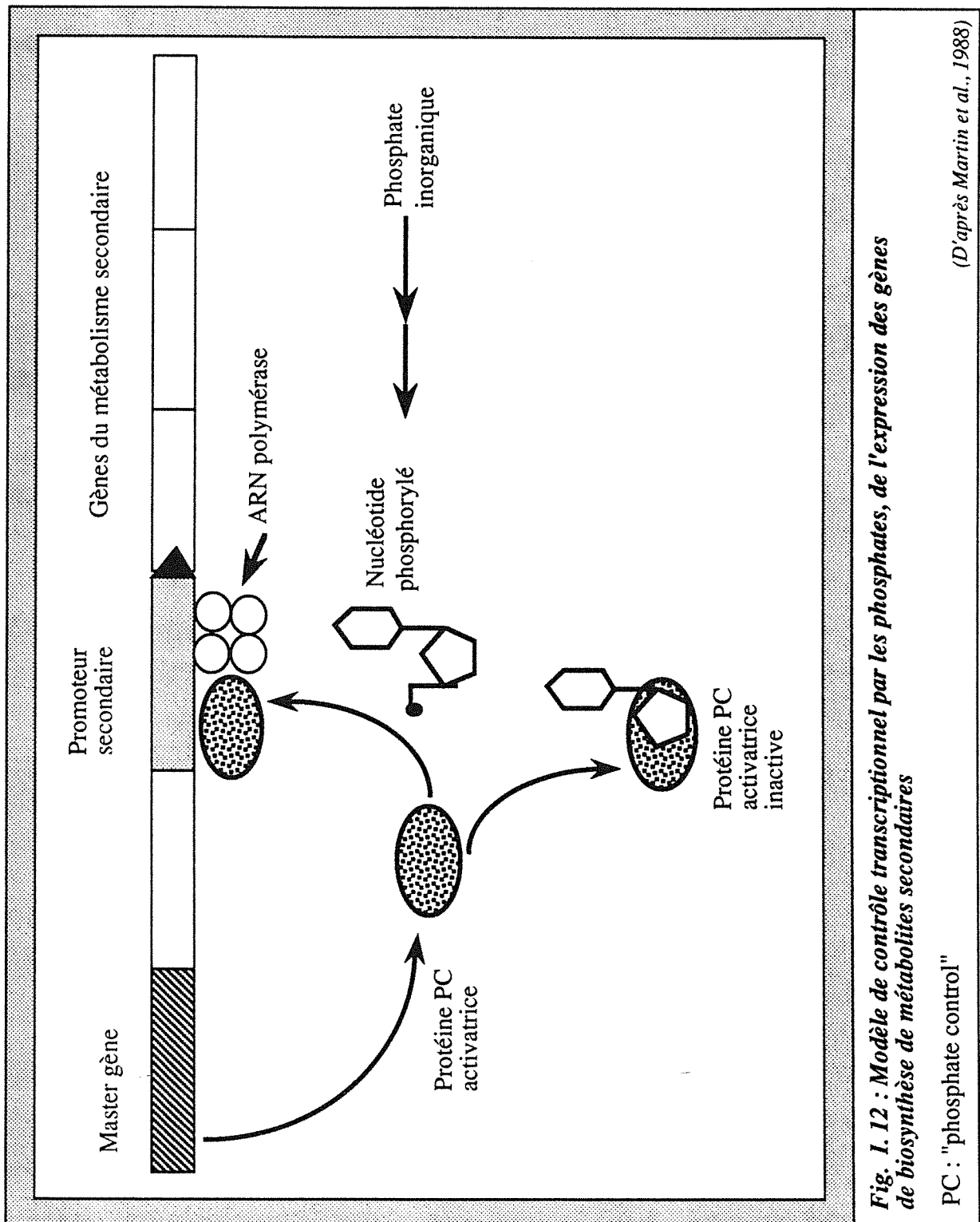
Chez *S. griseus*, la synthèse de candidine est régulée au niveau de la première réaction catalysée par la PABA synthétase. Ainsi, la synthèse de l'ARN messager de la PABA synthétase est fortement diminuée par l'addition de phosphates alors que la synthèse des ARN totaux est fortement stimulée.

Le gène codant pour la PABA synthétase ainsi que son promoteur ont été clonés. L'analyse de la séquence de la région P114 (région promotrice en amont du gène de synthèse de la PABA synthétase de *S. griseus*) ainsi que d'autres régions en amont de gènes connus pour être régulés par les phosphates, a révélé l'existence d'une région PC (Phosphate Control). Cette région contient 12 nucléotides dont la séquence, fortement conservée dans les différentes espèces de *Streptomyces*, est très semblable aux séquences pho boxes présentes chez *E. coli*.

La transcription serait bloquée sélectivement au niveau de la séquence PC se trouvant

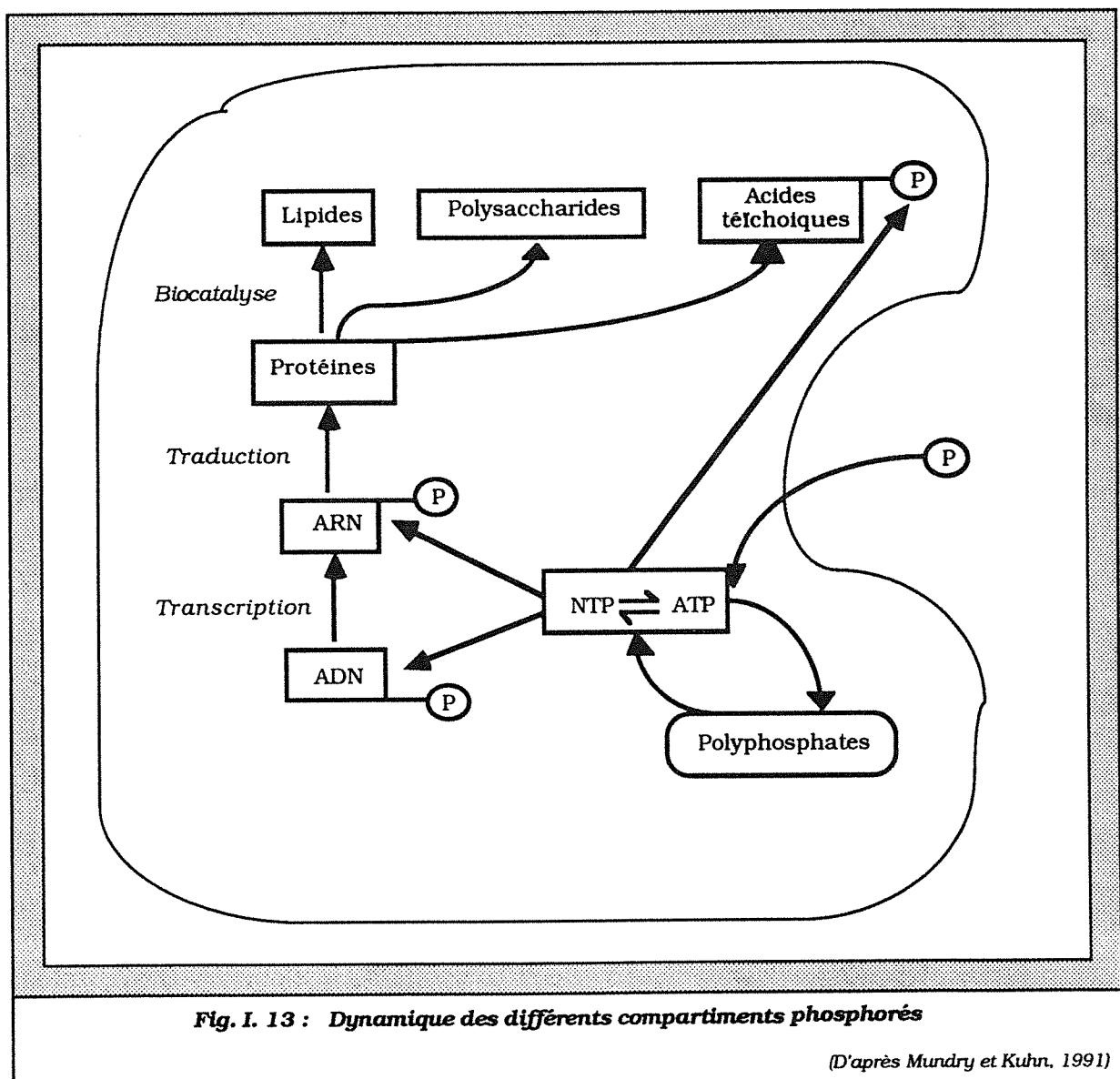
dans la région promotrice de gènes "phosphate régulés".

Un des systèmes de blocage de la transcription pourrait être l'intervention d'une "DNA binding protein". Ainsi, chez *E. coli*, une "DNA binding protein" produite par le gène *pho B* se lie à une région *pho S* et autres *pho* boxes dont la séquence est reconnue par la "DNA binding protein". L'effecteur intracellulaire qui régule le contrôle par les phosphates, par interaction séquence PC-DNA binding protein, pourrait être un nucléotide hautement phosphorylé ou un sucre phosphorylé, dont la concentration serait liée à celle des phosphates dans le milieu de culture (Fig. I. 12).



Récemment, un modèle décrivant l'influence de la concentration en phosphates présente dans le milieu de culture ainsi que des réserves intracellulaires en phosphates, sur l'évolution de la croissance de *Streptomyces tendae* a été établi par Mundry et Kuhn (1991). Ce modèle repose sur les observations suivantes :

Dans les conditions où la concentration en phosphates extracellulaires est en excès, les phosphates peuvent être stockés sous forme de polyphosphates allant de 0,1 à 20 % de la matière sèche. Ils sont dégradés lorsqu'une carence en phosphates se produit. Les autres macromolécules contenant des phosphates sont des polymères organiques dans lesquels les phosphates sont liés de manière covalente. L'épuisement des phosphates peut entraîner un changement d'état métabolique se traduisant par un ralentissement de la vitesse de croissance au cours de laquelle les ARN en excès sont recyclés. De même les groupements phosphates des acides téichoïques sont aussi recyclés (Fig. I. 13).



Tant que les phosphates extracellulaires sont disponibles, une phase de croissance rapide a lieu. Lorsque les phosphates sont épuisés dans le milieu de culture, la croissance se ralentit mais se poursuit grâce au prélèvement de phosphates dans les réserves intracellulaires. La vitesse spécifique de croissance est alors limitée par le taux de conversion des réserves intracellulaires de phosphates. La phase stationnaire survient après épuisement des réserves intracellulaires.

Ce modèle permet de prévoir l'évolution de la biomasse et de la vitesse de croissance en fonction des concentrations en phosphates extracellulaires et intracellulaires et permet de vérifier certaines hypothèses concernant la dynamique des compartiments intracellulaires en phosphate. Ainsi, une partie de l'ARN en excès en fin de phase de croissance pourrait servir de réserves en phosphates après épuisement de toutes les autres sources de phosphates intracellulaires.

Prévoir l'évolution de la vitesse de croissance de *Streptomyces* est un point essentiel dans la compréhension et la prévision de la production d'antibiotiques, étant donné que la production d'antibiotiques est étroitement dépendante de la vitesse de croissance.

La concentration en phosphate se révèle donc dans de nombreux cas comme un élément capital pour une production optimale d'antibiotique. Dans des milieux synthétiques, la quantité de phosphate est déterminée en fonction principalement des facteurs carbonés et azotés. Dans un milieu complexe, le choix se porte sur des sources à contenu moindre en phosphate, comme certaines farines ou certaines peptones. L'addition d'allopnone (Omura, 1986b) ou d'agents trappeurs dans le milieu permet de réduire l'influence négative du phosphate sur les productions de tylosine et l'érythromycine (Omura et Tanaka, 1986a).

V. 1. 3. 4. Autres sels inorganiques

La présence de magnésium est indispensable à la croissance. Une activité spécifique sur le taux de production d'un antibiotique est rarement observée, sauf dans le cas de la synthèse de certains thiopeptides et dans la production de l'antibiotique G-60, une quinone.

Certaines productions, telles que celles de la streptomycine ou de la tétracycline (Kuster et Neumeir, 1981), sont améliorées par l'addition respectivement de 0,5% et 1% de NaCl. A des concentrations plus élevées, il y a inhibition. Certains composés naturels, extraits de viande ou de levure, peuvent contenir des concentrations élevées en NaCl. Des additions de carbonate de calcium sont souvent effectuées pour maintenir le pH aux environs de la neutralité.

V. 1. 3. 5. Oligoéléments

Plusieurs éléments traces (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des organismes sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10^{-7}M). Certains jouent également un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques. Le manganèse, le fer et le zinc sont les ions métalliques les plus importants pour la production des antibiotiques.

Des effets qualitatifs peuvent de plus s'observer : la composition du mélange de gentamicines produites par *Micromonospora purpurea* est dépendante de la concentration en Co^{++} . A des concentrations élevées en Co^{++} , les composés méthylés sont préférentiellement synthétisés.

V. 1. 4. Taux de croissance

Les métabolites secondaires sont généralement formés lorsque le taux de croissance des microorganismes producteurs est faible. Il est toutefois difficile de déterminer le rôle du taux de croissance dans l'initiation du métabolisme secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle.

La synthèse de la gramicidine S par *B. brevis* en chémostat n'a lieu que pour des taux de croissance inférieurs au taux de croissance maximal, que le substrat limitant soit la source de carbone, d'azote, de phosphate ou de soufre (Matteo *et al.*, 1976). Les productions de céphamycine C et de thiénamycine chez *Streptomyces cattleya*, sont soumises à deux types de régulation. Un faible taux de croissance est l'une des conditions pour la synthèse de la céphamycine indépendamment de la nature du substrat limitant. Par contre une limitation nutritionnelle spécifique par le phosphate associée à un faible taux de croissance est nécessaire pour la production de la thiénamycine (Lilley *et al.*, 1981).

La seule conclusion qu'il soit possible pour l'instant de formuler est que la formation de certains métabolites secondaires dépend exclusivement du taux de croissance du microorganisme producteur et que celle d'autres métabolites est soumise à une limitation nutritionnelle spécifique engendrant un faible taux de croissance (Trilli *et al.*, 1987 ; Piret et Demain, 1988).

Bhatnagar *et al.* (1988) à la suite de leurs travaux sur le rôle de la source de carbone dans la régulation de la synthèse du chloramphénicol par *Streptomyces venezuelae*, ont émis l'hypothèse que le métabolisme secondaire serait assujéti à deux types de régulation. L'expression des gènes du métabolisme secondaire, qui marque temporellement l'initiation de ce métabolisme, serait déterminée par le taux de croissance tandis que le niveau de synthèse des métabolites secondaires synthétases serait modulé par les conditions nutritionnelles. L'observation suivante chez *S. clavuligerus*, producteur de céphamycine, conforterait cette

explication : un excès de source de carbone réduit quantitativement la formation de l'isopénicilline N synthétase mais n'affecte pas l'initiation de sa synthèse (Vining *et al.*, 1987). De même, le contrôle de la biosynthèse de l'actinorhodine relèverait d'un processus multifonctionnel mettant en jeu, selon les conditions de culture de *S. coelicolor* A3(2), soit le taux de croissance du microorganisme soit les concentrations en phosphate et en azote du milieu (Doull et Vining, 1990).

V. 1. 5. Facteurs d'induction de la biosynthèse des antibiotiques chez les Actinomycètes

Un mécanisme de régulation particulier de la biosynthèse des métabolites secondaires a été mis en évidence : c'est le phénomène d'induction par des facteurs spécifiques, décrit exclusivement jusqu'à présent chez des Actinomycètes producteurs d'antibiotiques ou de pigments. L'induction, par les mêmes facteurs, des processus de différenciation cellulaire chez ces mêmes microorganismes est observée conjointement à l'induction du métabolisme secondaire.

Les différents inducteurs de la biosynthèse des antibiotiques décrits dans la littérature peuvent être classés en deux groupes :

- Les inducteurs non spécifiques, de structure chimique commune, comme les acides aminés qui sont également des précurseurs.

La stimulation de la production de céphalosporine C par la méthionine chez *C. acremonium* est un exemple d'induction par un acide aminé précurseur bien décrit (Drew et Demain, 1973 ; Martin et Demain, 1980). La méthionine induit trois enzymes de la voie de biosynthèse de la céphalosporine : l'isopénicilline N et la désacétoxycéphalosporine C synthétases (Swada *et al.*, 1980), la delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cystéinyl-D-valine synthétase ou ACV synthétase (Zhang *et al.*, 1987). Enfin, conjointement à l'induction de la synthèse de céphalosporine, la méthionine induit des changements morphologiques de l'organisme producteur et particulièrement une fragmentation du mycélium (Drew *et al.*, 1976).

- Les inducteurs spécifiques, non précurseurs, de structure chimique originale.

Les divers facteurs d'induction, non précurseurs, mis en évidence jusqu'à présent, sont répertoriés dans la tableau I. 8. Le facteur le mieux décrit dans la littérature, tant sur le plan biochimique que mode d'action ou origine génétique, est le facteur A ou facteur d'autorégulation ainsi dénommé par Khokhlov et Tovarova (1979), initialement isolé chez *S. griseus*.

L'analyse des principales caractéristiques des différents inducteurs,

consignées dans le tableau I. 8, révèle une distribution relativement restreinte de ces facteurs aux Actinomycètes, en particulier au genre *Streptomyces*. Les différents facteurs autorégulateurs peuvent induire la production des métabolites et/ou les phénomènes de différenciation cellulaire. La mise en évidence pour certains inducteurs des deux effets conjoints conforte l'hypothèse d'une étroite relation entre métabolisme secondaire et différenciation.

Facteur	Souche productrice	Nature chimique	Induction		Références
			M	D	
Facteur C	<i>S. griseus</i>	protéine		+	Szabo <i>et al.</i> , 1967 Biro <i>et al.</i> , 1980
Pigment de sporulation	<i>S. venezuelae</i>	nd		+	Scribner <i>et al.</i> , 1973
Pamamycine 607	<i>S. alboniger</i>	hétérocycle		+	McCann et Pogell, 1979 Kondo <i>et al.</i> , 1988
Facteur B	<i>Nocardia sp.</i>	nucléotide	+		Kawaguchi <i>et al.</i> , 1984
Homaomycine	<i>S. griseoflavus</i>	peptide lactonique	+	+	Andres <i>et al.</i> , 1989 Rossner <i>et al.</i> , 1990
Facteur A	<i>S. griseus</i>	gamma-lactone	+	+	Khokhlov <i>et al.</i> , 1979 Khokhlov <i>et al.</i> , 1973 Kleiner <i>et al.</i> , 1976
Facteur L	<i>S. griseus</i>	gamma-lactone	+	+	Grafe <i>et al.</i> , 1982a
Facteurs apparentés au facteur A	<i>S. virido-chromogenes</i> <i>S. bikiniensis</i> <i>S. cyaneofuscatus</i>	gamma-lactone	+	+	Grafe <i>et al.</i> , 1982b Grafe <i>et al.</i> , 1983 Grafe <i>et al.</i> , 1983
Facteurs VBs (facteur IM)	<i>S. virginiae</i>	gamma-lactone	+		Yanagimoto et Térui, 1971b Yamada <i>et al.</i> , 1987
Facteur IM2	<i>S. sp</i>	gamma-lactone	+		Yanagimoto <i>et al.</i> , 1988 Sato <i>et al.</i> , 1989
<p>Tableau I. 8 : Différents facteurs d'induction de la production d'antibiotiques et de différenciation mis en évidence chez les Actinomycètes</p> <p>M: métabolite secondaire ; D: différenciation ; S.: <i>Streptomyces</i> ; nd: non déterminée.</p>					

V. 2. Arrêt de la biosynthèse

La durée de la phase de production des métabolites secondaires dépend du microorganisme utilisé et du produit considéré ainsi que des conditions de culture. Elle peut varier de 4 heures à plusieurs jours. Elle peut être en outre stratégiquement prolongée par le choix de procédés de fermentation adaptés aux mécanismes de régulation mis en jeu. L'alimentation lente et continue du milieu de culture par les substrats limitants permet ainsi de s'affranchir du phénomène de répression catabolique par ces substrats (Bushell, 1989). Néanmoins, la vitesse de production des métabolites secondaires décroît inévitablement au cours du temps. L'arrêt de la biosynthèse ne serait pas due à une perte de viabilité des cellules productrices mais à la dénaturation irréversible des synthétases ou au phénomène de rétroinhibition par le produit final (Martin et Demain, 1980 ; Vining, 1986).

V. 2.1. Dénaturation des enzymes

La dénaturation irréversible d'une ou de plusieurs enzymes de synthèse des métabolites secondaires détermine la fin de l'idiophase. Friebel et Demain (1977) ont par exemple mis en évidence que l'inactivation de la gramicidine S synthétase de *B. brevis* était due à l'oxydation des groupements sulfhydryls de l'enzyme et dépendait de la teneur en oxygène du milieu. Chez les Actinomycètes, aucun cas de dénaturation spécifique des métabolites secondaires synthétases n'est rapporté dans la littérature (Piret et Demain, 1988). Dans la plupart des situations, des phénomènes de protéolyse seraient vraisemblablement responsables de la perte d'activité enzymatique (Vining, 1986).

V. 2. 2. Rétroinhibition

De même que pour les métabolites primaires, l'arrêt de la biosynthèse des métabolites secondaires peut être occasionnée par l'accumulation du produit final qui exerce une inhibition de l'activité ou une répression de la synthèse des enzymes impliquées dans la voie biosynthétique du métabolite. La littérature recèle plusieurs exemples d'antibiotiques régulant ainsi leur propre formation, les enzymes mises en jeu n'ayant pas dans tous les cas été identifiées (Okanishi et Hotta, 1980 ; Malik, 1982). La concentration inhibitrice en antibiotique correspond généralement au niveau de production de la souche (Martin et Demain, 1980). La rétro-régulation des virginiamycines (staphylomycine) sur leur synthèse chez *Streptomyces virginiae* constitue un exemple intéressant. En effet, l'addition de très faibles quantités de virginiamycine S, soixante fois inférieures à celles produites, inhibe la synthèse de l'antibiotique. Le mécanisme de régulation proposé est une inhibition de la formation de l'inducteur de la synthèse de l'antibiotique (Yanagimoto et Terui, 1971a et 1971b).

CONCLUSION : rappel des objectifs de notre travail

D'après cette synthèse bibliographique, il est clair que même si la production industrielle de la spiramycine est ancienne, la connaissance de la régulation de sa biosynthèse est beaucoup moins avancée que celle portant sur d'autres macrolides notamment la tylosine, produite par *S. fradiae*, dont le support bibliographique nous a été d'un grand intérêt pour envisager et entreprendre nos travaux.

La compréhension des mécanismes par lesquels les substrats influencent la production de spiramycine sont d'une grande importance car ils permettent d'identifier les enzymes limitant la biosynthèse de cet antibiotique, sur lesquelles on peut penser intervenir par divers moyens (culturels, génétiques...) et augmenter les rendements de production.

Ceci nous a amené à définir les objectifs de la présente thèse qui consiste à essayer de répondre aux questions suivantes :

1. Pourquoi l'effet favorable de la valine sur la production de la spiramycine diminue-t-il lorsque la concentration en valine augmente ?
2. Par quel(s) mécanisme(s) les sources de carbone facilement assimilables réduisent-elles la production de spiramycine ?
3. Quels sont les mécanismes impliqués dans l'effet phosphate sur la production de la spiramycine ?
4. La synthèse des protéines impliquées dans la biosynthèse de la spiramycine est-elle soumise aux régulations par les sources de carbone, d'azote et de phosphate ?
5. Existe-t-il une corrélation entre la morphologie de *S. ambofaciens* et la production de spiramycine ?



CHAPITRE

2



MATERIELS & METHODES

I. MATERIELS

I. 1. Souches bactériennes

- Souche productrice : *Streptomyces ambofaciens* RP 181110
(fournie par Rhône-Poulenc, Vitry-sur-Seine)
- Souches cibles : *Bacillus subtilis* ATCC 6633
Bacillus subtilis ATCC 6633 résistant à la streptomycine

I. 2. Appareils

- Agitateur giratoire pour fioles de culture (Certomat R B Braun)
- Bain-marie (Bioblock Scientific ; Polystat I ref. 33194 220 V)
- Balance (Mettler E Mettler)
- Balance de précision (Osi)
- Bioluminomètre (LKB, 1250 Display)
- Centrifugeuse (Jouan MR 14.11)
- Centrifugeuse (Sigma-3MK)
- Chromatographe en phase gazeuse (Intersmat IGC 121C) avec intégrateur (Intersmat ICR.1B)
- Chromatographe HPLC (ternary HPLC pump), détecteur (Spectra focus) et moniteur (IBM), colonne colosil C18, 5 μ (6 mm x 15 cm) Colo Chrom
- Cuves à électrophorèse (Hoeffescientific Instruments, Modèle HE 99)
- Densitomètre (Shimadzu CS 9000)
- Etuve à 28°C (Memmert Osi) ; étuve à 37°C (Heraeus)
- Fermenteur (Biolafitte) 2 l avec régulation de pH (sonde pH à immersion stérilisable (Ingold, type 761.351 B/BH) et sonde à O₂ (Ingold)
- Fermenteur (Sétric "SET 7B" 7 l), stérilisable *in situ*, avec régulation de pH (sonde pH à immersion Ingold InFit 764.50 et d'oxygène (sonde O₂ Ingold)
- Générateur Apelex [ST 542 - D (250-400 mA)]
- pH mètre (Corning-EEL modèle 109)
- Sonde à ammonium, Consort P407 (Ingold)
- Sonicateur (Heat systems-Ultrasonics, Inc., model W 225R)
- Spectrophotomètre (Philips, Pye Unicam PU 8600 UV/VIS)

I. 3. Liste des produits utilisés

- 2-désoxyglucose (Sigma)
- α -lactalbumine (Sigma)
- Acétate d'ammonium (Fluka)
- Acétyl-CoA (Sigma)
- Acide acétique (Merck)
- Acide dinitrosalicylique (Merck)
- Acide éthylènediaminetétracétique : EDTA (Prolabo)
- Acide morpholinopropanesulfonique : MOPS (Fluka)
- Acide nitrique (Fluka)
- Acide propionique (Merck)
- Acide trichloroacétique : TCA (Merck)
- Adénosine triphosphate : ATP (Boehringer)
- Agar granulé (Bio Mérieux)
- Albumine ω (Sigma)
- ARN de levure (Sigma)
- Butanol-2 (Prolabo)
- Carbonate de calcium (Merck)
- Carbonate disodique (Merck)
- Carbonate de potassium (Merck)
- Chlorure de cobalt, 6 H₂O (Merck)
- Chlorure de manganèse, 6H₂O (Merck)
- Chlorure ferrique (Merck)
- Cystéine hypochloride (Serva)
- Dextrines blanches (Prolabo)
- Diphénylamine (Sigma)
- 1,4-Dithio-DL-thréitol : DTT (Fluka)
- Extrait de viande de bœuf (Bio Mérieux)
- Glycérol (Merck)
- Hydroxyde de potassium (Prolabo)
- Hydroxylamine (Merck)
- Isobutyryl-CoA (Sigma)
- Maltose (Prolabo)
- Malonyl-CoA (Sigma)
- Méta-périodate de Na (Merck)
- Méthanol (Carlo-Erba)
- Monohydrogénophosphate de potassium (Fluka)
- N, N, N', N'-Tétra-méthyléthylènediamine : TEMED (Bio-Rad)
- Nicotinamide dinucléotide oxydée : NAD⁺ (Boehringer)
- Ninhydrine (Pierce Chemical company)
- p-nitrophényl-phosphate (Sigma)
- Persulfate d'ammonium (Fluka)
- Saccharose (Fluka)
- Spiramycine base (Rhône-Poulenc)
- Sulfate de cuivre, 5H₂O (Merck)
- Sulfate de sodium (Merck)
- Sulfite de sodium (Merck)
- Tartrate double de Na et de K, 4H₂O (Merck)
- Triton X-100 (Sigma)
- Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane (Fluka)
- 3-O-méthyl-D-glucose (Sigma)
- Acétaldéhyde aqueux (Sigma)
- Acétonitrile (Merck)
- Acétylacétone : Pentane-2,4-dione (Merck)
- Acide chlorhydrique (Merck)
- Acide dinitrosalicylique (Fluka)
- Acide perchlorique (Fluka)
- Acide sulfurique (Fluka)
- Acrylamide (Merck)
- ADN de sperme de saumon (Sigma)
- Albumine sérique bovine (Boehringer)
- Alpha-cétoisovalérate (Fluka)
- Bisacrylamide (Merck)
- Calcium phosphate tricalcique (Prolabo)
- Chlorure d'ammonium (Fluka)
- Carbonate de sodium (Merck)
- Chlorure de calcium, 2H₂O (Fluka)
- Chlorure de magnésium, 6H₂O (Fluka)
- Chlorure de sodium (Prolabo)
- Coenzyme A (Sigma)
- D(+)-glucose monophosphate (Fluka)
- Dihydrogénophosphate de potassium (Fluka)
- Diméthylsulfoxyde : DMSO (Sigma)
- Extrait de levure (Bio Mérieux)
- Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Sigma)
- Glycine (Merck)
- Hydroxyde de sodium (Fluka)
- Inhibiteur trypsique (Sigma)
- L-valine (Sigma)
- Luciférine-luciférase (Sigma)
- Mercaptoéthanol (Fluka)
- Métavanadate d'ammonium (Merck)
- Molybdate d'ammonium (Merck)
- Orcinol monohydrate (Sigma)
- Peptone Bio-trypcase (Bio Mérieux)
- Réactif de Folin (Merck)
- Sodium-dodécyl-sulfate : SDS (Sigma)
- Streptomycine (Boehringer)
- Sulfate de magnésium, 7H₂O (Merck)
- Sulfate de zinc, H₂O (Rhône-Poulenc)
- Tartrate de sodium (Merck)
- Thiamine pyrophosphate (Boehringer)
- Trypsinogène bovin (Sigma)

I. 4. Milieux

I. 4. 1. Milieux de sporulation

I. 4. 1. 1. Milieu de sporulation de *S. ambofaciens*

Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Biotrypcase (peptone)	2 g
Bacto-agar	20 g
Dextrines blanches	10 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	20 mg
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH ajusté à 7,3 avec KOH

I. 4. 1. 2. Milieu de sporulation de *B. subtilis*

La méthode de conservation et la composition du milieu de sporulation ont été indiquées par Rhône-Poulenc Santé.

Biotrypcase	6 g
Extrait de levure	3 g
D-glucose	1 g
Extrait de viande	1,5 g
Bacto-agar	25 g
MnSO ₄ (1g. l ⁻¹)	1 ml
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH ajusté à 7,3 avec KOH

I. 4. 2. Milieux de culture

I. 4. 2. 1. Milieu de préculture

MgSO ₄	1 g
ZnSO ₄	15 mg
KH ₂ PO ₄	2 g (14 mM)
CaCO ₃	5 g
NaCl	20 g
CoCl ₂	0,3 mg
Dextrines blanches	30 g
NH ₄ Cl	2 g (50 mM)
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

pH ajusté à 7,0 avec KOH

I. 4. 2. 2. Milieu synthétique de base

Par rapport au milieu de préculture, seules la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote sont modifiées selon le but des expériences.

Dans le cas des cultures en fermenteur, le CaCO_3 à 5 g. l^{-1} est remplacé par du CaCl_2 à 1 g. l^{-1} pour éviter les problèmes de précipitation, surtout en semi-continu.

I. 4. 2. 3. Milieu de croissance de *B. subtilis*

Agar	8 g
Extrait de viande	3 g
D-glucose	8 g
Biotrypcase	10 g
Extrait de levure	3 g
KH_2PO_4	100 mM
H_2O q.s.p.	1000 ml

pH ajusté à 7,2 avec KOH

Le bouillon nutritif est de même composition, mais sans agar.

I. 5. Stérilisation des milieux de culture

Elle s'effectue à 120°C dans un autoclave. Selon le volume du milieu de culture et le contenant, le temps de stérilisation varie légèrement. Ainsi les fioles d'Erlenmeyer d'une contenance de 50 ml sont stérilisées 20 min alors que le fermenteur contenant jusqu'à 5000 ml est stérilisé pendant 30 min.

Les milieux de culture sont stérilisés en trois parties séparées afin d'éviter les réactions de Maillard ainsi que les interactions entre éléments minéraux aboutissant à des précipitations qui peuvent changer la composition du milieu de fermentation. Les constituants sont répartis ainsi :

Partie 1	Partie 2	Partie 3
CaCO_3	source d'azote	source de carbone
KH_2PO_4	MgSO_4	
NaCl	ZnSO_4	
CoCl_2		

Les trois parties sont mélangées avant l'inoculation.

II. METHODES

II. 1. Méthodes de conservation des souches

II. 1. 1. Conservation de *S. ambofaciens*

S. ambofaciens RP 181110 est un mutant "surproducteur" fourni par Rhône-Poulenc sous forme de spores. La souche est régénérée sur le milieu de sporulation. Pour ceci, des boîtes de Pétri contenant le milieu de sporulation sontensemencées, puis incubées 10 jours à 28°C. Les spores et fragments de mycélium sont raclés avec un fil de platine et transférés dans un tube contenant 10 ml de tampon stérile Tris-hydroxyméthylaminoéthane (50 mM, pH 7,2) plus du Triton X-100 (0,1 ml. l⁻¹) et 15 g. l⁻¹ de billes de verre de 2,5 mm de diamètre. Une agitation de 2 min sur vortex détache les spores du mycélium. La suspension obtenue est filtrée deux fois sur coton hydrophile et lavée avec 5 ml de tampon Tris-HCl stérile. Le filtrat est centrifugé à 15 000 g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois avec du tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 7,2). Les spores ainsi obtenues sont ensuite resuspendues dans des tubes contenant une solution stérile de glycérol à 20 % et conservées à -20°C.

II. 1. 2. Conservation de *B. subtilis*

B. subtilis est utilisé comme souche test pour doser la concentration de spiramycine produite, par une méthode de diffusion sur milieu solide. Elle est propagée par étalement d'une suspension de *B. subtilis* sur le milieu de sporulation. Après une incubation de 15 jours à 30°C, les spores sont récupérées dans de l'eau distillée stérile, puis après une pasteurisation éliminant les cellules végétatives, les spores sont conservées à -20°C.

II. 2. Conduite des cultures

II. 2. 1. Propagation de *S. ambofaciens* en milieu liquide : préculture

Les spores sont inoculées dans 50 ml du milieu de préculture à raison d'environ 10⁸ spores par ml. Les précultures ainsiensemencées sont incubées pendant 48 h à 28°C sous agitation à 250 rpm.

II. 2. 2. Cultures de *S. ambofaciens*

Les cultures sont réalisées soit dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 ml soit en fermenteur.

II. 2. 2. 1. Cultures en fioles d'Erlenmeyer

Les fioles de 300 ml contenant 50 ml de milieu de culture, sont inoculées avec la préculture de façon à obtenir une biomasse initiale de 0,2 g. l⁻¹.

Les fermentations sont conduites pendant environ une semaine à 28°C sous agitation à 250 rpm. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps variables selon les expériences. Après estimation de la biomasse et la lecture du pH, les cellules sont éliminées par centrifugation à 11 500 g pendant 10 min et les surnageants stockés à 4°C pour les différents dosages.

Le mode de culture effectué dans les fioles d'Erlenmeyer est le discontinu mais des pulses de certains éléments nutritifs peuvent être réalisés selon le but de l'expérience.

II. 2. 2. 2. Cultures en fermenteur

Lors de ce travail deux procédés de fermentation ont été mis en oeuvre : le discontinu et le semi-continu.

Dans les deux cas au cours de la culture en fermenteur, le pH, la température et la concentration d'oxygène dissous sont régulés. Le pH est réglé à 7 ($\pm 0,5$), la température à 28°C (± 1), la concentration d'oxygène dissous à 25 % de la saturation (± 5) et l'agitation à 350 rpm (± 50).

L'inoculation se fait à partir d'une préculture de 48 h de façon à avoir une biomasse initiale de 0,2 g. l⁻¹.

En semi-continu, nous avons réalisé au départ une fermentation discontinue avec un volume total de 2000 ml contenant 10 g. l⁻¹ de glycérol et 20 mM de chlorure d'ammonium. L'alimentation, effectuée sous débit constant, est démarrée quand le glycérol devient limitant.

Remarque : La reproductibilité des résultats des fermentations présentés dans cette thèse a été vérifiée ; chaque expérience a été réalisée au moins deux fois.

II. 3. Isolement d'un mutant de *B. subtilis* résistant à la streptomycine

La suspension de *B. subtilis* ATCC 6633 est distribuée dans une boîte de Pétri contenant le milieu nutritif avec 30 mg. l⁻¹ de streptomycine. Après incubation à 37°C pendant deux à trois jours, les colonies qui se sont développées sont transférées dans un bouillon nutritif contenant 30 mg. l⁻¹ de streptomycine en vue d'un enrichissement. Des séries progressives de repiquages sur boîtes de Pétri contenant de 30 à 100 mg. l⁻¹ de streptomycine, avec des enrichissements en milieu liquide après chaque passage, ont permis d'obtenir des

mutants de *B. subtilis* résistant à 100 mg. l⁻¹ de streptomycine. Leur sensibilité à la spiramycine a été testée. Nous avons gardé les mutants qui, en présence ou en absence de 100 mg. l⁻¹ de streptomycine, manifestent la même sensibilité vis-à-vis de la spiramycine que la souche sauvage (en absence de streptomycine).

II. 4. Préparation des cellules non proliférantes

Des cellules en croissance, sur milieu de culture chimiquement défini, pendant 48, 72 ou 96 h sont récoltées par centrifugation (8 000 g, 10 min, 4°C), lavées deux fois avec du tampon acide morpholinopropane sulfonique (MOPS) 10 mM, pH 6,9 et resuspendues dans ce même tampon. Une fraction des cellules lavées est destinée à la mesure du poids sec et le reste est resuspendu dans un milieu sans azote, de façon à avoir une suspension de 3 g. l⁻¹. 15 ml de cette suspension sont transférés stérilement dans des fioles de 100 ml. Suivant les besoins de l'expérience, 5 ml de tampon ou une solution aqueuse de glycérol (à une concentration finale de 60 g. l⁻¹) ou une solution aqueuse de streptomycine (à une concentration finale de 100 mg. l⁻¹) sont ajoutés. Les conditions d'incubation sont les mêmes que celles décrites pour les fermentations en milieu de culture. Des prélèvements de 1 ml sont effectués périodiquement pour le dosage de la spiramycine.

II. 5. Méthodes analytiques

II. 5. 1. Estimation de la biomasse

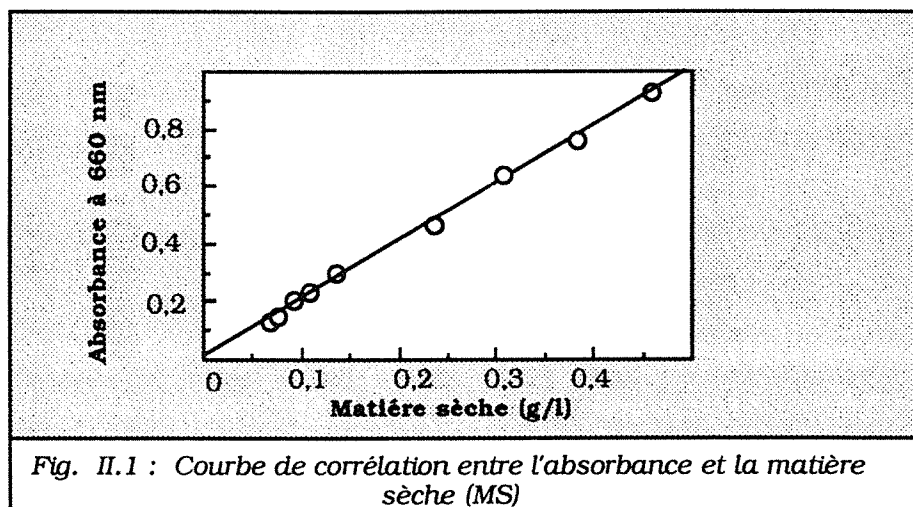
D'après Lubbe et al. (1985).

La concentration cellulaire est estimée par lecture de l'absorbance à 660 nm. Il est impossible de mesurer l'absorbance de façon précise sans traitement préalable de l'échantillon à cause de la formation d'amas (pelotes) lors du développement. La dissociation de ces amas est obtenue par mélange de 1 ml de la culture avec 9 ml de HCl 0,25 M et sonication de cette solution pendant 40 s à une puissance de 60 W en cycle continu (conditions optimales de sonication pour une bonne dissociation sans lyse des cellules).

Pour quantifier cette biomasse, la relation entre l'absorbance et la concentration de matière sèche exprimée en g. l⁻¹ a été établie. La matière sèche est déterminée par pesée à partir d'un échantillon de volume bien déterminé de culture. L'échantillon est filtré sur une membrane de 0,22 µm préalablement séchée pendant une nuit dans une étuve à 100°C et tarée. Après un rinçage avec 10 ml d'HCl à 0,25 M pour dissoudre le carbonate de calcium, la membrane est séchée 12 h à 100°C, puis dans un dessiccateur. Compte tenu des modifications morphologiques lors de la croissance, la relation entre MS et absorbance a été déterminée avec des bactéries en phase exponentielle et en phase stationnaire. Dans notre cas, la relation

ne varie pas significativement entre les deux phases.

Cette relation est linéaire pour une gamme de valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 0,8 pour laquelle le rapport MS/absorbance = 0,5 (Fig. II. 1). Cette relation est spécifique de notre souche et reste constante tout au long de la culture et quel que soit le milieu de culture utilisé.



II. 5. 2. Dosage de l'ADN

Méthode de Burton (1956).

• Principe

En solution acide, les désoxypentoses de l'ADN sont convertis en β -hydroxylévalinaldéhyde extrêmement réactif qui s'associe à la diphénylamine pour former un complexe de couleur bleue ayant un maximum d'absorption à 600 nm.

• Réactifs

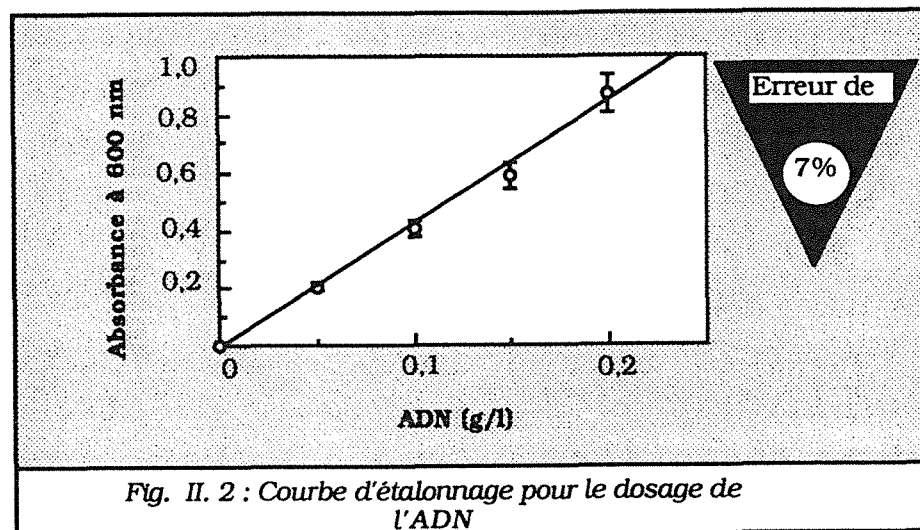
A : acide perchlorique 0,5 N

B : 1,5 g de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique glacial et 1,5 ml d'acide sulfurique concentré ; le réactif est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

Avant utilisation, 0,1 ml d'acétaldéhyde aqueux à 1,6% est ajouté à 20 ml de réactif.

- Protocole

L'extraction des acides nucléiques des cellules est effectuée en mélangeant 3 ml de suspension cellulaire lavée et 3 ml de réactif A et en plaçant le mélange dans un bain-marie à 70°C pendant 20 min. Le mélange est centrifugé à 8 000 g pendant 10 min. A 1,5 ml du surnageant, sont ajoutés 3 ml de réactif B et le mélange est laissé une nuit à 30°C. Après centrifugation de 10 min à 8 000 g, l'absorbance du surnageant est mesurée à 600 nm. La concentration en ADN des cellules est déterminée en référence à une gamme étalon réalisée avec une solution d'ADN de sperme de saumon (Fig. II. 2).



II. 5. 3. Dosage de l'ARN

Méthode de Griswold et al. (1951).

- Principe

Le dosage de l'ARN est réalisé avec un réactif à base d'orcinol, après extraction des acides nucléiques par l'acide perchlorique (cf dosage ADN). Il s'agit d'une réaction générale des pentoses qui dépend de la formation du furfural lors du chauffage d'un pentose en présence d'acide chlorhydrique concentré. L'orcinol réagit avec le furfural en présence du chlorure de fer ferrique qui sert de catalyseur, pour donner une couleur verte absorbant à 672 nm.

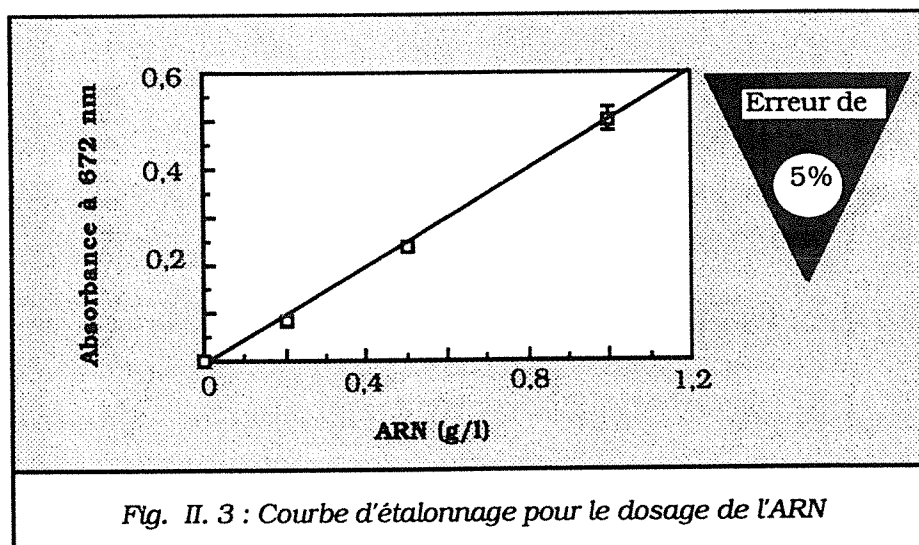
- Réactifs

A : 1 volume de solution d'orcinol monohydrate à 1%, plus 4 volumes d'une solution à 0,9 g de chlorure ferrique par litre d'acide chlorhydrique concentré.

B : butanol-2

- Protocole

A 1,5 ml de suspension traitée par l'acide perchlorique sont ajoutés 3 ml de réactif A . Le mélange est placé à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement, 11 ml de réactif B sont ajoutés, puis l'absorbance du surnageant est mesurée à 672 nm. La réalisation d'une gamme étalon à partir d'une solution d'ARN de levure à 1 g. l⁻¹ permet la détermination de la concentration en ARN des échantillons (Fig. II. 3).

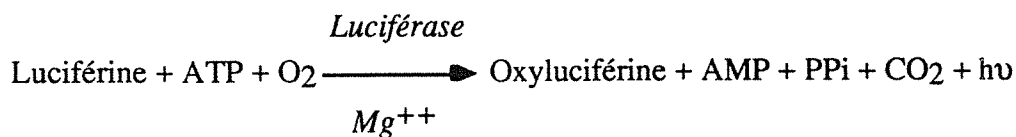


II. 5. 4. Dosage de l'ATP

D'après Jakubczak et Leclerc (1980).

- Principe

L'utilisation du système enzymatique luciférine-luciférase extrait de luciole (*Photinus pyralis*) permet un dosage instantané de l'ATP grâce à l'émission d'une lumière au cours de la réaction de bioluminescence suivante :



Au cours de la réaction, il y a émission de lumière, la quantité de photons émise étant directement proportionnelle à la quantité d'ATP dégradée.

- Protocole d'extraction de l'ATP

A 100 ml de suspension cellulaire, ont été ajoutés 900 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO, 13,9 M) à 90% dans le tampon MOPS (10 mM, pH 7,4). Après agitation au vortex pendant 15 s, et un repos de 5 min dans la glace, le mélange est additionné de 4 ml de tampon MOPS. Les extraits ainsi obtenus peuvent être congelés à -20°C pour un dosage ultérieur.

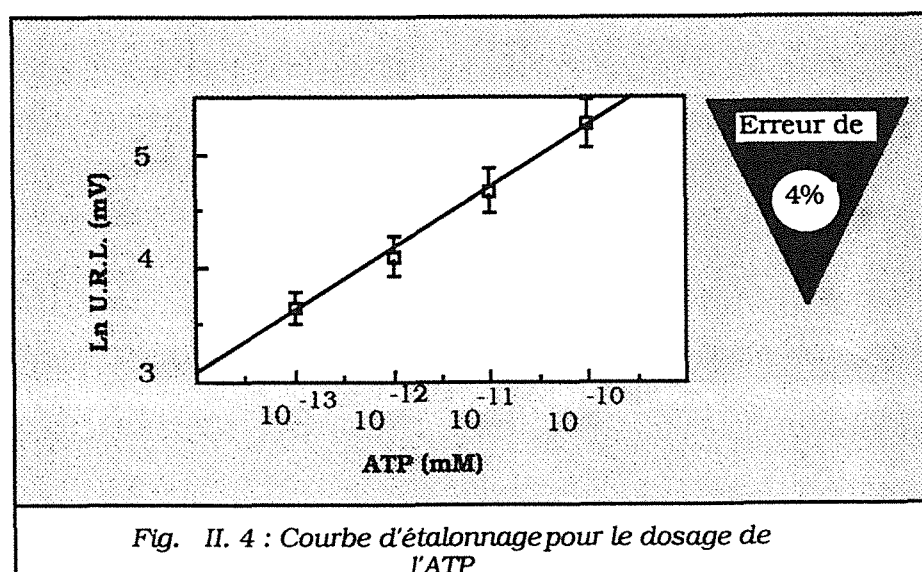
Cette méthode d'extraction a l'avantage de :

- fournir les plus hauts rendements
- présenter la meilleure reproductibilité
- inhiber l'apyrase : enzyme hydrolysant l'ATP (Strehler et Totter, 1952)

- Protocole de dosage de l'ATP

Dans l'ordre, dans une cuvette en polystyrène, 350 μ l de tampon Tris-Acétate (0,1 mM pH 7,7) contenant de l'EDTA (3 mM) et 50 μ l d'échantillon sont mélangés. Après agitation douce à la main, la cuvette est insérée dans le bioluminomètre. 100 μ l du mélange luciférine-luciférase sont injectés au contenu de la cuvette grâce à un dispositif de micropipetage automatique .

L'émission de la lumière est intégrée pendant 10 s, elle est mesurée au maximum d'émission évitant ainsi l'interférence des autres nucléotides (ADP, GTP) (Prydz et Froholm, 1964 ; Pradet, 1967). Pour quantifier la concentration en ATP, une courbe d'étalonnage de l'Unité Relative de Luminescence (URL) en fonction de la concentration en ATP pur est établie dans des conditions identiques (Fig. II. 4).



II. 5. 5. Dosage des substrats

II. 5. 5. 1. Carbonés

II. 5. 5. 1. 1. Glycérol

Méthode de Bok et Demain (1977).

• Principe

La méthode est basée sur l'oxydation des fonctions alcool du glycérol par l'acide périodique. L'excès d'acide périodique est réduit par le L-rhamnose. Le formaldéhyde formé est déterminé colorimétriquement par le réactif de NASH (fraîchement préparé).

• Réactifs

1. métopériodate de Na 0,015 M dans HCl 0,12 M

2. rhamnose 0,1 %

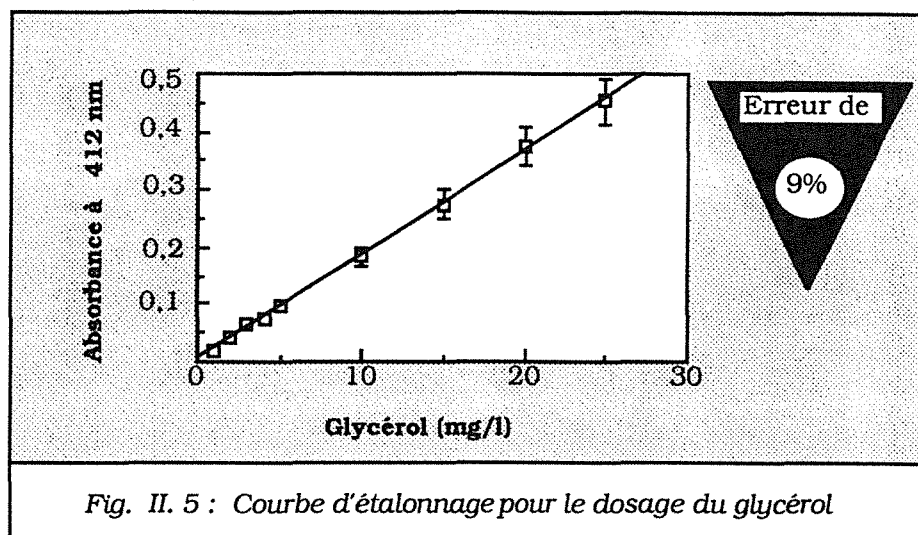
3. réactif de NASH contenant :

••acétate d'ammonium	150 g
•• acide acétique glacial	2 ml
•• pentane-2,4-dione	2 ml

Le volume final est amené à 1 l avec de l'eau distillée.

• Protocole

Dans un tube à essai, 1 ml de l'échantillon contenant le glycérol est mélangé avec 1 ml du réactif 1. Après agitation, le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante. 2 ml du réactif 2 sont additionnés. Après agitation, 4 ml du réactif 3 sont ajoutés. Le tout est incubé dans un bain-marie à 53°C pendant 15 min. Après refroidissement des tubes, la lecture de l'absorbance est réalisée à 412 nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions que les échantillons, avec 1 ml d'eau distillée. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une série de concentrations de glycérol comprises entre 1 et 25 mg. l⁻¹ (Fig. II. 5).



II. 5. 5. 1. 2. Glucose

Méthode de Miller (1959).

• Principe

Ce dosage est basé sur l'action réductrice du glucose sur l'acide dinitrosalicylique en présence de soude . Le phénol favorise la coloration.

• Réactif de Miller :

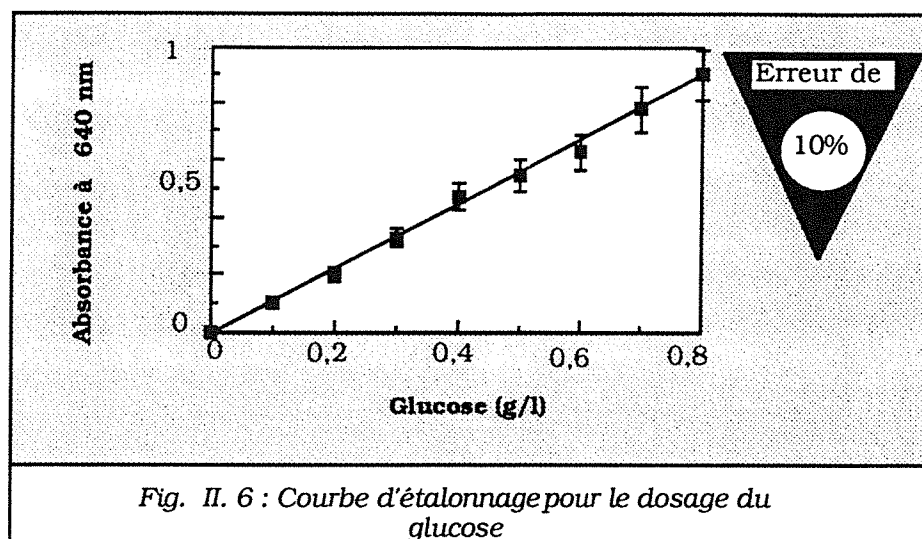
acide dinitrosalicylique	20g
phénol	4g
sulfite de Na	1g
tartrate de Na	400g

Le tout est mélangé dans un litre de NaOH 2% (0,5 N) et chauffé légèrement pour dissoudre tous les constituants. La solution est ensuite complétée à 2 l avec de l'eau distillée. Le réactif peut être stocké pendant 6 mois à l'abri de la lumière.

• Protocole

3 ml du réactif de Miller sont mélangés avec 2 ml de l'échantillon à doser et mis dans un bain-marie bouillant pendant 15 min. Les tubes sont ensuite refroidis pendant 30 min à 4°C. La lecture est réalisée par mesure de l'absorbance à

640 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une série de concentrations allant de 0 à 0,8 g. l⁻¹ (Fig. II. 6).



II. 5. 5. 1. 3. Dextrines

Méthode de Hanson et Phillips (1981).

• Principe

Cette méthode permet de déterminer la concentration en glucides totaux. Après hydrolyse acide des dextrines par l'acide sulfurique, les glucides libérés réagissent avec le phénol, provoquant la formation d'une coloration jaune.

• Réactifs

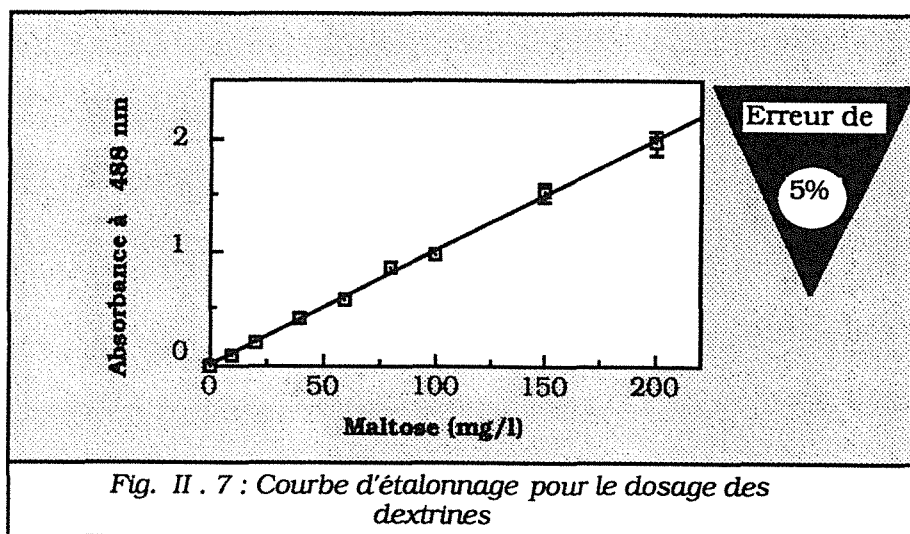
- phénol 5 % (p/v)
- acide sulfurique concentré

• Protocole

Dans un tube à essai, 1 ml de phénol à 5 % est ajouté à 1 ml de l'échantillon à analyser. Après agitation rapide, 5 ml d'acide sulfurique concentré (12 N) sont additionnés. Après agitation, le tout est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante. Les tubes sont placés ensuite dans un bain marie à 25°C pendant 15 min. L'absorbance est lue à 488 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée et préparé dans les

mêmes conditions que les échantillons.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations de maltose allant de 0 à 200 mg. l⁻¹ (Fig. II. 7).



II. 5. 5. 2. Azotés

II. 5. 5. 2. 1. Dosage des ions ammonium

Il se fait au moyen d'une électrode à diffusion gazeuse.

• Principe : théorie de fonctionnement

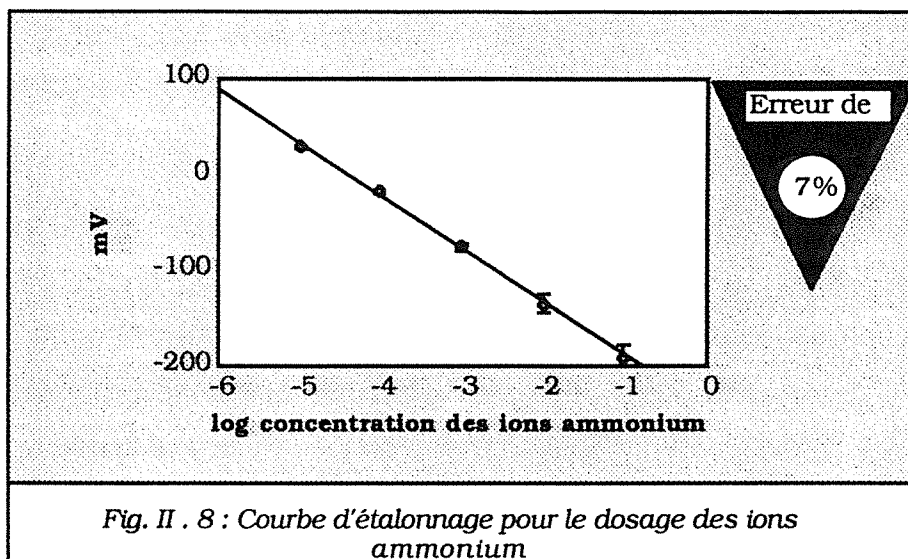
L'électrode à ammoniac permet de doser l'ammonium après sa transformation en ammoniac en milieu alcalin. Elle est composée d'une membrane en téflon par laquelle le gaz pénètre dans le corps de l'électrode. Il s'établit une différence de potentiel entre la solution interne de l'électrode et les ions OH⁻ produits selon la réaction :



• Protocole

100 ml de NaOH 10 M sont ajoutés à 10 ml de l'échantillon dilué. L'électrode liée à un voltmètre est introduite dans cette solution alcaline, sous agitation. On attend que l'équilibre s'établisse et la valeur minimale de différence de potentiel (en mV) est retenue. Elle est proportionnelle à la concentration d'ammonium dans l'échantillon. Les

dosages doivent être effectués dans les mêmes conditions d'agitation et de température. La courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations de 10^{-5} à 10^{-1} M de chlorure d'ammonium (Fig. II. 8).



II. 5. 5. 2. 2. Dosage de la valine

Chromatographie sur couche mince (CCM).

• Principe

La valine à doser contenue dans le surnageant obtenu après centrifugation du milieu de fermentation est quantifiée par lecture des plaques de CCM, révélées à la ninhydrine, au densitophotomètre.

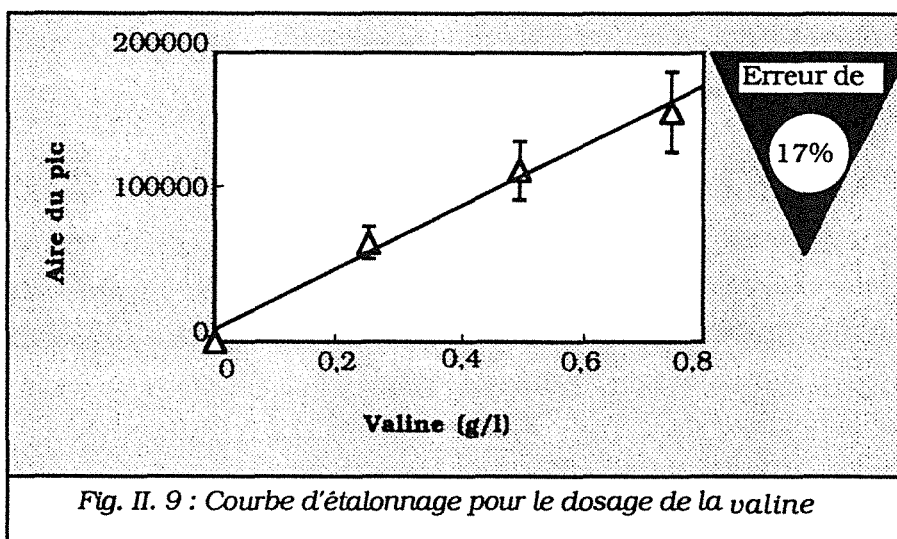
• Protocole

Le support solide utilisé est constitué de Kieselgel-60 (Merck). Le volume du dépôt a été optimisé à 1 μ l. Le système de solvant de migration utilisé est : n-butanol - acide acétique - eau (3 : 1 : 1, v/v). La migration dure environ 3 h. Le solvant est éliminé de la plaque par simple évaporation à température ambiante.

• Préparation du révélateur (à garder à l'abri de la lumière) :

•• ninhydrine	0,3 g
•• acide acétique	3 ml
•• n-butanol	100 ml

Après pulvérisation du révélateur, les plaques sont chauffées pendant 10 min à 110°C puis "lues" à 490 nm par le densitophotomètre. Une relation linéaire entre la concentration de valine et l'aire du pic a été obtenue pour une gamme comprise entre 0,1 et 0,8 g. l⁻¹ de valine (Fig. II. 9).



II. 5. 5. 3. Dosage des ions phosphate

D'après Kuzdzal-Savoie et Lebon (1971).

• Principe

Ce dosage est basé sur la mise en évidence du phosphore par la formation d'un complexe coloré avec l'acide nitro-vanado-molybdique.

• Préparation des solutions

• molybdate d'ammonium à 10 % :

La dissolution s'effectue à chaud et 1% (v/v) d'ammoniaque est ajouté pour la conservation du réactif.

• métavanadate d'ammonium

2,5 g de métavanadate d'ammonium sont dissous à chaud dans 400 ml d'eau distillée. Puis 7 ml d'acide nitrique concentré dilués par 13 ml d'eau distillée sont ajoutés lentement dans la solution de métavanadate d'ammonium. Le volume est ajusté à 1 l avec de l'eau distillée.

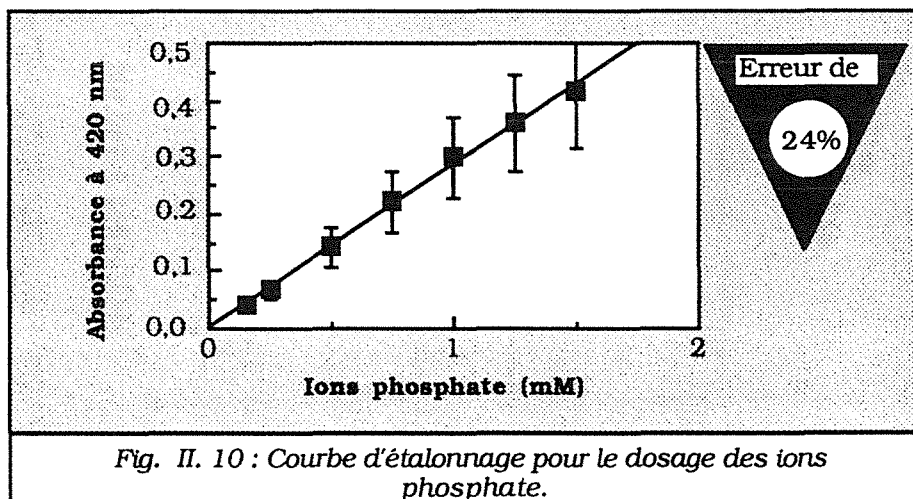
- Réactif

Le mélange de composition suivante est préparé extemporanément :

molybdate d'ammonium à 10 %	200 ml
métavanadate d'ammonium	200 ml
acide nitrique	134 ml
eau distillée q.s.p.	1000 ml

- Protocole

1 ml d'échantillon est mélangé à 3 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif. Après homogénéisation, le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 10 min. La lecture de l'absorbance est réalisée à 420 nm contre un blanc dans lequel l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. La relation entre l'absorbance et la concentration en phosphore est linéaire jusqu'à 2 mM de KH_2PO_4 . La courbe d'étalonnage est effectuée avec différentes concentrations de KH_2PO_4 allant de 0,25 à 1,5 mM (Fig. II. 10).



- Important

Il est impératif que toute la vaisselle qui servira lors du dosage soit trempée une nuit dans un bain d'acide nitrique à 5% puis rincée à l'eau distillée. Ce traitement permet l'élimination de toute trace de phosphate provenant des détergents et qui risquerait de fausser le dosage.

II. 5. 6. Dosage de la spiramycine

La spiramycine sécrétée dans le milieu de culture par *S. ambofaciens* peut être dosée selon deux méthodes différentes :

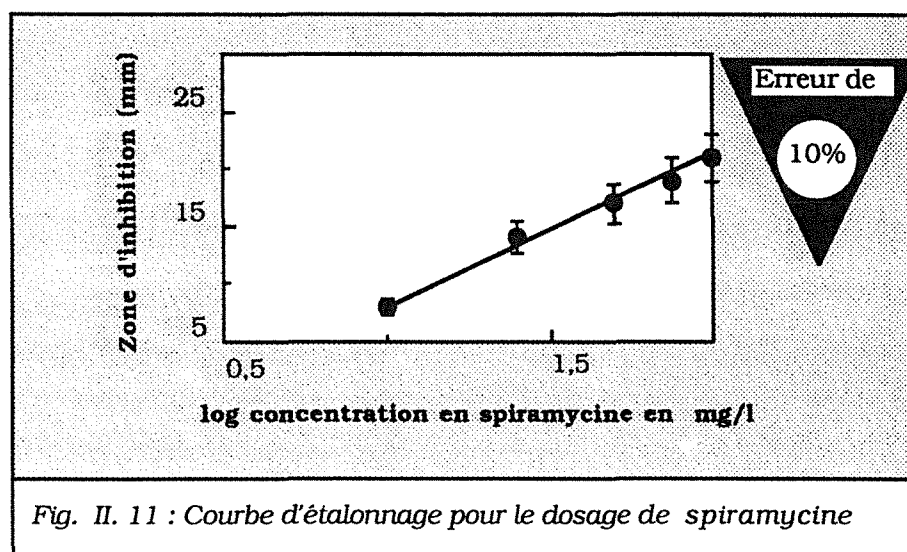
- par une méthode antibiographique (rapide)
- par HPLC

II. 5. 6. 1. Dosage antibiographique de la spiramycine

La spiramycine est dosée habituellement par cette méthode qui est rapide et qui permet de traiter plusieurs échantillons à la fois. Cette méthode de diffusion dans la gélose consiste à mesurer le diamètre d'une zone d'inhibition provoquée par la spiramycine vis-à-vis de la croissance d'une souche cible sensible à la spiramycine : *B. subtilis* ATCC 6633 se développant sur milieu solide.

Le dosage est réalisé sur bouillon nutritif ensemencé par 20 μ l de la solution de *B. subtilis* pour 100 ml de bouillon nutritif. Ce milieu est ensuite distribué dans des boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte. Après solidification du milieu, des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre préalablement imprégnés par 20 μ l de chaque solution de spiramycine de concentration connue et des différents échantillons, sont déposés à la surface du milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont placées à 4°C pendant une nuit afin de laisser diffuser la spiramycine dans le milieu solide. Les boîtes sont ensuite incubées 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 et le diamètre de la zone d'inhibition est établie. Cette relation est linéaire pour des concentrations de spiramycine comprises entre 10 et 100 mg. l^{-1} (Fig. II. 11). Le seuil de détection est de 5 mg. l^{-1} .



II. 5. 6. 2. Dosage de la spiramycine par HPLC

L'analyse par HPLC du milieu de culture filtré permet de déterminer précisément la concentration des 3 formes de spiramycine. Cette analyse montre que la spiramycine produite par *S. ambofaciens* dans nos conditions de culture est formée essentiellement par les formes I et II de la spiramycine, la forme III étant en quantité négligeable. Ces 2 formes dominent également dans la spiramycine base utilisée comme étalon pour tous les dosages.

L'équipement (Waters) utilisé pour ce dosage consiste en une pompe 590, un injecteur U6K, un détecteur 481 à longueur d'onde variable, un intégrateur 740 et une colonne C18 (Novapak). La phase stationnaire (colonne) est conditionnée pendant 1 h avec un éluant dégazé contenant 80 % d'une solution à 1 % d'acide sulfurique concentré et 20 % d'acétonitrile. Le débit utilisé est de 1 ml. min⁻¹. Lorsque la colonne est équilibrée, 20 µl de l'échantillon filtré sont injectés. La séparation s'effectue avec une phase mobile de même composition que l'éluant qui a servi à conditionner la phase stationnaire. La détection se fait à 238 nm. Les 3 formes de la spiramycine ne différant qu'au niveau d'un groupement R, elles se séparent dans l'ordre inverse de leur degré d'hydrophobicité. Les temps de rétention respectifs de la spiramycine I, II et III sont respectivement de 4,2 , 6,1 et 10,6 min (Fig. II. 12).

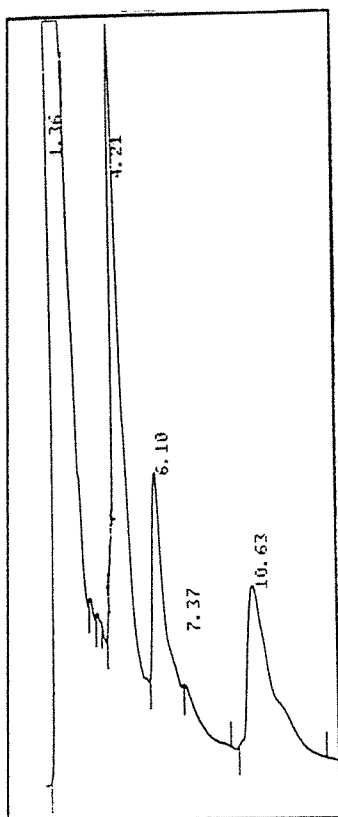


Fig. II. 12 : Dosage de la spiramycine par HPLC.

Temps de rétention des trois formes de spiramycine.

Spiramycine I : 4,2 min

Spiramycine II : 6,10 min

Spiramycine III : 10,6 min

II. 5. 7. Dosage des acides gras à courtes et moyennes chaînes

Les acides gras à courtes et moyennes chaînes (acides acétique, propionique, isobutyrique et butyrique) produits par *S. ambofaciens* ou introduits dans le milieu de culture, sont dosés par chromatographie en phase gazeuse dans un chromatographe Intersmat IGC 121 EL. Les produits vaporisés sont détectés par un détecteur à ionisation de flamme et enregistrés sur un intégrateur-enregistreur Intersmat ICR IB. Le gaz vecteur est l'azote dont la 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 2 mm de diamètre et de 2 mètres de long. La température de l'injecteur et du détecteur est de 220 °C et la température du four est de 180 °C.

Pour l'étalonnage, 500 µl d'une solution à 1 g. l⁻¹ de chacun des acides gras sont mélangés à 100 µl d'un étalon interne constitué par 1 g. l⁻¹ de méthanol acidifié par HCl 1N. On injecte 1 µl de cette solution pour étalonner le chromatographe. Pour le dosage des échantillons, le traitement est le même : 500 µl d'échantillon et 100 µl d'étalon interne. Les injections sont de 1 µl. La concentration des acides gras présents dans l'échantillon est donnée directement par l'intégrateur. Les temps de rétention respectifs des acides acétique, propionique, isobutyrique et butyrique sont donnés sur la Fig. II. 13.

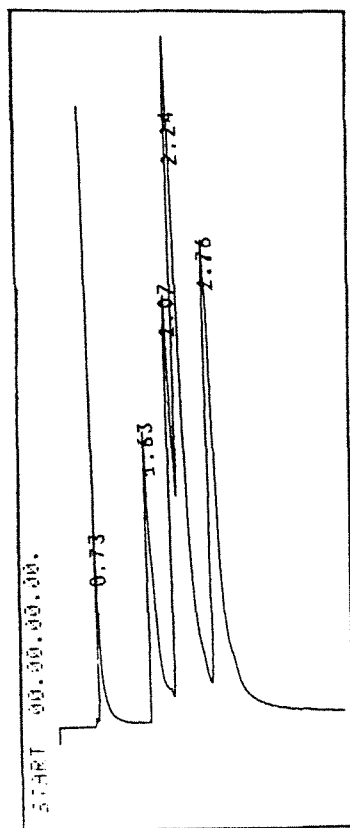


Fig. II. 13 : Dosage des acides gras à courtes chaînes par CPG.

Temps de rétention du :

Méthanol : 0,7 min

Acétate : 1,6 min

Propionate : 2,1 min

Isobutyrate : 2,2 min

Butyrate : 2,75 min

II. 6. Détermination des activités enzymatiques

II. 6. 1. Préparation des extraits acellulaires

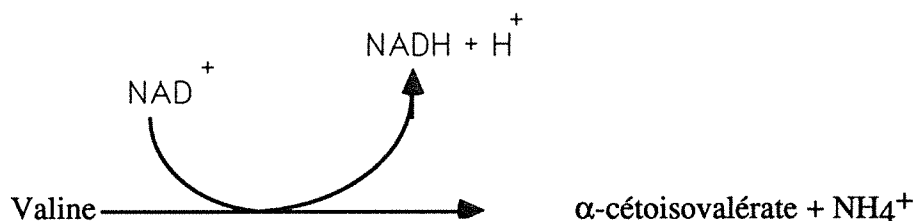
Le mycélium est séparé du milieu de culture par centrifugation à 11 500 g pendant 10 min puis lavé deux fois par centrifugation avec de l'eau distillée. Après lavage, il est resuspendu dans 10 ml de tampon phosphate (0,05 M, pH 8,0). Le mycélium est ensuite désintégré par sonication dans une cellule réfrigérée à 4°C. Les conditions de sonication ont été optimisées au laboratoire pour notre souche, de manière à obtenir l'extraction du maximum d'activités enzymatiques (temps : 5 min ; puissance : 120 W). Les fragments cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation de l'extrait brut à 12 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant récupéré est maintenu dans la glace fondue et utilisé immédiatement pour le dosage des différentes activités enzymatiques.

II. 6. 2. Dosage de l'activité valine déshydrogénase (VDH)

D'après Omura et al. (1983b).

• Principe

La valine déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



Le principe de cette méthode repose sur la mesure spectrophotométrique à 340 nm du NADH produit par la déshydrogénation de la valine.

• Protocole

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

tampon glycine-NaOH de pH 10,6	100 mM
valine	50 mM
NAD ⁺	0,5 mM
extrait acellulaire	20 à 100 µl

Le volume final est de 2 ml. Après réglage du zéro, la réaction est déclenchée par l'addition de la valine ; l'évolution du NADH à 340 nm est suivie pendant 120 s à 28°C. Une variation d'absorbance d'une unité correspond à la formation de 482 nmoles de NADH. L'activité enzymatique est exprimée en nmoles de NADH formé par min et par mg de protéines (nmol/min/mg prot).

II. 6. 3. Dosage de l'activité cétoisovalérate déshydrogénase (CIVDH)

• Principe de dosage de l'isobutyryl-CoA

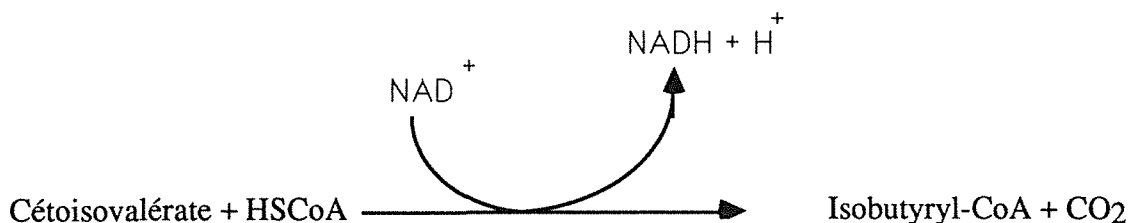
En général, les acyl-CoA sont séparés par HPLC sur des colonnes en phase inverse (C_{18}), avec un ordre d'élution basé sur leur caractère lipophile. La phase mobile est constituée d'un mélange variable de méthanol pur et d'acétate de sodium (50 mM) à pH 5,3 préalablement filtré et dégazé. En augmentant 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 255 nm des composés contenant le coenzyme A.

La colonne utilisée est une C_{18} μ BONDAPAK 125 Å 10 μ m (3,9 x 300 mm). Elle est équilibrée avec de l'acétate de sodium (50 mM, pH 5,3) pendant 10 min avant chaque injection. Le volume de l'échantillon injecté est de 50 μ l. L'élution est réalisée selon un gradient linéaire de méthanol (A) et d'acétate de Na (50 mM, pH 5,3) (B) comme indiqué sur le tableau II. 1. Le débit utilisé est de 2 ml. min⁻¹.

Temps (min)	% (A)	% (B)
0	0	100
15	20	80
40	30	70

Tableau II. 1: Gradient d'élution de l'isobutyryl-CoA

La cétoisovalérate déshydrogénase (CIVDH) catalyse la réaction :



L'essai est basé sur la détermination et la quantification du produit de la réaction, l'isobutyryl-CoA, par HPLC (temps de rétention du produit, le spectre UV et l'absorption du produit à une longueur d'onde de 255 nm) (Fig. II. 14).

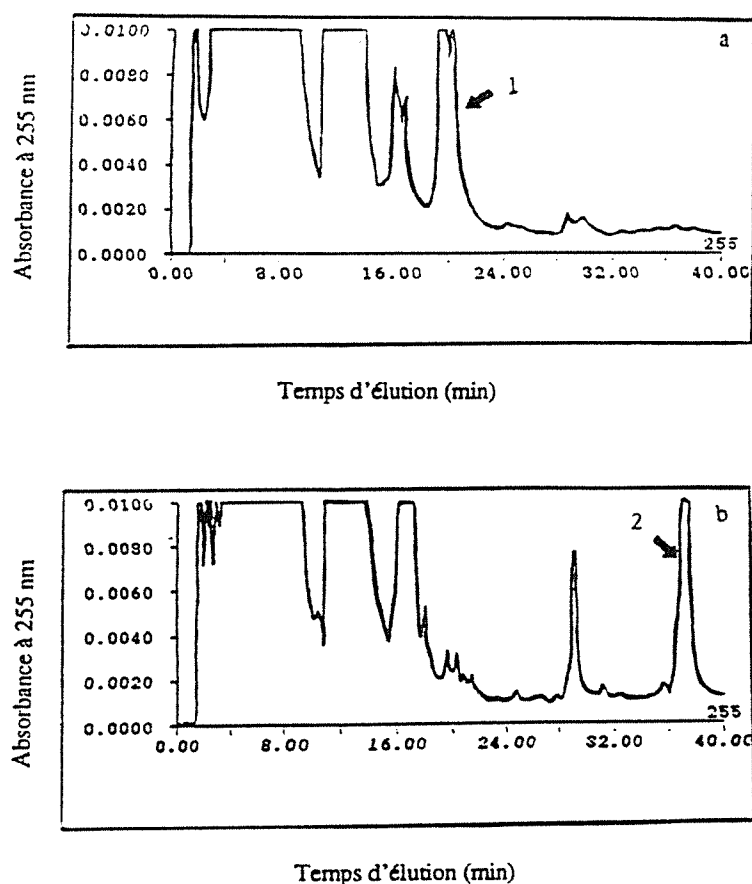


Fig. II. 14 : Profil d'élution du milieu réactionnel de la CIVDH :

a : Témoin de la réaction CIVDH, b : Réaction CIVDH

1 : HS-CoA, 2 : Isobutyryl-CoA

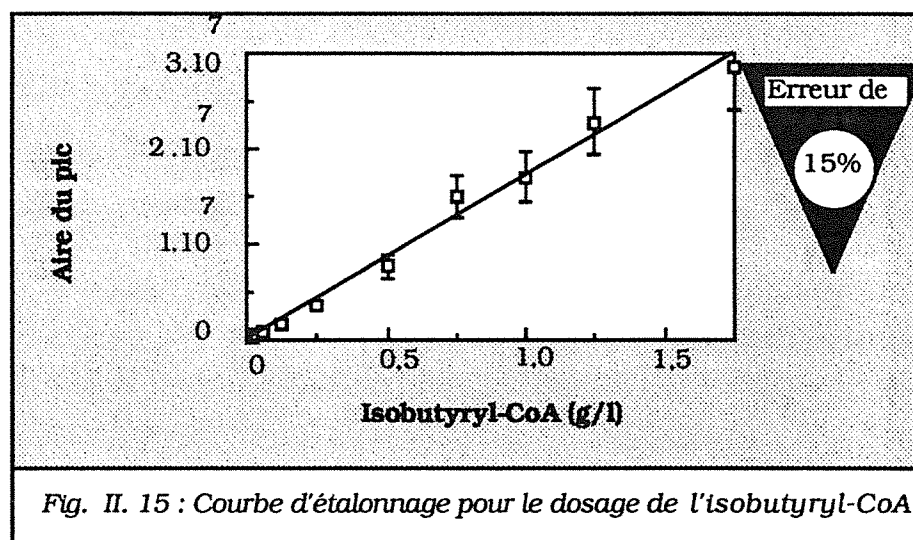
La composition du milieu réactionnel est la suivante :

tampon phosphate de potassium	0,5 mM
chlorure de magnésium	10 mM
NAD ⁺	0,1 mM
cystéine hypochloride (neutralisée)	30 mM
thiamine pyrophosphate	20 mM
HS-CoA	3 mM
cétoisovalérate	0,1 mM

Le volume final du milieu réactionnel est de 750 μ l.

La réaction est démarrée par ajout de l'extrait enzymatique (150 μ l). Elle dure 10 min à 25 °C (conditions optimisées). Elle est stoppée par addition d'une solution à 10% d'acide trichloroacétique (TCA) (150 μ l). 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 nmoles d'isobutyryl-CoA formées par min et par mg de protéines, en référence à une analyse avec de l'isobutyryl-CoA commercial de concentrations déterminées (Fig. II. 15).



II. 6. 4. Dosage des activités phosphatases alcalines

Méthode de Schindelmeister et Pape (1981).

• Principe

La phosphatase libère la fonction phosphate du noyau nitrophényle du substrat paranitro-phénylphosphate. Le noyau nitrophényle est un chromogène qui donne une coloration jaune absorbant dans le visible (405 nm).

• Mesure de l'activité phosphatase

Le mélange réactionnel se compose pour 750 μ l, de :

- tris-HCl 1,0 M, pH 7,4 400 μ l
- p-nitrophényl phosphate 14,5 mM 250 μ l

La réaction est démarrée avec 100 μ l d'extrait acellulaire ou de milieu de culture filtré. On mesure la variation de l'absorbance par min à 405 nm à 28°C, contre un blanc ne contenant pas d'extrait enzymatique.

Une unité enzymatique est définie comme la variation de 0,01 UA (Unité d'Absorbance) par min.

L'activité enzymatique est exprimée en UA. mg^{-1} de protéines.

II. 7. Dosage des protéines

Méthode de Lowry et al. (1951).

• Principe

C'est un dosage qui combine la réaction du Biuret entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre en milieu alcalin et la réduction des résidus tyrosine et tryptophane par le réactif de Folin (réactif phosphomolybdique-phospho-tungstique). Il apparaît une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 600 nm.

• Réactifs

A : Na_2CO_3 à 2% dans la soude 0,1M

B : 0,5 g de CuSO_4 dans 50 ml d'eau

C : 1 g de tartrate double de Na et de K dans 50 ml d'eau

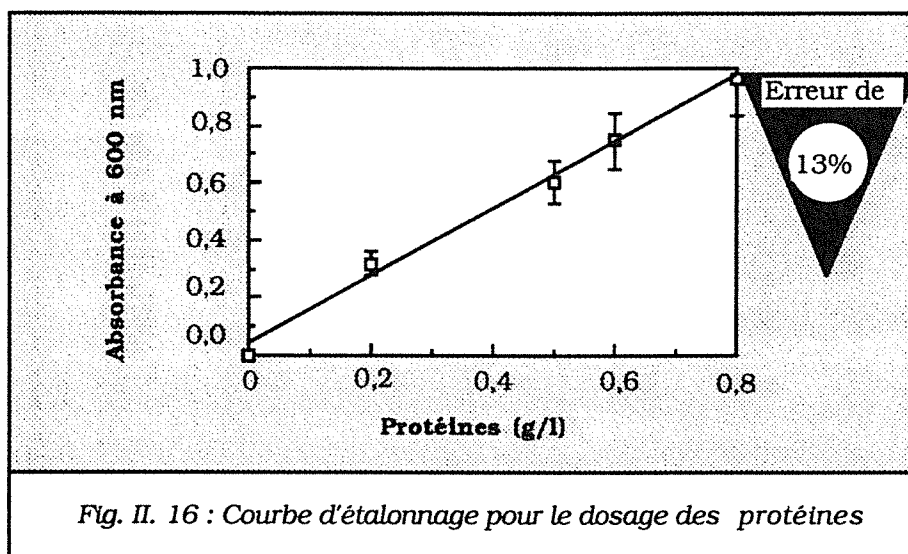
La solution réactive est formée de 50 volumes de A pour 0,5 volume de B et C.

D : réactif de Folin dilué au 1/3

• Protocole

A 1 ml d'échantillon sont additionnés 5 ml de la solution réactive. Après 10 min de repos à température ambiante, 0,5 ml de réactif de Folin est ajouté. Les tubes sont laissés 30 min dans l'obscurité. L'absorbance est déterminée à 600 nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations de sérum albumine bovine (BSA) de 0,1 à 0,8 g. l^{-1} (Fig. II. 16).



II. 8. Electrophorèse des protéines solubles

D'après Laemmli et Favre (1973).

L'étude des profils électrophorétiques des protéines solubles de *S. ambofaciens* dans différentes conditions de culture a été réalisée sur un gel de gradient de concentrations d'acrylamide en système discontinu et en présence de SDS. L'emploi d'un tel gel nous permet, en plus de sa meilleure résolution, une séparation des protéines dans une large gamme de poids moléculaires. Le système discontinu permet de concentrer les protéines avant leur séparation.

• Préparation de l'échantillon

L'échantillon est dilué à une concentration finale de 1 mg de protéines solubles par ml dans un tampon Tris-HCl (166 mM, pH 6,8) contenant 7% de SDS (p/v), 5% de 2-mercaptoéthanol (v/v) et 10 % de glycérol à 50 % (v/v) dans l'eau puis coloré avec une solution de bleu de bromophénol (0,01 % p/v dans l'eau). L'ensemble est chauffé 5 min à 100°C.

• Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Nous avons utilisé la méthode en tampons discontinus. Le gel de séparation est formé d'un gradient d'acrylamide 10 - 25% et le gel de concentration est coulé sur le précédent. La composition des gels est donnée dans le tableau II. 2.

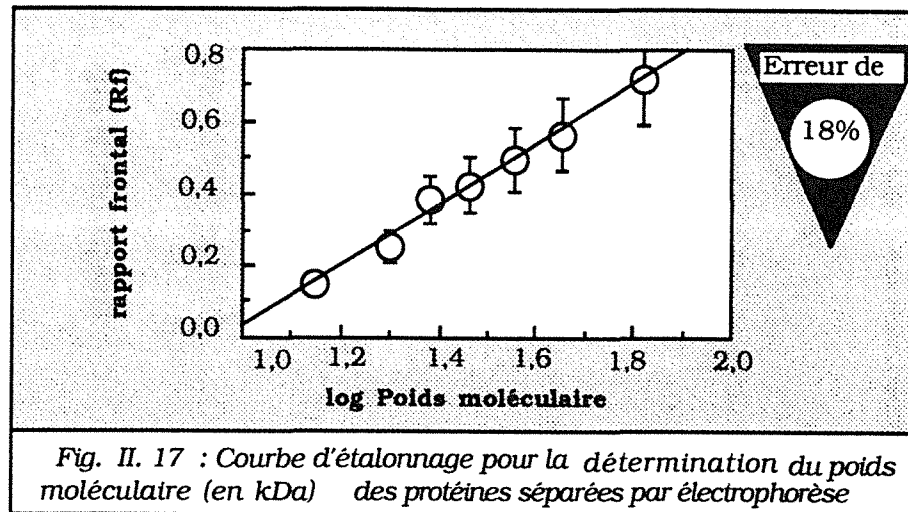
Solutions	10% d'acrylamide		25% d'acrylamide		Gel de concentration	
	volume (ml)	concentration finale	volume (ml)	concentration finale	volume (ml)	concentration finale
Acrylamide 36% (p/v) 1 g de bisacrylamide	8,3	10%			1,5	5,3%
Acrylamide 50% (p/v) 1,4 g de bisacrylamide			4,2	25%		
Tampon Tris-HCl (1,5 M pH 8,8)	7,5	0,38 M	1,9	0,38 M		
Eau	13,4	45%			5,8	85%
Saccharose 22,6% (p/v)			1,3	3,9%		
Tampon Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)					2,5	0,12%
SDS 10% (p/v)	0,3	0,1%	0,075	0,1%	0,2	0,2%
TEMED	0,04	0,1%	0,01	0,01%	0,01	0,1%
Persulfate d'ammonium	0,12	0,02%	0,03	0,02%	0,2	0,1%

Tableau II. 2 : Composition du gel de séparation avec le gradient linéaire d'acrylamide et du gel de concentration.

La migration est effectuée en utilisant un tampon d'électrodes Tris-0,3 M-glycine (0,38 M, pH 8,3), pendant 2 h, avec un courant de 60 mA et une tension de 500 V. Les protéines sont fixées par le TCA (12 %) durant 45 min et sont révélées pendant 2 h par le bleu de Coomassie R 250 à 0,1 %. La décoloration est ensuite effectuée par le mélange acide acétique-méthanol-eau (7,5 : 30 : 62,5). Les protéines étalons sont :

- albumine sérique bovine 66 kDa
- albumine ω 45 kDa
- glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 36 kDa
- anhydrase carbonique 29 kDa
- trypsinogène bovin 24 kDa
- inhibiteur trypsique 20 kDa
- α -lactalbumine 14 kDa

Le poids moléculaire des différentes protéines séparées est déterminé par référence à la migration des protéines étalons (Fig. II. 17).



II. 9. Détermination des paramètres cinétiques et des rendements des fermentations

II . 9. 1. Fermentation en fioles d'Erlenmeyer

Lors des cultures en fioles d'Erlenmeyer les paramètres cinétiques déterminés correspondront à des valeurs globales maximales. Il est difficile d'apprécier la précision de ces paramètres, cependant l'estimation de ces différents paramètres étant faite de la même manière pour toutes les expériences, la comparaison des résultats est possible.

- La vitesse spécifique de croissance est déterminée par la pente obtenue en traçant le logarithme de MS en fonction du temps. Le plus souvent, nous avons déterminé la vitesse spécifique de croissance maximale.

- La vitesse spécifique de consommation des substrats équivaut au rapport de la vitesse de consommation, calculée à partir de la plus grande pente lors de la phase exponentielle de croissance sur la biomasse moyenne lui correspondant.

- La vitesse spécifique de production de spiramycine correspond également à la plus grande pente issue de la différence entre deux ou trois points de spiramycine produite sur la biomasse moyenne comprise entre la première et la dernière valeur utilisée pour calculer la vitesse de production.

- Le rendement de la spiramycine par rapport à la biomasse est un rendement global : il correspond au rapport du maximum de spiramycine produite par le maximum de biomasse. Bien que cette valeur ne soit pas représentative de la production réelle par quantité de bactéries, nous l'utilisons afin de comparer certains résultats des fermentations réalisées. Suivant les conditions de culture, la production peut être très tardive. La biomasse est alors faible ou même indéterminable à cause du problème de précipitation lors de son évaluation. La détermination de rendements instantanés est donc impossible.

II. 9. 2. Fermentation en réacteur

II. 9. 2. 1. En discontinu

La détermination des paramètres se fait comme décrit précédemment pour les fermentations en fioles d'Erlenmeyer.

II. 9. 2. 2. En semi-continu

Le calcul des paramètres cinétiques instantanés a été possible.

Les variations expérimentales ont été minimisées par lissage des courbes afin d'établir des cinétiques lisibles.

Le taux de croissance, μ (h^{-1}) est calculé à partir de l'équation :

$$\mu \cdot X \cdot V = \frac{d(X \cdot V)}{dt}$$

$$\text{Equation 1 : } \mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} + \frac{Q}{V}$$

La vitesse spécifique de consommation des substrats, q_s ($g \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) est déterminée d'après l'équation du bilan sur les substrats :

$$Q \cdot S_0 - q_s \cdot X \cdot V = \frac{d(S \cdot V)}{dt}$$

$$\text{Equation 2 : } q_s = \frac{1}{X} \left(\frac{Q}{V} (S_0 - S) - \frac{dS}{dt} \right)$$

La vitesse spécifique de production de l'antibiotique, q_p ($mg \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) est déterminée d'après l'équation du bilan sur les produits :

$$q_p \cdot X \cdot V = \frac{d(P \cdot V)}{dt}$$

$$\text{Equation 3 : } q_p = \frac{1}{X} \left(\frac{dP}{dt} + \frac{P \cdot Q}{V} \right)$$

- X : biomasse en matière sèche ($g \cdot l^{-1}$) P : concentration de l'antibiotique dans le réacteur ($mg \cdot l^{-1}$)
 V : volume du fermenteur (l) S_0 : concentration d'un substrat dans le milieu d'alimentation ($g \cdot l^{-1}$)
 t : temps de la fermentation (h) S : concentration d'un substrat dans le réacteur ($g \cdot l^{-1}$)
 Q : débit de l'alimentation ($l \cdot h^{-1}$)



CHAPITRE

3



RESULTATS

PARTIE
III. 1

EFFET DE LA VALINE ET DES
IONS AMMONIUM SUR LA
PRODUCTION DE SPIRAMYCINE

INTRODUCTION

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que la production de spiramycine par *S. ambofaciens* est influencée par la nature et la concentration de la source d'azote dans le milieu de culture. Utilisés en excès par rapport à la source carbonée, les ions ammonium défavorisent la production de spiramycine alors que les nitrates même à forte concentration mènent à une bonne production de spiramycine (Untrau-Taghian, 1993). L'effet neutre des nitrates s'expliquerait par leur mode d'assimilation lente. En effet, l'assimilation est précédée d'étapes de réduction aboutissant à un apport lent et continu de NH_3 .

Lamsaïf (1992) a testé plusieurs acides aminés quant à leur efficacité à générer la production de spiramycine et a classé les différents acides aminés en trois catégories :

1. Les acides aminés qui ne permettent qu'une faible production de spiramycine. Ceci est le cas de l'arginine, de la glutamine, de la cystéine et de la proline.

2. Les acides aminés qui assurent une bonne production de spiramycine même à fortes concentrations, c'est-à-dire en excès par rapport à la source de carbone ; ceci est le cas de la lysine.

3. Les acides aminés qui assurent une bonne production quand leur concentration n'est pas en excès par rapport à la source de carbone mais qui limitent cette production quand ils sont présents en excès. Ceci est le cas de la valine, de la thréonine et de l'alanine. Le même effet est obtenu avec la sérine, la glycine et le glutamate bien que la production maximale soit plus faible.

L'introduction d'un agent chélatant les ions ammonium dans une culture contenant l'arginine ou la glutamine, a permis de démontrer que la faible production de spiramycine dans ce milieu de culture, était la conséquence d'une forte concentration en ions ammonium (Untrau-Taghian, 1993).

Une étude du catabolisme de la lysine chez *S. ambofaciens*, a montré que cet acide aminé qui est l'objet d'une transamination (grâce à la cadavérine aminotransférase) donne un rendement en spiramycine élevé pour différentes raisons : il mène à une croissance lente, il ne permet pas de relargage d'ions ammonium et le catabolisme de son squelette carboné conduit à l'acétyl-CoA qui est l'un des précurseurs principaux de la biosynthèse de l'aglycone de la spiramycine (Untrau *et al.*, 1992).

Contrairement à la lysine, la valine subit une désamination oxydative qui permet à la fois un apport en précurseurs (acyl-CoA pour la synthèse de spiramycine) et une libération dans le milieu de culture d'ions ammonium. Cependant l'augmentation de sa concentration conduit à une diminution de la production de spiramycine. Ce phénomène serait sans doute dû à une forte excrétion d'ions ammonium dans le milieu de culture, lors de son catabolisme.

Afin de confirmer cette hypothèse : démontrer l'effet négatif des ions ammonium sur la production de spiramycine, la présente étude a été entreprise.

Ce travail constituera le prélude d'une partie ultérieure portant sur la régulation du catabolisme de la valine qui a pour but de préciser quelque peu les niveaux d'action des ions ammonium.

RESULTATS

1. Comparaison des effets de deux sources d'azote sur la croissance de *S. ambofaciens* et la production de spiramycine

Deux sources d'azote, minérale (le chlorure d'ammonium) ou organique (la valine) à une concentration de 25 mM ont été testées pour la croissance et la production de spiramycine en utilisant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone sur le milieu synthétique de base précédemment décrit dans le chapitre "Matériels et méthodes § I. 4. 2. 2". Les résultats obtenus sont résumés sur les Fig. III. 1. 1 et III. 1. 2.

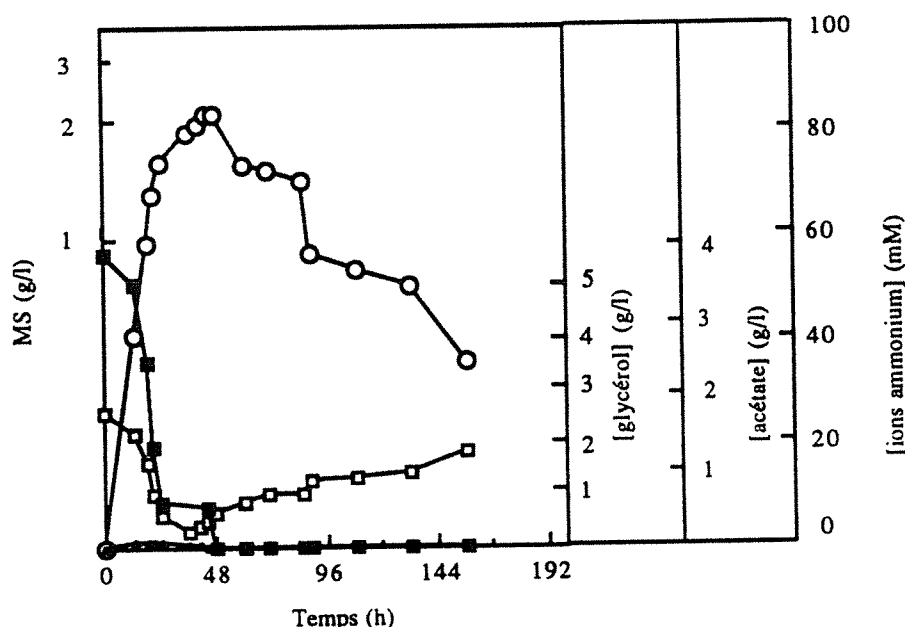


Fig. III. 1. 1. Effet d'une source azotée minérale : le chlorure d'ammonium à 25 mM, sur la croissance et la production de spiramycine

Cinétiques de croissance (MS) (O) , de consommation du glycérol (■), d'assimilation et de production des ions ammonium (□), de production et d'assimilation d'acétate (▲) sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone et le chlorure d'ammonium à 25 mM comme source d'azote.

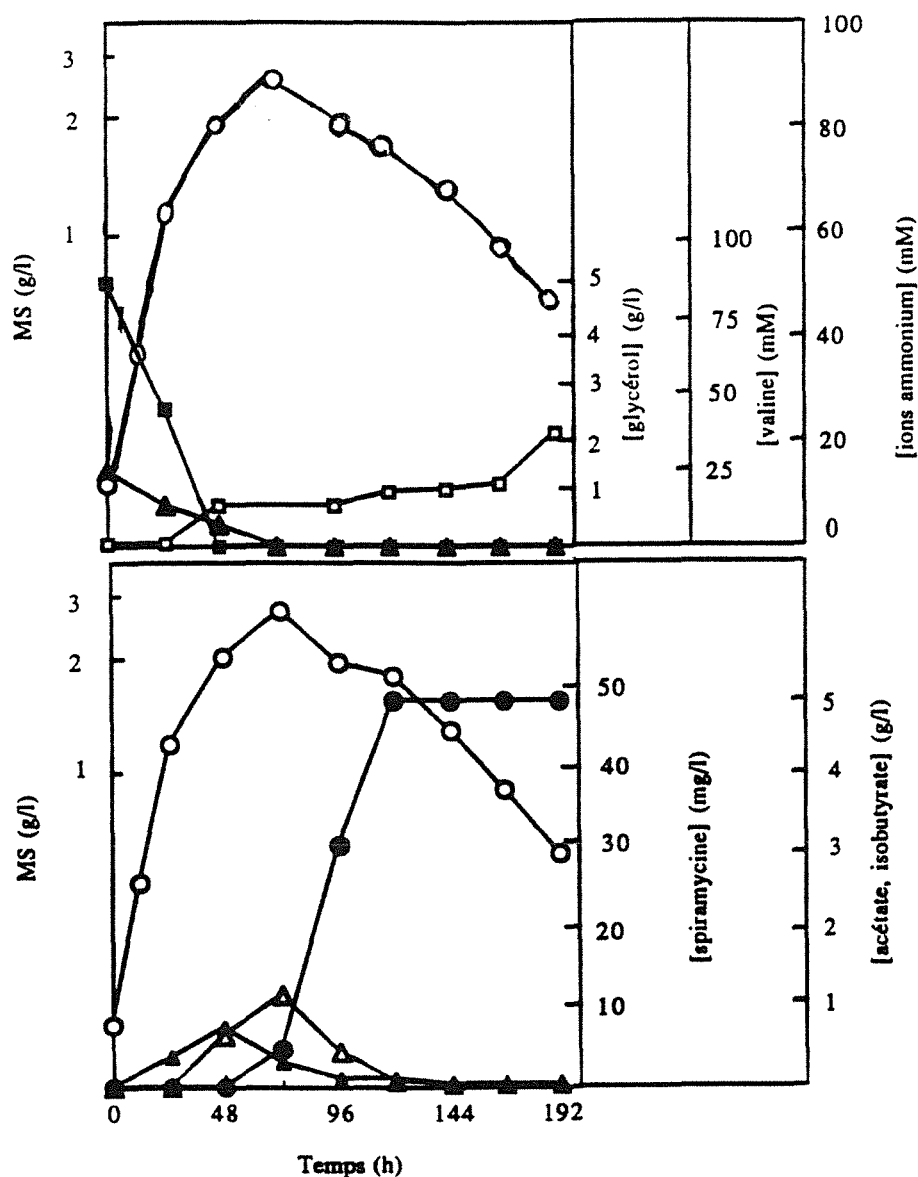


Fig. III. 1. 2 . Effet d'une source azotée organique : la valine à 25 mM. sur la croissance et la production de spiramycine

Cinétiques de croissance (MS) (O), de consommation du glycérol (■), de consommation de valine (▲), de production et d'assimilation d'acétate (△), de production et d'assimilation d'isobutyrate (△), d'excrétion d'ammonium (□) et de production de spiramycine (●) sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l^{-1} comme source de carbone et la valine à 25 mM comme source d'azote.

La croissance de *S. ambofaciens* est plus rapide sur NH_4Cl ($\mu_{\max} = 0,1 \text{ h}^{-1}$) que sur valine ($\mu_{\max} = 0,05 \text{ h}^{-1}$). La vitesse spécifique de consommation du glycérol est plus élevée sur chlorure d'ammonium ($q_{\text{gly}} = 0,20 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) que sur valine ($q_{\text{gly}} = 0,1 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). La vitesse spécifique de consommation de la valine est plus faible ($q_{\text{val}} = 0,02 \text{ mmol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) que celle du chlorure d'ammonium ($q_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 0,06 \text{ mmol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). Le rendement en biomasse obtenu durant la phase de croissance avec valine ($Y_{x/\text{gly}} = 0,6 \text{ g MS. g}^{-1}$) est plus élevé qu'avec NH_4Cl comme source d'azote ($Y_{x/\text{gly}} = 0,4 \text{ g MS. g}^{-1}$). Ceci indique qu'en présence de valine, le glycérol n'est pas la seule source de carbone impliquée dans la formation de la biomasse.

En présence de valine, de l'acétate ($0,65 \text{ g. l}^{-1}$) puis de l'isobutyrate (1 g. l^{-1}) sont excrétés. Ces métabolites seront réassimilés en phase de production. Par contre dans la culture où la source d'azote est représentée par les ions ammonium, seul de l'acétate est détecté ($0,04 \text{ g. l}^{-1}$).

La production de spiramycine, en présence de valine, commence à 72 h. La vitesse spécifique de production maximale (q_{spira}) atteint $0,5 \text{ mg. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$. La production volumétrique maximale et le rendement global en spiramycine sont respectivement de 48 mg. l^{-1} et $16 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MS}$. Il n'y a pas de production de spiramycine quand la valine est remplacée par les ions ammonium.

Quelle que soit la source d'azote, environ 20 mM d'ions ammonium sont relargués en fin de fermentation dans le milieu de culture résultant probablement de la protéolyse.

2. Origine de l'acétate et de l'isobutyrate

En plus du taux de croissance lent observé sur valine, la différence majeure qui caractérise cette fermentation permettant la production de spiramycine par opposition à la culture sur chlorure d'ammonium, est l'excrétion d'acides gras à courtes chaînes : l'acétate et l'isobutyrate.

Pour expliquer l'origine de l'acétate nous postulons que la fraction carbonée de la valine alimente le cycle de Krebs via le succinyl-CoA aboutissant à un freinage de l'entrée de l'acétyl-CoA originaire de la source de carbone dans le cycle de Krebs. Ceci entraînera une accumulation intracellulaire d'acétyl-CoA et une excrétion de l'acétate dans le milieu de fermentation. Pour éprouver cette hypothèse, des fermentations sur milieu synthétique de base contenant le glycérol ou le glucose (5 g. l^{-1}) comme source de carbone et soit de l'aspartate ou du succinate plus des ions ammonium (30 mM) comme source azotée ont été menées. Alimentant également le cycle de Krebs, aspartate et succinate pourraient aussi entraîner une excrétion d'acétate. Le tableau III. 1. 1 résume les résultats obtenus.

Source carbonée	[glucose] 5 g. l ⁻¹			[glycérol] 5 g. l ⁻¹		
	[Acétate]	[Isobutyrate]	Y _{spira}	[Acétate]	[Isobutyrate]	Y _{spira}
Source azotée	(mg. l ⁻¹)	(mg. l ⁻¹)	(mg. g ⁻¹ MS)	(mg. l ⁻¹)	(mg. l ⁻¹)	(mg. g ⁻¹ MS)
valine 30 mM	700	660	11	750	800	15
Aspartate 30 mM	175	0	0	160	0	0
Succinate 30 mM + NH ₄ Cl 30 mM	125	0	0	125	0	0
NH ₄ Cl 30 mM	40	0	0	40	0	0

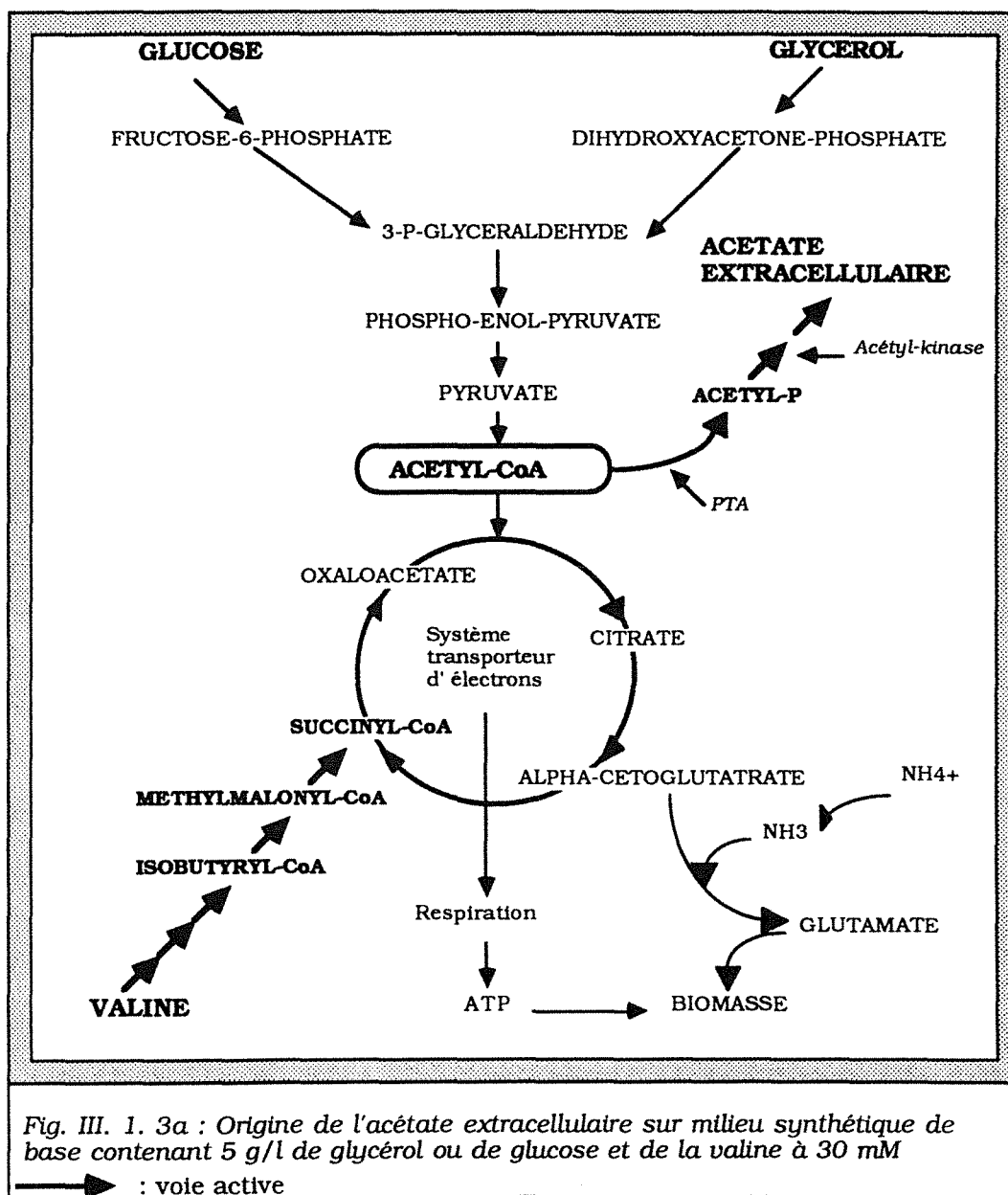
Tableau III. 1. 1 : Origine de l'acétate et de l'isobutyrate excrétés dans le milieu de culture

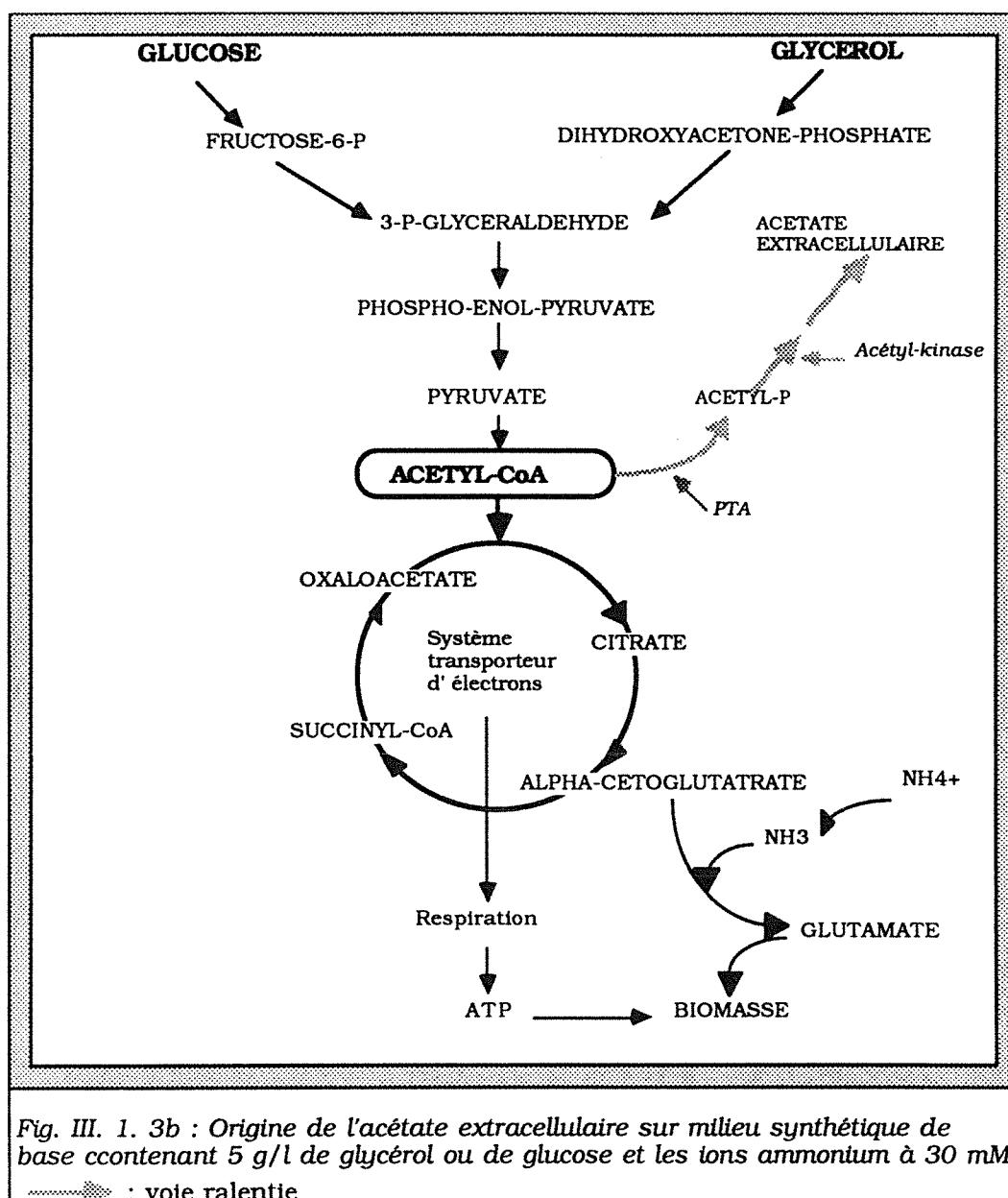
En présence de la valine, l'excrétion de l'acétate est d'environ 700 mg. l⁻¹. Avec l'aspartate ou le succinate, cette production atteint seulement 150 mg. l⁻¹. Elle est cependant nettement plus élevée que celle obtenue sur milieu contenant le glycérol ou le glucose plus les ions ammonium (40 mg. l⁻¹ d'acétate excrété). Ces résultats peuvent indiquer qu'en présence de valine, dont le catabolisme est accru, une grande partie de l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse du glucose et du glycérol, est excrété dans le milieu de culture (Fig. III. 1. 3a). En présence d'ions ammonium comme source d'azote, la quasi-totalité de l'acétate issu de la glycolyse alimente le cycle de Krebs (Fig. III. 1. 3b). Avant d'alimenter le cycle de Krebs, l'aspartate et le succinate doivent subir respectivement une réaction de transamination et d'activation. Ces étapes seraient plus limitantes que celles du catabolisme de la valine et une plus grande partie de l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse alimenterait le cycle de Krebs (Fig. III. 1. 3c).

Ceci est confirmé par la mesure du flux carboné dans les cultures contenant de l'ammonium et de la valine comme source d'azote. Dans le cas de l'ammonium (Fig. III. 1. 1), le glycérol apporte 0,98 g de carbone pour 1 g de biomasse ($Y_{x/gly} = 0,4 \text{ g MS. g}^{-1}$). Ceci suggère que c'est le métabolisme respiratoire qui intervient. Avec la valine (Fig. III. 1. 2), seulement 0,65 g de carbone issu du glycérol interviennent dans la formation d'1 g de biomasse ($Y_{x/gly} = 0,6 \text{ g MS. g}^{-1}$). Ce résultat indique que le glycérol n'est pas l'unique source de carbone mais que la valine remplit aussi ce rôle. Le reste du carbone de cet acide aminé se retrouve dans l'isobutyrate, l'acétate et le CO₂. L'utilisation de marqueurs radioactifs serait le meilleur moyen pour s'assurer de l'origine de l'acétate incorporé dans

l'aglycone de la spiramycine (valine ou source carbonée) et d'étayer les hypothèses formulées sur l'origine de l'acétate excrété.

Quelle que soit la source de carbone utilisée (glucose ou glycérol), l'isobutyrate est détecté seulement en présence de valine. L'isobutyrate est donc bien un métabolite issu de la dégradation de la valine.





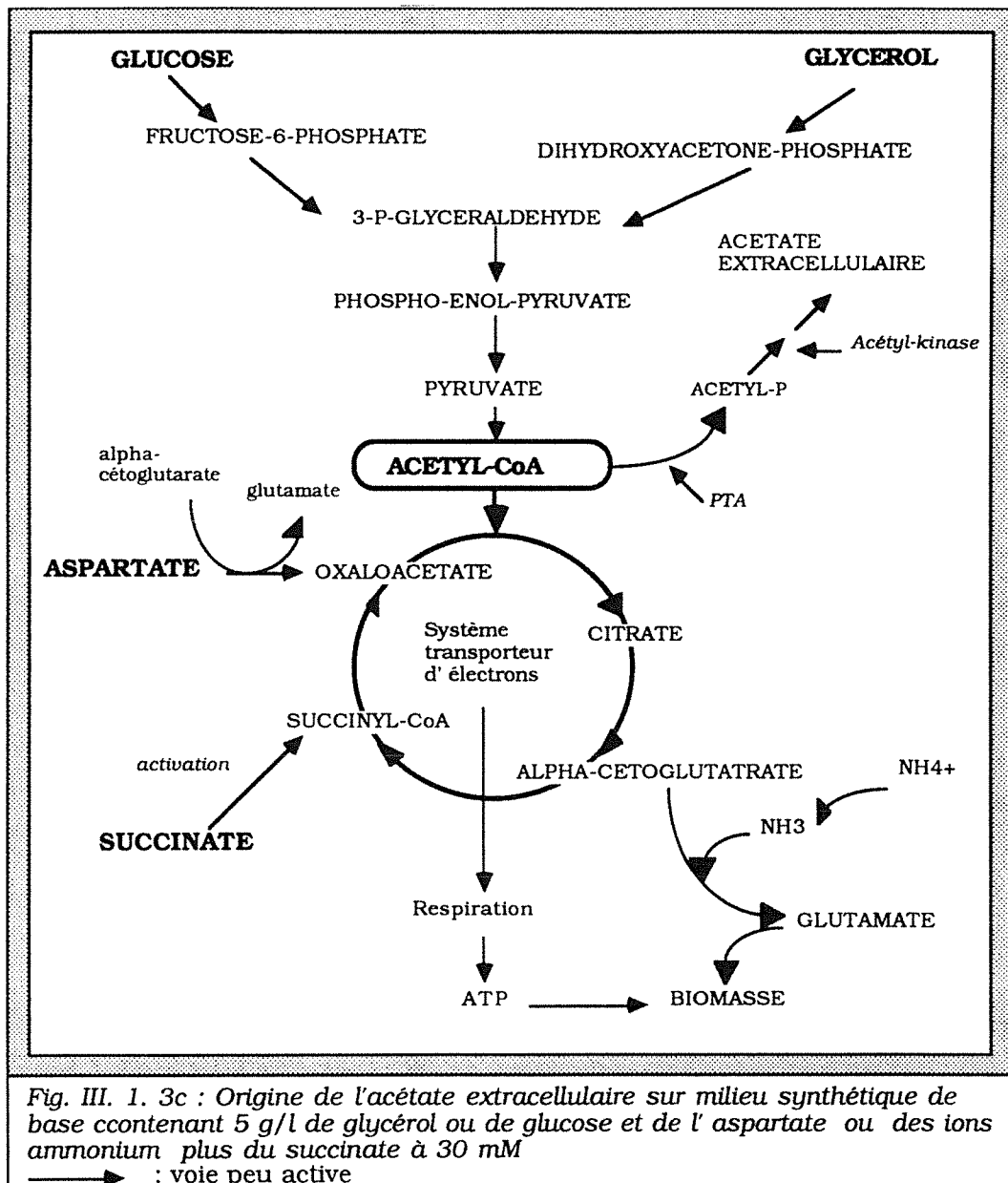


Fig. III. 1. 3c : Origine de l'acétate extracellulaire sur milieu synthétique de base contenant 5 g/l de glycérol ou de glucose et de l' aspartate ou des ions ammonium plus du succinate à 30 mM
 ————— : voie peu active

3. Effet des concentrations croissantes de valine sur la production de spiramycine et le développement de *S. ambofaciens*

Différentes concentrations de valine (25, 50, 75 et 100 mM) ont été testées sur un milieu synthétique de base contenant 5 g. l⁻¹ de glycérol comme source de carbone. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III. 1. 2.

[VALINE] (mM)	25	50	75	100
MS _{max} (g. l ⁻¹)	3	3	2,5	2,5
Rendement global en spiramycine (Y _{spira}) (mg. g ⁻¹ MS)	17	11	5	5
Temps du début de la production de spiramycine (h)	72	72	96	120
Vitesse spécifique de production de spiramycine (q _{spira}) (mg. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0,5	0,3	0,25	0,2
[NH ₄ ⁺] au début de la production de spiramycine (mM)	7,5	7	31	40
[NH ₄ ⁺] en fin de culture (mM)	21	33	65	64
[Isobutyrate] _{max} excrété (g. l ⁻¹)	0,8	2	3	4,5
Vitesse spécifique d'assimilation de l'isobutyrate (q _{isobutyrate assimilation}) (mmol. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0,2	0,1	0	0
[Acétate] _{max} excrété (g. l ⁻¹)	0,75	2,5	5	5
[Valine] résiduelle au début de la production (mM)	0	9,5	15	29
[Glycérol] résiduelle au début de la production (g. l ⁻¹)	0	0	0	0

Tableau III. 1. 2 : Effet de concentrations croissantes de valine sur la production de spiramycine et le développement de *S. ambofaciens*

sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone.

Le pH ainsi que les vitesses spécifiques de croissance ne sont pas significativement affectés en augmentant la concentration de valine. Dans le cas de la fermentation avec 25 mM de valine (Fig. III. 1. 2), la biomasse chute rapidement mais avec 100 mM de valine (Fig. III. 1. 4), la biomasse se maintient à un niveau élevé. Ceci est probablement dû à la réassimilation des acides gras excrétés dans le milieu de culture.

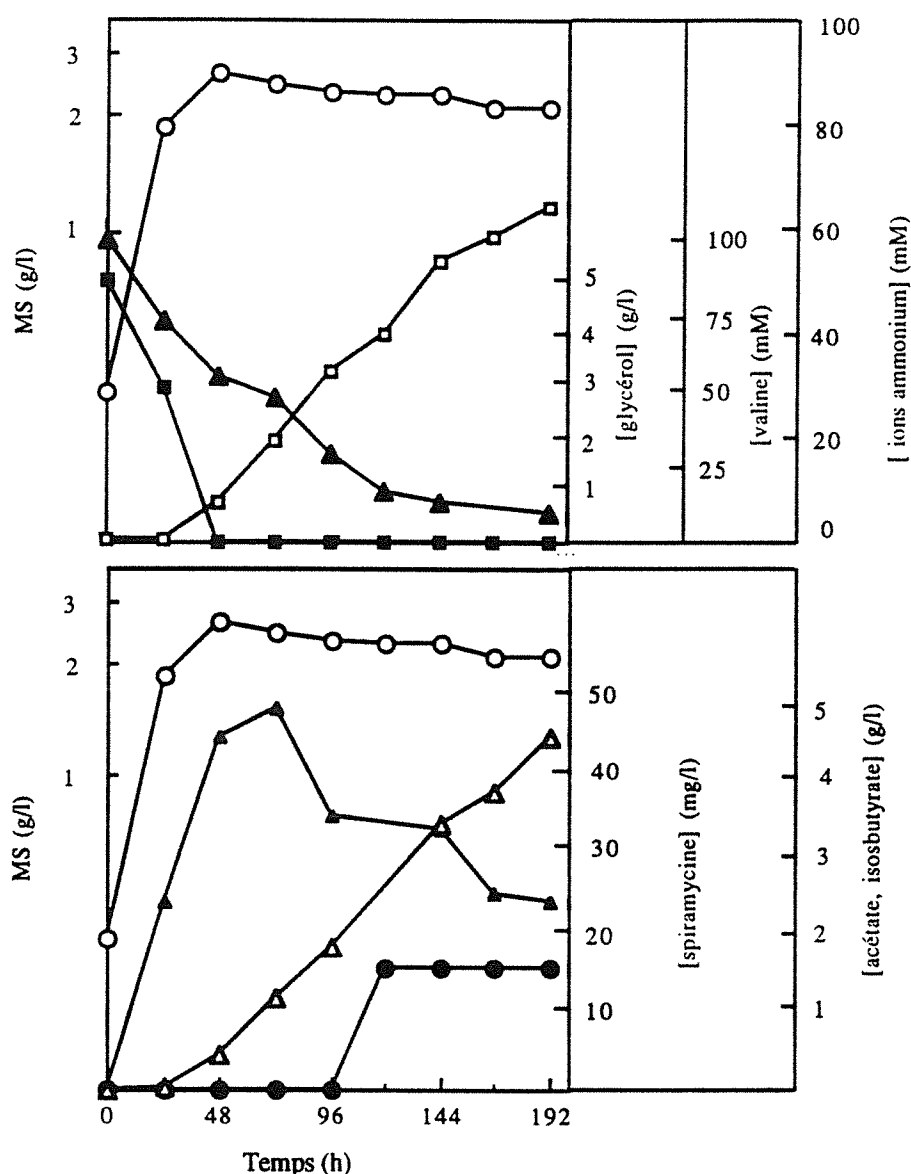


Fig. III. 1. 4. Effet d'une source azotée organique : la valine à 100 mM, sur la croissance et la production de spiramycine

Cinétiques de croissance (MS) (O), de consommation du glycérol (■), de consommation de valine (▲), de production et d'assimilation d'acétate (▲), de production et d'assimilation d'isobutyrate (Δ), d'excrétion d'ammonium (□) et de production de spiramycine (●) sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 100 mM comme source d'azote.

Avec 100 mM de valine, en phase stationnaire les rapports isobutyrate/valine et ammonium/valine sont respectivement 1 et 1,3 mol. mol⁻¹. Ce résultat indique que toute la valine consommée durant la phase stationnaire est transformée en isobutyrate et ammonium. L'excès d'ammonium relargué proviendrait de la protéolyse.

Dans la culture avec 25 mM de valine le début de la synthèse de la spiramycine coïncide avec un épuisement total de la source azotée. Avec les autres concentrations (50, 75, 100 mM), en début de production, les concentrations de valine restante dans les milieux sont respectivement de 10, 16 et 30 mM (Fig. III. 1. 5b). Le catabolisme de la valine conduit à l'excrétion d'ammonium. Au début de la production de la spiramycine, les concentrations en ammonium sont respectivement de 8, 7, 31 et 40 mM pour des concentrations de 25, 50, 75 et 100 mM de valine initiale (Fig. III. 1. 5b). A la fin de la culture l'accumulation en ammonium est d'environ 21, 33, 65, 64 mM respectivement en présence de 25, 50, 75 et 100 mM (Fig. III. 1. 5a). La production de spiramycine montre une relation inverse avec l'ammonium accumulé dans le milieu de culture au moment de la production (Fig. III. 1. 5b). La concentration d'ammonium présente au début de la production influence probablement la biosynthèse de la spiramycine.

La production de la spiramycine chute d'autant plus que la concentration de valine augmente. A concentration élevée en valine (75 et 100 mM), le début de la biosynthèse de la spiramycine est retardé de 48 h. La vitesse spécifique de production et la production spécifique diminuent respectivement de 50% et 70% (Tableau III. 1. 2).

Les concentrations d'acétate et d'isobutyrate excrétés augmentent en fonction de la concentration initiale de valine (Tableau III. 1. 2 et Fig. III. 1. 2 et III. 1. 4). En présence de 25 et 50 mM de valine, l'isobutyrate est reconstitué presque totalement avec respectivement un $q_{\text{isobutyrate}}$ de 0,2 et 0,1 mmol. h⁻¹. g⁻¹ MS. Par contre, dans les milieux avec 75 et 100 mM de valine l'isobutyrate n'est pas réassimilé, son excrétion se poursuit durant la phase stationnaire. L'accumulation de l'isobutyrate durant la phase de production, dans les cultures avec 75 et 100 mM de valine, est accompagnée d'une chute de la biosynthèse de la spiramycine. L'utilisation de concentrations croissantes de valine (jusqu'à 100 mM) entraîne l'augmentation de l'excrétion d'acétate de 6 fois. Sa réassimilation n'est pas totale dans les milieux contenant 75 et 100 mM de valine.

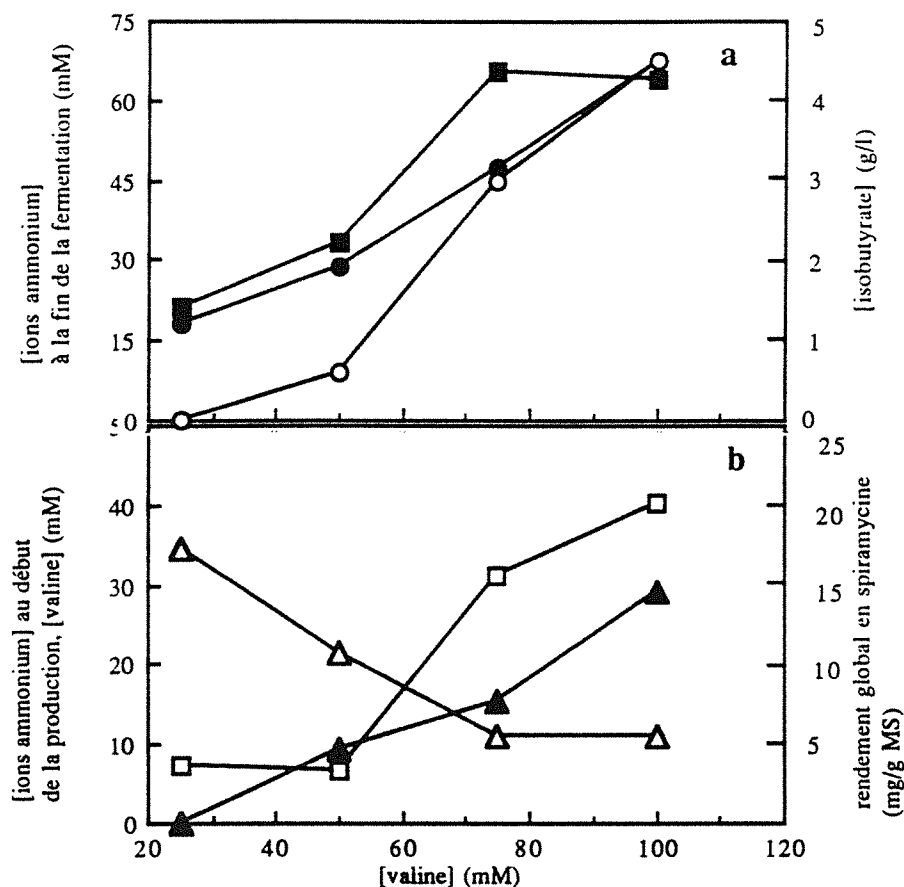


Fig. III. 1. 5. Effet de concentrations croissantes en valine (25, 50, 75, 100 mM) sur la croissance et la production de spiramycine.

sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone

a. Concentrations des ions ammonium en fin de fermentation (■), de l'isobutyrate excrété (●) et de l'isobutyrate résiduel au début de la production de spiramycine (○) en fonction de la concentration initiale en valine .

b. Concentrations de la valine résiduelle au début de la production de spiramycine (▲), de l'ammonium au début de la production (□) et la production de spiramycine (Δ) en fonction de la concentration initiale en valine.

En résumé, il semblerait d'après les résultats du tableau III. 1. 2, qu'il y ait une corrélation inverse entre le rendement en spiramycine et la concentration extracellulaire des ions ammonium présents au début de la production de spiramycine (Fig. III. 1. 5b). Ces ions ammonium proviennent de la désamination de la valine. Leur concentration augmente d'autant plus que la concentration initiale en valine est élevée.

Ces observations nous permettent de conclure qu'une forte concentration en ions ammonium dans le milieu de culture, au moment où la production de spiramycine débute, conduit à une faible production en spiramycine. Celle-ci serait fortement influencée par la concentration de la valine, par l'intermédiaire de la concentration en ions ammonium que celle-ci génère.

Afin de confirmer l'hypothèse de l'effet dépresseur des ions ammonium sur la production de la spiramycine, une expérience dans laquelle une partie de l'excès d'ions ammonium a été insolubilisée grâce à un composé chélateur de ces ions a été envisagée.

4. Influence de la chélation des ions ammonium sur la production de spiramycine

L'influence de la chélation d'une partie des ions ammonium sur la production de spiramycine a été étudiée en utilisant le milieu synthétique de base avec le glycérol à 5 g. l⁻¹ et la valine à 75 mM qui conduit habituellement à de faibles productions de spiramycine. L'agent chélatant utilisé au cours de cette expérience est un sel de phosphate de calcium : le Ca₃(PO₄)₂. Celui-ci a été introduit dans le milieu de culture avant stérilisation des milieux. Le Mg₃(PO₄)₂ n'a pas donné de résultats satisfaisants.

Afin de déterminer la concentration optimale en Ca₃(PO₄)₂ à introduire dans le milieu de culture pour obtenir la meilleure production en spiramycine, trois concentrations (2,5 , 5 et 10 g. l⁻¹) ont été testées. Seul l'ajout d'une concentration de 2,5 g. l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ a donné des résultats convenables pour la production de spiramycine. Des concentrations plus élevées se sont avérées inhibitrices. Cette inhibition est probablement due à un effet négatif exercé par l'excès d'ions phosphate présents dans la molécule du chélatant. Ces résultats ont été confirmés et précisés par la suite.

Dans la culture de *S. ambofaciens* sur le milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹, la valine à 75 mM et additionné de 0,25% de phosphate de calcium, la croissance est accélérée (Fig. III. 1. 6a). La vitesse spécifique de production de spiramycine est de 0,9 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS et le rendement global en spiramycine est de 25 mg. g⁻¹ MS, ce qui correspond à 4 fois plus que ce qui est obtenu sans Ca₃(PO₄)₂ (Fig. III. 1. 6b). La concentration des ions ammonium excrétés diminue en présence de Ca₃(PO₄)₂ (Fig. III. 1. 6c).

Une forte accumulation d'ions ammonium dans le milieu de culture en fin de phase de

croissance, due au catabolisme de la valine semblerait être défavorable à la biosynthèse de la spiramycine. L'agent chélatant en complexant les ions ammonium, diminuerait partiellement cette accumulation en début de production, minimisant ainsi les effets négatifs des ions ammonium sur la production de la spiramycine.

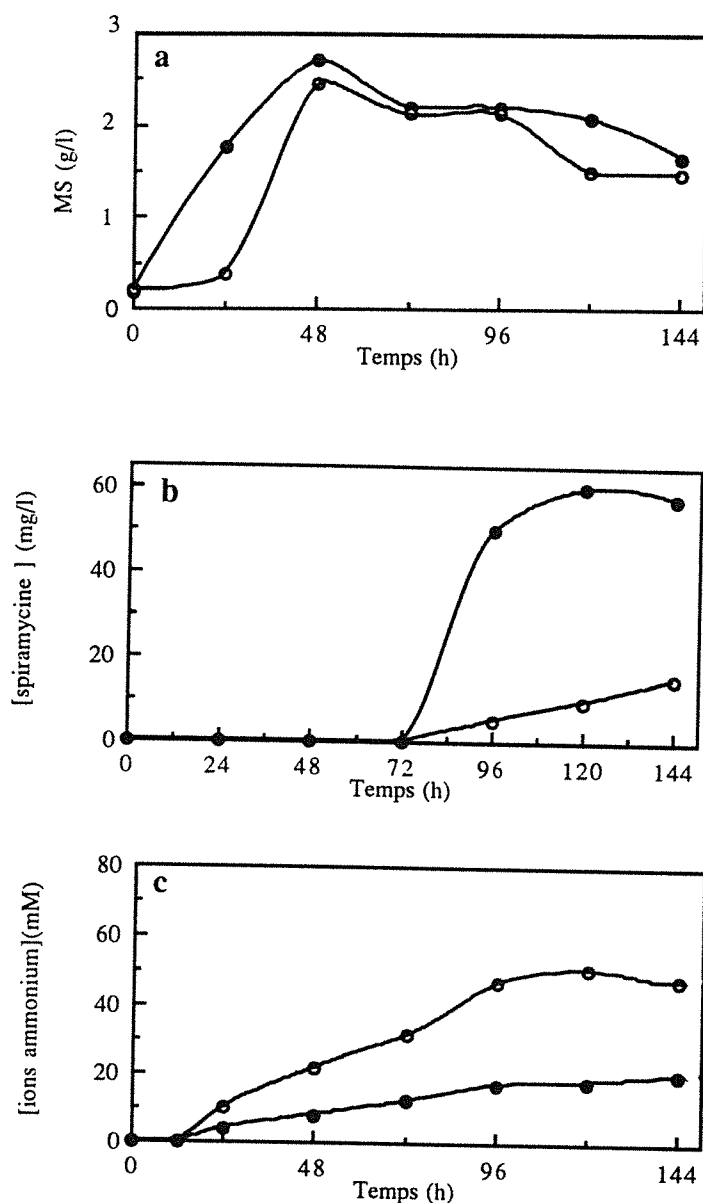


Fig. III. 1. 6. Effet de l'addition du phosphate de calcium sur la croissance et la production de spiramycine.

sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 75 mM comme source azotée.

Cinétiques de croissance (a), de production de spiramycine (b) et de production d'ions ammonium (c) avec (symboles pleins) ou sans (symboles vides) ajout de phosphate de calcium à 0,25%.

5. Effet de l'addition d'ions ammonium sur la production de spiramycine par *S. ambofaciens*

Une autre manière de confirmer l'action négative des ions ammonium sur la production de spiramycine consiste à introduire des ions ammonium à une concentration inhibitrice de la biosynthèse de la spiramycine dans un milieu qui permet habituellement de produire de la spiramycine.

50, 100 et 150 mM de chlorure d'ammonium ont été ajoutés à des cultures de *S. ambofaciens*, sur milieu synthétique de base contenant 25 mM de valine comme source azotée initiale et le glycérol à 5 g. l⁻¹ ou les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone, après 12 h d'incubation.

L'addition de chlorure d'ammonium n'affecte pas significativement la production totale de biomasse finale limitée probablement par la source de carbone. En revanche, la vitesse spécifique de croissance est augmentée. La production de spiramycine est totalement supprimée. L'excrétion de l'isobutyrate est légèrement retardée. Dans ces conditions, il y a peu ou pas de réassimilation de l'isobutyrate (Fig. III. 1. 7). Les cinétiques de production et d'assimilation de l'acétate n'ont pas changé.

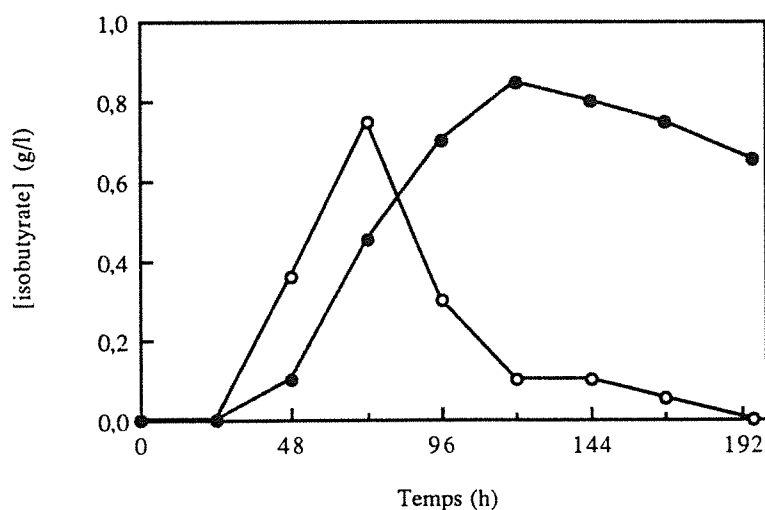


Fig. III. 1. 7. Effet de l'addition, à 12 h, de 100 mM d'ions ammonium sur la croissance et l'assimilation de l'isobutyrate

sur le milieu synthétique de base contenant du glycérol à 5 g. l⁻¹ et de la valine à 25 mM.

Cinétiques d'assimilation de l'isobutyrate avec (●) ou sans (○) ajout de 100 mM d'ammonium.

Par la suite nous avons essayé de déterminer s'il existait une période définie au cours de laquelle s'exerce particulièrement l'action négative des ions ammonium sur la biosynthèse de la spiramycine. Le tableau III. 1. 3 résume les résultats obtenus.

<i>Temps d'addition (h)</i>	<i>MSmax (g. l⁻¹)</i>		<i>Y_{spira} (mg. g⁻¹ MS)</i>		<i>[NH₄Cl] consommé (mM)</i>	
	<i>dextrins</i>	<i>glycérol</i>	<i>dextrins</i>	<i>glycérol</i>	<i>dextrins</i>	<i>glycérol</i>
0	4	1,5	2	0	63	20
24	5	2	0	0	50	0
48	4,5	2	0	0	28	0
96	4	2	17,5	13	0	0
Témoin	3	1,5	25	16	0	0

Tableau III. 1. 3 : Effet de l'addition, à différents temps, de 100 mM d'ions ammonium sur la croissance de *S. ambofaciens* et la production de spiramycine

sur milieu synthétique de base contenant la valine à 25 mM et les dextrines à 15 g. l⁻¹ ou le glycérol à 5 g. l⁻¹.

L'addition de chlorure des ions ammonium (100 mM) à des cultures de *S. ambofaciens* sur milieu synthétique de base contenant la valine à 25 mM et le glycérol à 5 g. l⁻¹ avant le début de la biosynthèse de la spiramycine, cause une suppression de la production de l'antibiotique quand ils sont ajoutés à 24 et 48 h et une réduction sévère lorsqu'ils sont additionnés à 0 h. L'addition d'ammonium à 96 h (juste après le début de la production de spiramycine) provoque une diminution de la production de spiramycine de 20 ou de 30% respectivement sur glycérol ou sur dextrines .

6. Influence de l'effet stimulateur de l'isobutyrate, en présence d'un excès ou d'une limitation d'ammonium, sur la production de spiramycine

Les acides gras à longues chaînes augmentent le rendement de production des macrolides. Ainsi, dans les fermentations industrielles productrices de spiramycine, des huiles végétales sont employées pour apporter un mélange d'acides gras stimulant la synthèse de l'antibiotique (Ninet et Verrier, 1960). Pour la production de tylosine les expériences ont été réalisées avec des molécules en C16 ou C18 comme le palmitate (Omura *et al.*, 1984a) ou le méthyloléate (Gray, 1987). Lamsaïf (1992) et Peroz-Collignon (1993) ont montré que l'hexanoate (acide gras en C6) améliorait la production de spiramycine. Nous avons choisi l'isobutyrate, un catabolite de la valine, pour étudier son effet stimulateur sur la synthèse de la spiramycine et cerner quelque peu le niveau d'action des ions ammonium.

Nous avons étudié l'effet de la concentration de l'isobutyrate et l'influence du temps d'addition sur la production de spiramycine.

Sur milieu synthétique de base contenant le glycérol (5 g. l⁻¹) comme source de carbone et l'ammonium (25 mM) comme source d'azote, différentes concentrations d'isobutyrate (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 mM) ajoutées après 24 h de culture ont été testées.

Jusqu'à 50 mM, l'isobutyrate a un effet favorable sur le maintien du niveau de la biomasse. Il est possible que l'isobutyrate entraîne une modification de la composition de la membrane cytoplasmique et évite le déclin cellulaire. Il a été montré que l'addition d'un acide gras (méthyloléate), précurseur de polyéther produit par *S. hygroscopicus* modifiait la composition lipidique membranaire (David *et al.*, 1992). Le même phénomène est observé chez *S. fradiae* avec l'emploi de palmitate ou d'oléate (Amira *et al.*, 1973).

Au dessus de cette concentration, cet acide gras a un effet inhibiteur sur la croissance. L'isobutyrate ajouté est complètement consommé jusqu'à 25 mM. Au dessus de cette concentration, il reste en excès. La production de spiramycine commence seulement quand la concentration en isobutyrate chute entre 17 et 23 mM. L'addition de 25 et 50 mM d'isobutyrate entraîne respectivement des rendements en spiramycine de 6 et 3 mg. g⁻¹ MS. L'isobutyrate restaure la production de spiramycine mais les rendements obtenus sont plus faibles qu'avec valine comme source d'azote (16 mg. g⁻¹ MS).

Le temps d'ajout de l'isobutyrate peut jouer un rôle important pour la stimulation de la production de spiramycine (Tableau III. 1. 4). 25 mM d'isobutyrate sont ajoutés à différents temps d'incubation, dans des cultures sur milieu synthétique de base contenant 5 g. l⁻¹ de glycérol comme source de carbone avec l'ammonium en limitation (10 mM) ou en excès (30 mM) comme source d'azote.

En présence de 10 mM d'ammonium, l'addition de 25 mM d'isobutyrate à 0 h ou après 24 h d'incubation stimule la production de spiramycine (50%). En présence de 30 mM d'ammonium, l'addition d'isobutyrate à 0 h n'a aucun effet bénéfique, alors que l'addition d'isobutyrate après 24 ou 48 h, améliore fortement la production. Les rendements sont respectivement de 13 et 17 mg. g⁻¹ MS par comparaison au témoin qui ne produit pas de spiramycine. L'addition d'isobutyrate améliore la production de spiramycine mais un retard significatif dans le début de la production est observé. Ceci est probablement dû à la présence d'un excès d'ions ammonium qui empêche l'assimilation de l'isobutyrate et par conséquent la biosynthèse de la spiramycine.

Temps d' addition (h)	Témoin	0	24
MS _{max} (g. l ⁻¹)	1,5	1,5	1
Y _{spira} (mg. g ⁻¹ MS)	10	16	15
q _{spira} (mg. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0,2	0,6	0,8
Temps du début de la production (h)	48	120	150

a : dans des conditions de limitation en ions ammonium sur milieu synthétique de base contenant du glycérol à 5 g. l⁻¹ et du NH₄Cl à 10 mM.

Temps d' addition (h)	Témoin	0	24	48
MS _{max} (g. l ⁻¹)	2	2	2	2
Y _{spira} (mg. g ⁻¹ MS)	0	0	13	17
q _{spira} (mg. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0	0	nd	0,75
Temps du début de la production (h)	-	-	120	90

b : dans des conditions d'excès en ions ammonium sur milieu synthétique de base contenant du glycérol à 5 g. l⁻¹ et du NH₄Cl 30 mM.

Tableau III. 1. 4. Effet du temps d'ajout de l'isobutyrate sur la production de spiramycine.

DISCUSSION

La nature et la concentration de la source azotée utilisée dans un milieu de fermentation joue un rôle important dans la production des macrolides.

La production de spiramycine sur le milieu synthétique de base, contenant le glycérol comme source de carbone, est meilleure avec la valine qu'avec le chlorure d'ammonium comme unique source d'azote. La synthèse d'un autre macrolide, la tylosine, est également stimulée par la valine (Omura *et al.*, 1983a ; Vancura *et al.*, 1987).

Chez *S. ambofaciens*, en phase de croissance et en présence de glycérol comme source de carbone, la valine est utilisée à la fois comme source de carbone et d'azote. Lorsque sa concentration n'est pas en excès, cet acide aminé stimule la production de spiramycine, en fournissant des acides gras à courtes chaînes (acétate et isobutyrate). Ces derniers sont des précurseurs de la biosynthèse de l'aglycone de la spiramycine. Les travaux de Reynolds *et al.* (1988) et Rezanka *et al.* (1991) décrivent la possible isomérisation de l'isobutyrate en butyrate. L'isobutyryl-CoA issu du catabolisme de la valine serait converti par la suite en butyryl-CoA, précurseur de l'aglycone et donnerait, en suivant la β -oxydation, de l'acétyl-CoA. L'isobutyrate accumulé pendant la phase de croissance est réassimilé durant la phase de production de la spiramycine. Cette excrétion d'isobutyrate n'existe pas dans le cas où l'ammonium est utilisé comme unique source d'azote.

L'utilisation de fortes concentrations de valine, mène à l'augmentation de la concentration en ions ammonium dans le milieu de culture et, parallèlement, à une faible production de spiramycine. L'introduction d'un agent chélatant les ions ammonium (le phosphate de calcium à 0,25%) dans une culture contenant un excès de valine par rapport à la source carbonée, a permis de démontrer que la faible production de spiramycine dans ce milieu de culture, était la conséquence d'une forte concentration en ions ammonium. L'agent chélatant réduit la concentration en ions ammonium excrétés et améliore la production de spiramycine. Ce phénomène a été déjà décrit par Omura *et al.* (1980a et 1980b), Masuma *et al.* (1983) et Untrau-Taghian (1993). Les expériences d'addition d'ions ammonium, sur milieu permettant initialement la production de spiramycine, ont confirmé l'action négative des ions ammonium sur la production de spiramycine. Cependant cet effet est plus ou moins prononcé selon le moment d'ajout.

Les ions ammonium exercent un maximum d'effets négatifs sur la production de spiramycine, lorsqu'ils sont introduits dans le milieu de culture entre 0 et 48 h. Additionnés après cette phase critique (96 h de culture), les ions ammonium présentent des effets négatifs moins importants sur la production de spiramycine. Vu-Trong *et* Gray (1987) ont aussi observé que chez *S. fradiae*, l'addition de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lors de la trophophase, entraînait une diminution importante de la production de tylosine en même temps qu'une stimulation de la croissance. Par contre, ajoutés lors de l'idiophase les ions ammonium n'affectent pas la production de tylosine. Il pourrait exister une phase critique (entre 0 et 48 h) durant la phase

de croissance, au cours de laquelle les ions ammonium exerceraient un maximum d'effets inhibiteurs et/ou répresseurs sur la biosynthèse de la spiramycine. Ainsi, si l'ajout de NH_4Cl est effectué pendant la phase critique, une augmentation de la vitesse de croissance pourrait dévier le flux de précurseurs de la spiramycine vers la formation de constituants cellulaires rendant ainsi ces précurseurs indisponibles pour la biosynthèse de spiramycine. Cette phase critique pourrait aussi correspondre à la phase initiale d'expression de certains gènes intervenant directement ou indirectement dans la biosynthèse de spiramycine. Ainsi, chez *S. ambofaciens* il a été démontré que les ions ammonium inhibaient et réprimaient l'activité de la valine déshydrogénase (VDH) première enzyme du catabolisme de la valine qui mène au méthylmalonyl-CoA, précurseur direct de la spiramycine (Lebrihi *et al.*, 1992). La répression et l'inhibition de cette enzyme conduiraient à une limitation de l'apport de précurseurs nécessaires à la biosynthèse de la spiramycine.

Quand la concentration de la valine est en excès par rapport à la source de carbone, la réduction sévère de la production de spiramycine s'accompagne également d'une forte accumulation d'isobutyrate. Cette chute de la production de spiramycine parallèle à une non réassimilation de l'isobutyrate est probablement due à une répression des systèmes d'assimilation de l'isobutyrate. Chez *S. ambofaciens*, il a été montré que les biosynthèses de l'acétate kinase et de la phosphoacétyl-transférase (PTA) (enzyme responsable de l'activation de l'acétate et du propionate) sont reprimées en présence d'ions ammonium (Khaoua *et al.*, 1992). Ceci pourrait rendre compte de la réduction de la production de spiramycine. La réversion de l'effet négatif des ions ammonium par ajout d'intermédiaires du catabolisme de la valine et l'isoleucine a été déjà rapportée par Lebrihi *et al.* (1992) chez *S. ambofaciens* producteur de spiramycine sur milieu synthétique de base contenant les dextrines comme source de carbone. Nous avons également observé que l'isobutyrate a un effet stimulateur sur la production de spiramycine en présence d'une limitation ou d'un excès d'ammonium. La présence de l'isobutyrate semble importante pour la biosynthèse de la spiramycine mais le moment de sa présence et sa concentration sont déterminants. En effet, il semble intéressant d'ajouter l'isobutyrate quand les ions ammonium limitent la croissance. Malgré la présence de cet activateur de la production, la spiramycine reste tributaire de l'effet ammonium. L'augmentation de la production semble cependant limitée par la quantité de glycérol indispensable pour le métabolisme énergétique de la souche et la synthèse des résidus glucidiques de la spiramycine. Des concentrations élevées d'isobutyrate retardent voire, suppriment la production de spiramycine.

PARTIE
III. 2

EFFET DES SOURCES CARBONEES
ET DES IONS PHOSPHATE SUR
LA PRODUCTION DE SPIRAMYCINE

INTRODUCTION

La biosynthèse de nombreux antibiotiques est soumise à la régulation par les sources de carbone rapidement assimilables. Bien que ce contrôle par ces sources carbonées soit décrit depuis longtemps (Johnson, 1952 ; Kennel et Demain, 1978 ; Martin et Demain, 1980), le mécanisme de base impliqué n'est pas encore bien connu et la question importante qui reste toujours posée concerne les cibles d'un tel contrôle. Par exemple, il a été montré que la formation de la désacétoxycephalosporine C synthétase ("expandase") chez *C. acremonium* et *S. lactamdurans* était sévèrement réprimée par la croissance sur le glucose, le glycérol ou le maltose (Martin, 1989). L'activité de l'expandase chez *S. clavuligerus* est inhibée par certains intermédiaires phosphorylés du métabolisme de la source carbonée (Lebrihi *et al.*, 1988). Lamsaïf (1992) a étudié une dizaine de carbohydrates tant pour leurs effets sur la croissance que sur la production de spiramycine chez *S. ambofaciens*. En présence de 50 mM d'ions ammonium et 20 g. l⁻¹ de chaque glucide, il a constaté que l'efficacité de ces sources de carbone sur la production de spiramycine est la suivante en ordre décroissant : dextrines > amidon > glucose > fructose > lactose > galactose. Le maltose ne permet pas de production. En continu ou semi-continu, la limitation en apport de sources carbonées facilement assimilables permet de limiter les phénomènes de répression et /ou d'inhibition cataboliques. Dans de telles conditions d'utilisation, il a été montré que le glucose pouvait assurer une bonne production de spiramycine (Kitao *et al.*, 1979) et que le glycérol permettait la synthèse de tylosine (Vu-Trong et Gray, 1982).

A côté de cette action inhibitrice par les sources de carbone facilement assimilables, le phosphate inorganique est aussi l'un des régulateurs les plus importants qui exerce son action sur la formation des métabolites secondaires microbiens. Les phosphates limitent généralement fortement la production des antibiotiques (Lebrihi *et al.*, 1987 ; Liras *et al.*, 1990). La synthèse d'antibiotiques macrolides dérivant de la condensation d'unités acétyl-CoA et malonyl-CoA est très sensible au contrôle par les phosphates (Martin, 1977). Elle se fait généralement à des concentrations en phosphates suboptimales pour la croissance. Alors que la croissance maximale peut être stimulée jusqu'à des valeurs élevées de phosphates, de faibles concentrations en phosphates (inférieures à 5 mM) peuvent chez certains *Streptomyces*, suffire à diminuer la production de l'antibiotique. De multiples mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet phosphate sur la production des métabolites secondaires (Martin, 1977). Ils augmentent notamment le taux d'AMP, d'ADP et d'ATP intracellulaire. Cette augmentation est corrélée à des inhibitions d'enzymes intervenant dans la formation des macrolides (Vu-Trong *et al.*, 1980).

L'interrelation entre les contrôles exercés par la source de carbone et par le phosphate laisse supposer qu'il puisse exister un médiateur intracellulaire commun (Madry *et al.*, 1979).

La régulation de la biosynthèse de la spiramycine par les sources de carbone et les ions phosphate chez *S. ambofaciens* a été très peu étudiée. L'effet sur la production de

spiramycine des ions phosphate ainsi que de différentes sources de carbone a été vérifié. L'élucidation des mécanismes impliqués dans de tels contrôles a été entreprise. Nous avons essayé d'établir une corrélation entre les régulations négatives sur la production de spiramycine des sources de carbone facilement assimilables et les ions phosphate par mesure de l'ATP intracellulaire. Certaines cibles enzymatiques des effets régulateurs négatifs de la source carbonée (voir partie III. 4) et des ions phosphate ont été mises en évidence.

RESULTATS

1. Comparaison des cinétiques de croissance et de production de spiramycine sur trois sources de carbone différentes

Nous avons étudié l'influence sur la production de spiramycine de trois sources de carbone de complexité décroissantes : les dextrines, le glucose et le glycérol.

Les dextrines ont été choisies comme source de carbone car les études effectuées au laboratoire par Lamsaïf (1992) ont montré après dosage et analyse des sucres par HPLC, que les dextrines étaient hydrolysées lentement, ce qui mène à un taux de croissance relativement peu élevé. De plus, même utilisées en excès par rapport à la source d'azote, les dextrines n'exercent que peu d'effets inhibiteurs sur la production de spiramycine (Khaoua, 1990).

Bien que les dextrines soient d'excellentes sources d'énergie et de carbone pour la production de spiramycine, elles présentent le désavantage d'être peu solubles, d'où des problèmes d'hétérogénéité de milieu ou de colmatage de la tuyauterie en cas d'alimentation de réacteur en continu ou semi-continu. Dans l'optique de telles fermentations, d'autres sources de carbone ont été testées. Notre choix s'est porté sur deux autres substrats : le glucose et le glycérol.

Le glucose rapidement assimilable permet une bonne croissance mais il limite fortement la production des métabolites secondaires (Martin et Demain, 1980 ; Malik, 1982). Cet "effet glucose" est dû à la fois au taux de croissance élevé, favorisant uniquement le métabolisme énergétique de la cellule (Vu-Trong et Gray, 1986) mais aussi à des répressions des voies de biosynthèse des antibiotiques (par exemple les carboxylases, selon Vu-Trong *et al.*, 1980). La production est cependant possible dans des conditions de limitation. La tylosine est synthétisée en réacteur continu avec des taux de dilutions faibles sur un milieu de culture contenant le glucose comme source de carbone (Vu-Trong et Gray, 1982) et en semi-continu (Vu-Trong et Gray, 1984).

Le glycérol a été choisi pour diverses raisons. Il stimule la production de certains antibiotiques comme la puromycine (Sankaran et Pogell, 1975) ou l'acide clavulanique (Roméro *et al.*, 1986). En revanche, les macrolides comme la tylosine peuvent être synthétisés à partir du glycérol mais uniquement dans des conditions de limitation de la source carbonée (Gray et Bhuwapathanapun, 1980).

Dans le cas de la synthèse de la spiramycine, les milieux industriels contiennent des huiles de maïs formées de di- et triglycérides qui sont utilisées comme fournisseurs d'acides gras, précurseurs de l'antibiotique. L'hydrolyse de ces huiles conduit au glycérol. Il était donc intéressant d'étudier le rôle du glycérol dans la croissance et la production du macrolide. De plus ce substrat semble devoir être très abondant sur le marché, après hydrolyse des huiles de colza pour la production de "diester". Toute forme de valorisation de ce "sous-produit" semble potentiellement intéressante.

Différentes cultures de *S. ambofaciens* sur le milieu synthétique de base avec les dextrines, le glucose ou le glycérol (30 g. l⁻¹) comme unique source de carbone et la valine (50 mM) comme seule source d'azote ont été réalisées. Les cinétiques de croissance, de consommation des différentes sources carbonées et de production de spiramycine sont représentées sur la Fig. III. 2. 1.

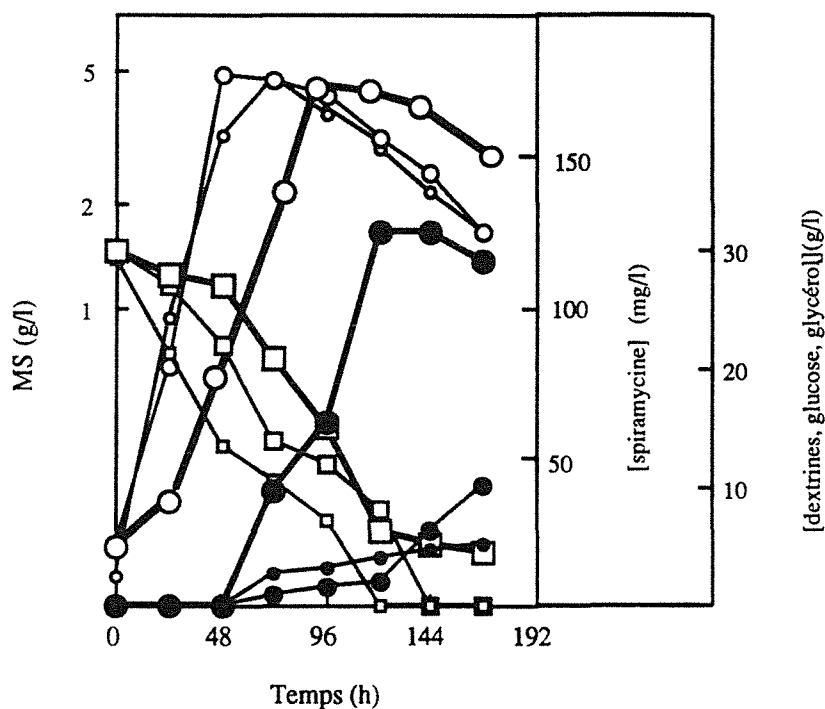


Fig. III. 2. 1. : Effet de la nature de la source carbonée sur les cinétiques de croissance et de production de spiramycine.

Cinétiques de croissance (O, o, o), de consommation des dextrines (□), du glucose (□) et du glycérol (□) et de production de spiramycine (●, ●, ●) sur milieu synthétique de base contenant 30 g. l⁻¹ de dextrines (grands symboles) ou de glucose (symboles moyens) ou de glycérol (petits symboles) comme unique source de carbone et la valine 50 mM comme seule source d'azote.

Les taux de croissance, les quotients métaboliques de consommation des sources de carbone et de production de spiramycine de même que les rendements globaux en spiramycine sont comparés dans le tableau III. 2. 1. La croissance de *S. ambofaciens* est plus rapide sur le glycérol ($\mu_{\max} = 0,085 \text{ h}^{-1}$) et le glucose ($\mu_{\max} = 0,075 \text{ h}^{-1}$) que sur dextrines ($\mu_{\max} = 0,04 \text{ h}^{-1}$). La biomasse finale obtenue avec les trois sources carbonées est approximativement similaire (5 g. l⁻¹). Le glycérol et le glucose ont été consommés à des vitesses spécifiques élevées respectives de 0,35 g. h⁻¹. g⁻¹ MS (q_{gly}) et 0,25 g. h⁻¹. g⁻¹ MS (q_{glc}) par rapport aux dextrines ($q_{\text{dex}} = 0,2 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). La production de spiramycine est meilleure sur dextrines. Dans tous les cas, la production de spiramycine a commencé à 72 h de fermentation et a continué avec des vitesses spécifiques maximales de production (q_{spira}) de 0,4, 0,2 et 0,05 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS respectivement sur dextrines, glucose et glycérol. Avec le glycérol le rendement global en spiramycine (Y_{spira}) est plus faible et approximativement 80% inférieur à celui obtenu sur dextrines.

Source de carbone	dextrines	glucose	glycérol
(30 g. l ⁻¹)			
MS _{max} (g. l ⁻¹)	5,0	4,9	4,8
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,04	0,075	0,085
$q_{\text{source carbonée}}$ (g. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0,2	0,25	0,35
Y_{spira} (mg. g ⁻¹ MS)	25	8	4
q_{spira} (mg. h ⁻¹ . g ⁻¹ MS)	0,4	0,2	0,05

Tableau III. 2. 1 : Effet de la source de carbone sur la croissance et la production de spiramycine

sur milieu synthétique de base contenant de la valine à 50 mM comme unique source d'azote et les dextrines ou le glucose ou le glycérol à 30 g. l⁻¹ comme seule source de carbone.

2. Effet de concentrations croissantes de glycérol ou de glucose sur la croissance et la production de spiramycine

Afin de préciser si l'action du glycérol et du glucose sur la production de la spiramycine est dépendante de leurs concentrations et du moment d'ajout dans le milieu de culture, les expériences suivantes ont été conduites sur le milieu synthétique de base décrit dans le chapitre "Matériels et méthodes".

2. 1. Effet de la concentration initiale du glycérol ou du glucose sur la croissance et la production de spiramycine

Plusieurs fermentations avec la valine à 50 mM comme source d'azote et des concentrations croissantes de glycérol (5, 10, 20, 30, 40, 50 et 100 g. l⁻¹) ou de glucose (5, 20, 30, 40, 50, 100 g. l⁻¹) comme unique source de carbone ont été menées sur le milieu synthétique de base. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III. 2. 2.

Concentration de la source de carbone (g. l ⁻¹)	MS_{max} (g. l ⁻¹)		pH_{min}		Y_{spira} (mg. g ⁻¹ MS)	
	<i>gly</i>	<i>glc</i>	<i>gly</i>	<i>glc</i>	<i>gly</i>	<i>glc</i>
5	3,20	1,65	7,70	7,90	8,50	7,00
10	3,50	nd	7,25	nd	12,5	nd
20	4,40	3,65	5	7	13	13,70
30	4,80	4,90	5	6,70	0	10,80
40	4,50	5,40	5	6,60	0	7,40
50	4,60	3,75	5	5,30	0	3,75
100	4,45	3,70	5	6,70	0	3,70

Tableau III. 2. 2 : Influence de la concentration initiale de glycérol ou de glucose sur la croissance et la production de spiramycine

sur milieu synthétique de base contenant de la valine à 50 mM comme source d'azote.

gly : glycérol
glc : glucose
nd : non déterminé

L'augmentation de la concentration du glucose jusqu'à 40 g. l⁻¹ ou le glycérol jusqu'à 30 g. l⁻¹ entraîne une augmentation dans la production de biomasse. Au delà de ces concentrations, la biomasse n'augmente plus, indiquant que le glucose ou le glycérol ne sont plus les facteurs limitants pour la croissance. La vitesse spécifique de croissance augmente avec la concentration de la source carbonée (Fig. III. 2. 2a et III. 2. 2b). L'augmentation du glycérol jusqu'à 20 g. l⁻¹ ou du glucose jusqu'à 100 g. l⁻¹ accroît les vitesses de croissance respectivement de 35 et 45%. La vitesse spécifique de croissance semble être contrôlée par la concentration de la source carbonée.

En présence du glucose, la vitesse spécifique de production de spiramycine ($q_{\text{spira}} = 0,3 \text{ mg. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) ainsi que le rendement en spiramycine ($Y_{\text{spira}} = 13,7 \text{ mg.g}^{-1}$) sont maximum à 20 g. l⁻¹ de glucose initial. Au dessous et au dessus de cette concentration, la production décroît rapidement. Quand la concentration du glucose initiale augmente de 20 à 100 g. l⁻¹, la vitesse spécifique de production de spiramycine chute ($q_{\text{spira}} = 0,05 \text{ mg. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) et le rendement décroît d'environ 73% (Fig. III. 2. 2b).

Avec le glycérol comme source de carbone, le rendement global en spiramycine (13 mg. g⁻¹ MS) et la vitesse spécifique de production de spiramycine (0,3 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS) sont maximum à 10 g. l⁻¹ de glycérol initial. L'augmentation de la concentration initiale de glycérol de 5 à 30 g. l⁻¹ supprime complètement la biosynthèse de la spiramycine (Fig. III. 2. 2a).

Afin de s'assurer que cet effet n'est pas le résultat d'une diminution dans le pH et d'une limitation d'oxygène, une fermentation sur un milieu contenant 30 g. l⁻¹ de glycérol et 50 mM de valine a été réalisée dans un fermenteur (2 l) en maintenant le pH à 7 et l'oxygénation à 25% de saturation. La production a été restaurée mais le rendement reste très faible. Il est de 3,8 mg. g⁻¹ MS (resultats non représentés).

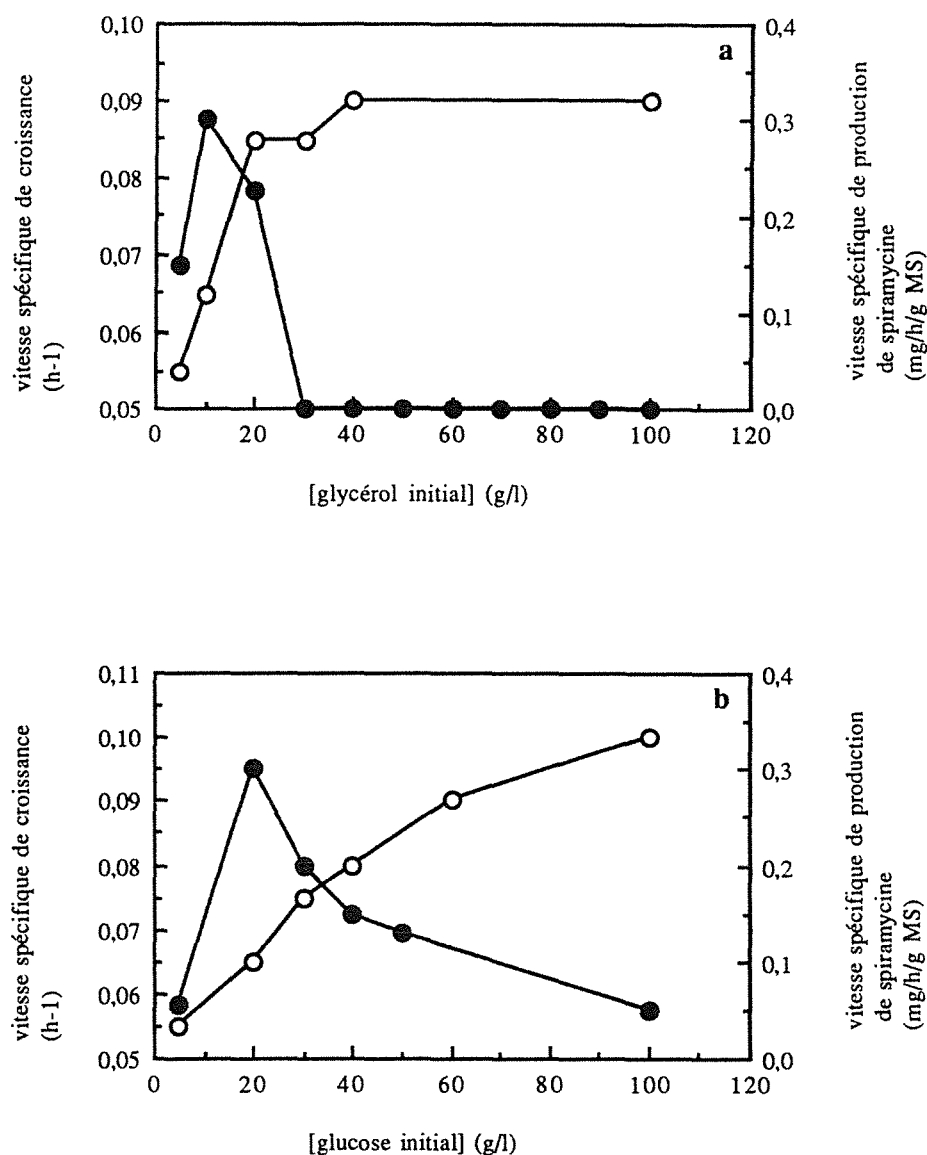


Fig. III. 2. 2 : Effet de l'augmentation de la concentration initiale du glycérol (a) ou du glucose (b) sur la croissance et la production de spiramycine.

Vitesse spécifique de croissance (O) et vitesse spécifique de production de spiramycine (●) sur milieu synthétique de base contenant de la valine à 50 mM comme source d'azote et différentes concentrations initiales de glycérol (a) ou de glucose (b).

2. 2. Effet de l'addition de différentes concentrations de glycérol et de glucose en fin de phase exponentielle de croissance, sur la croissance et la production de spiramycine

Nous constatons d'après l'expérience précédente que lorsque la concentration en glycérol ou en glucose est augmentée, la vitesse de croissance augmente alors que la production en spiramycine diminue (Fig. III. 2. 2a et III. 2. 2b). Pour vérifier si l'effet négatif exercé par la source carbonée sur la production de spiramycine dépend de la concentration de la source carbonée et n'est pas seulement la conséquence d'une augmentation de la vitesse de croissance, des ajouts de différentes concentrations de glycérol et de glucose (5, 10, 20, 30, 40 et 60 g. l⁻¹), à la fin de la phase exponentielle (à 56 h) sont effectués sur le milieu synthétique de base. Ce milieu contient des dextrines et de la valine respectivement comme sources de carbone et d'azote. Afin de limiter la biomasse finale pour éviter d'éventuels problèmes de mauvaise oxygénation quand la biomasse devient importante, les dextrines ont été utilisées à 15 g. l⁻¹ et la valine à 25 mM.

L'addition du glycérol ou du glucose n'augmente ni la vitesse spécifique de croissance maximale ni la biomasse maximale. Dans ces conditions ce n'est pas la source de carbone qui constitue le facteur limitant de la croissance mais probablement la valine. Cependant, la biomasse est maintenue à un niveau élevé d'environ 4,5 g. l⁻¹. Le pH ne varie pas significativement (Fig. III. 2. 3a et III. 2. 3b).

L'addition du glucose ou du glycérol jusqu'à 20 g. l⁻¹ réduit les rendements en spiramycine respectivement de 50 et 55% et les vitesses spécifiques de production de spiramycine de 80%. Cette chute demeure constante quand la concentration de glycérol ajoutée passe de 20 à 60 g. l⁻¹. Le rendement en spiramycine décroît plus sévèrement avec l'augmentation de la concentration du glucose : réduction de 75% pour des concentrations ajoutées en glucose de 20 à 60 g. l⁻¹ par comparaison avec le témoin sans ajout de glucose. La chute de q_{spira} demeure de 70% par rapport au témoin, pour des concentrations supérieures à 20 g. l⁻¹.

Ces résultats montrent que l'effet négatif des deux sources carbonées (glycérol et glucose) sur la biosynthèse de la spiramycine est toujours observé bien que nous ayons éliminé l'interférence de leur effet sur le taux de croissance. Ajoutées en fin de phase de croissance, ces sources carbonées facilement assimilables semblent manifester leur effet négatif sur la production de spiramycine autrement que par l'augmentation du taux de croissance.

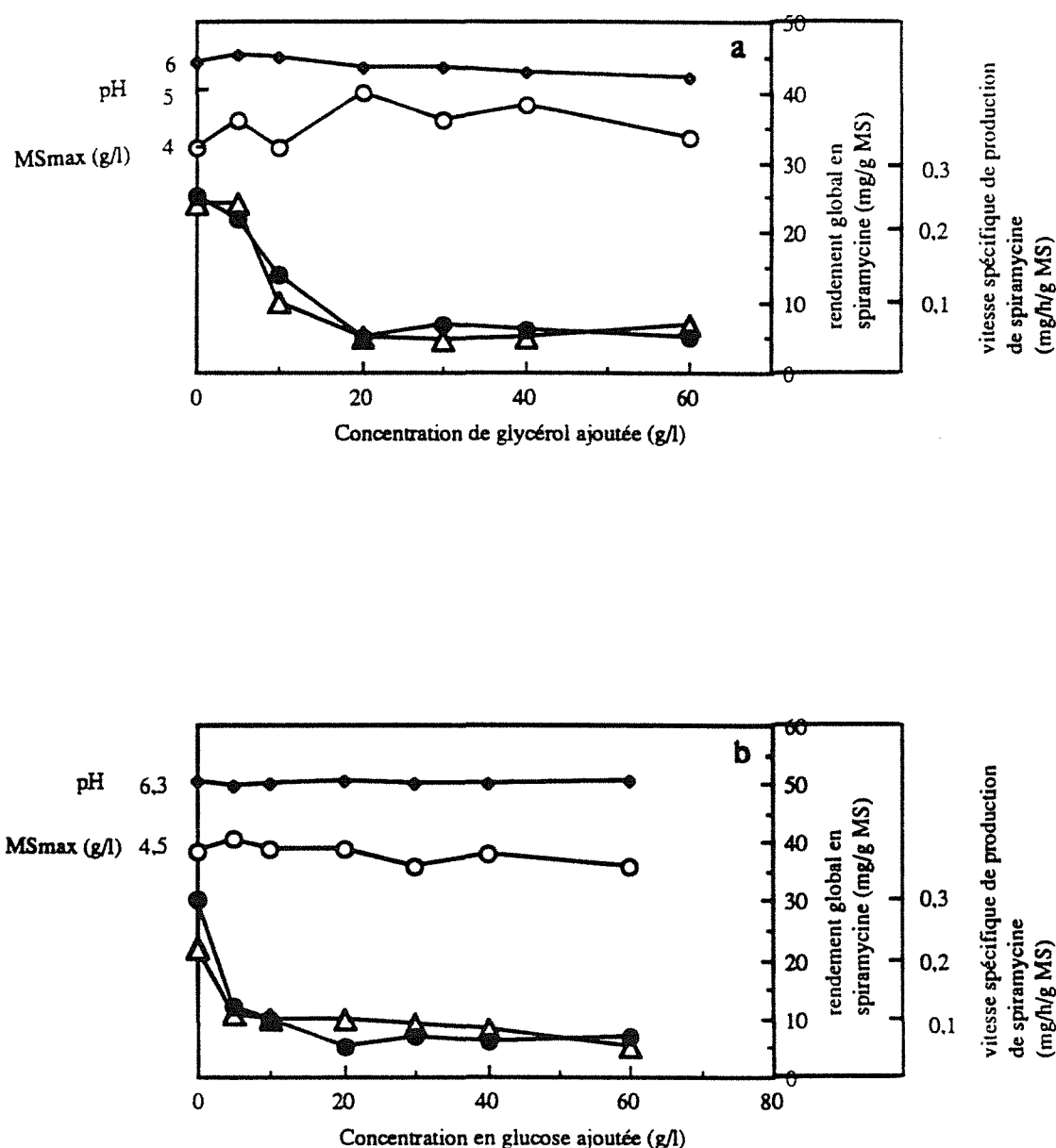


Fig. III. 2. 3 : Effet de l'addition de différentes concentrations de glycérol (a) ou de glucose (b) en fin de phase exponentielle de croissance (56 h), sur la croissance et la production de spiramycine.

Biomasse maximale (○), pH (◇), rendement global en spiramycine (△), vitesse spécifique de production de spiramycine (●) sur milieu synthétique de base, contenant de la valine à 25 mM comme source d' azote et les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone initiale, et additionné de différentes concentrations de glycérol (a) ou de glucose (b) à 56 h.

3. Détermination de la nature de l'effet de la source carbonée

3.1. Effet du temps d'addition du glycérol ou du glucose sur la production de spiramycine

Afin de déterminer le moment critique où l'ajout du glycérol ou du glucose exerce un effet négatif sur la biosynthèse de la spiramycine, plusieurs fermentations comparatives ont été menées sur le milieu synthétique de base contenant initialement la valine à 25 mM et les dextrines à 15 g. l⁻¹. A chacune de ces fermentations, 60 g. l⁻¹ de glycérol ou de glucose ont été ajoutés à différents temps de culture. Les évolutions de la biomasse maximale et du pH minimum sont résumées dans le tableau III. 2. 3.

<i>Temps d'addition de la source carbonée (h)</i>	<i>MS_{max}</i>		<i>pH_{min}</i>	
	<i>(g. l⁻¹)</i>		<i>gly</i>	<i>glc</i>
	<i>gly</i>	<i>glc</i>	<i>gly</i>	<i>glc</i>
0	5,30	4,50	6,15	6,44
24	5,10	4,20	6,05	6,20
48	4,60	4,50	6,20	6,20
56	4,65	4,50	6,34	6,14
72	3,80	4,50	6,2	6,40
96	4,15	4,40	6,25	6,40
<i>Témoin</i>	4,20		6,35	

Tableau III. 2. 3 : Effet du temps d'ajout de 60 g. l⁻¹ de glycérol ou de glucose sur la croissance et la production de spiramycine

sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone initiale et la valine à 25 mM comme unique source d'azote.

L'analyse globale des résultats montre que l'effet négatif exercé par le glycérol sur la biosynthèse de la spiramycine est plus prononcé que celui du glucose. D'une façon générale, lorsque le glucose ou le glycérol (à 60 g. l⁻¹) sont ajoutés à 72 ou 96 h, ils font chuter les vitesses spécifiques de production et les rendements globaux en spiramycine d'une valeur moyenne de 50%. Quel que soit le moment d'addition du glucose on observe les mêmes réductions des vitesses spécifiques de production de spiramycine, sauf à 0 h où q_{spira} reste égal à celui du témoin (0,3 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS). Quant aux rendements globaux, la chute est toujours d'environ 54% avec un maximum de chute de l'ordre de 70% à 72 h (Fig. III. 2. 4).

En revanche, l'ajout du glycérol avant 72 h fait chuter les vitesses spécifiques de production de spiramycine d'une valeur moyenne de 75% avec une chute maximale à 56 h (85%).

D'une façon générale, nos résultats montrent que l'effet négatif (inhibition et /ou répression) de ces deux substrats carbonés facilement assimilables exercé sur la biosynthèse de la spiramycine, bien que se manifestant quel que soit le moment d'ajout, est plus important quand l'addition est effectuée avant le début de la production de spiramycine. Il existe donc une phase critique pendant laquelle le glycérol en particulier et le glucose exercent leur effet négatif sur la mise en place de la biosynthèse de la spiramycine.

Vu l'intensité de l'effet négatif du glycérol sur la production de la spiramycine et l'intérêt porté à ce substrat pour des raisons déjà explicitées par ailleurs, nous avons voulu préciser la nature de cet effet régulateur négatif.

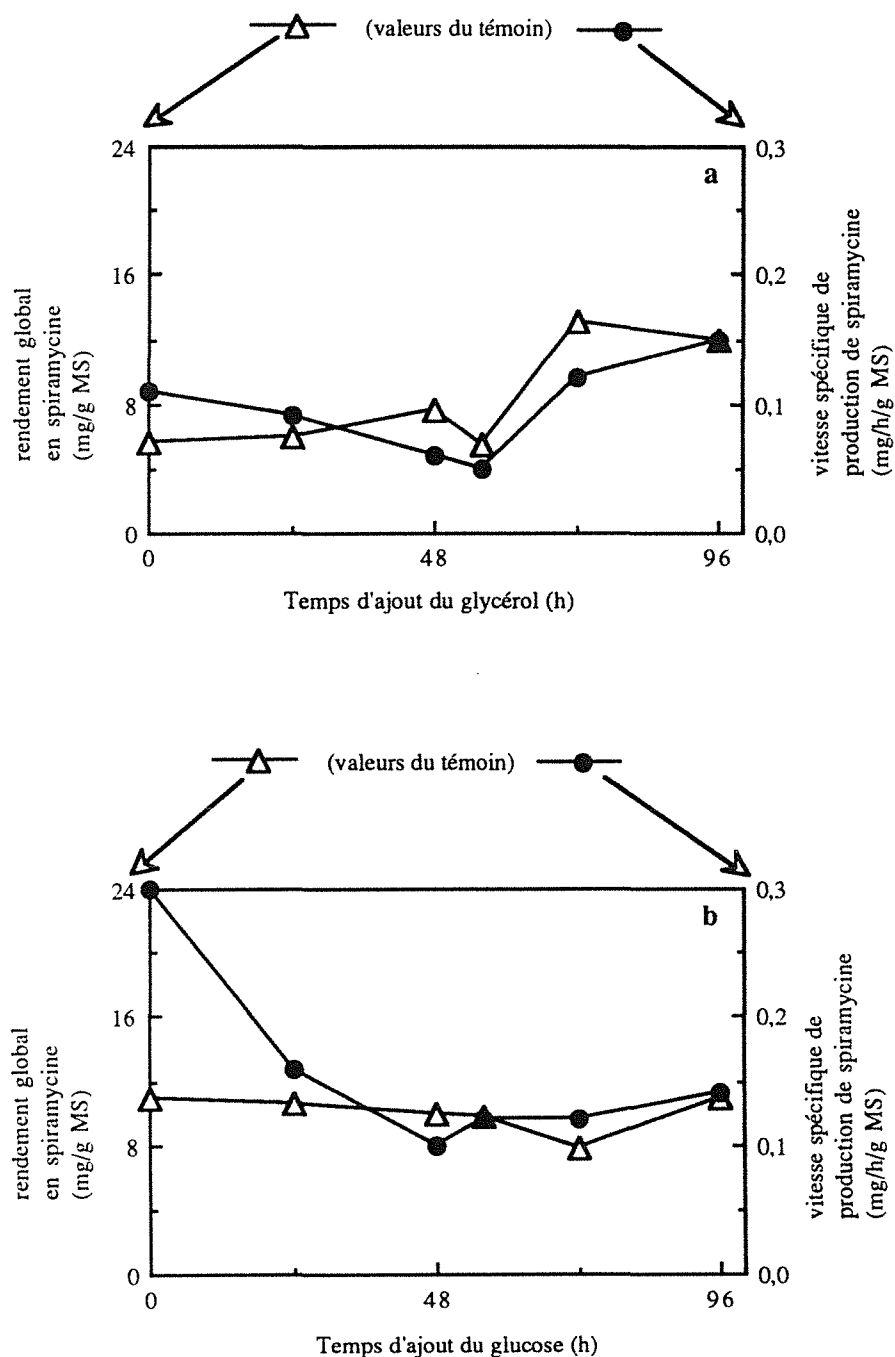


Fig. III. 2. 4 : Effet du temps d'ajout de 60 g. l⁻¹ de glycérol (a) ou de glucose (b) sur la production de spiramycine.

Rendement global en spiramycine (Δ) et vitesse spécifique de production de spiramycine (●) sur milieu synthétique de base, contenant de la valine à 25 mM comme source d'azote et des dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source carbonée initiale, et additionné de 60 g. l⁻¹ de glycérol (a) ou de glucose (b) à différents temps de culture.

3. 2. Comparaison de l'effet du temps d'ajout du glycérol et de la streptomycine sur la production de la spiramycine

Le fait que le glycérol exerce un effet négatif très prononcé avant le début de la production de la spiramycine pourrait être dû à un effet inhibiteur et/ou répresseur. La présence d'un excès de glycérol avant le début de la production (période de synthèse des enzymes nécessaires à la biosynthèse de la spiramycine) pourrait conduire à la répression de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la spiramycine. Quand il est présent après la mise en place des systèmes enzymatiques responsables de la biosynthèse de la spiramycine, seul son effet inhibiteur pourrait persister.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons cherché à localiser la phase de la synthèse des enzymes responsables de la biosynthèse de la spiramycine. L'effet, sur la production de la spiramycine, de l'addition de la streptomycine (un inhibiteur de la synthèse protéique) à différents temps d'incubation a été étudié. Ces fermentations ont été réalisées sur le milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ et la valine à 25 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote. Les résultats obtenus résumés dans le tableau III. 2. 4, indiquent que l'addition de 100 mg. l⁻¹ de streptomycine aux cultures avant le début de la biosynthèse de l'antibiotique (à 48 h) supprime la production de spiramycine. L'addition de streptomycine au début de la production (à 72 h) exerce un effet inhibiteur prononcé mais pas total (réduction de 77% du rendement global en spiramycine), alors que l'addition de la streptomycine après le début de la production (à 96 ou 120 h) n'a aucun effet sur la production de spiramycine (le rendement global en spiramycine est sensiblement identique au témoin). L'addition du glycérol à 60 g. l⁻¹, dans les mêmes conditions que la streptomycine, avant ou en début de production, semble exercer approximativement le même effet que celle-ci sur la production de la spiramycine. En revanche l'ajout du glycérol après le début de la production manifeste un effet négatif (44% de réduction) .

L'inhibition de la synthèse protéique par ajout de streptomycine à 48 h et à 72 h conduit à une production faible en spiramycine voire même nulle. Le même effet est observé avec le glycérol, ce qui pourrait traduire une répression de la synthèse des enzymes responsables de la biosynthèse de la spiramycine par le glycérol ou l'un de ces catabolites, sans exclure une inhibition.

A 96 h tout le matériel enzymatique indispensable à la production de la spiramycine semble présent dans la cellule, il est mis en place en fin de phase exponentielle de croissance. Malgré la présence de cet équipement, le glycérol exerce toujours une action négative, ce qui indique et confirme l'effet inhibiteur du glycérol sur les enzymes de la biosynthèse de la spiramycine.

Temps d'addition de la streptomycine ou du glycérol	Rendement global en spiramycine (mg. g ⁻¹ MS)	
	<i>streptomycine</i> (100 mg. l ⁻¹)	<i>glycérol</i> (60 g. l ⁻¹)
Avant le début de la production 48 h	0	3
Au début de la production 72 h	5,75	8
Après le début de la production 96 h 120 h	26 23,75	14
Témoin	25	

Tableau III. 2. 4: Effet de l'addition de streptomycine à 100 mg . l⁻¹ ou de glycérol à 60 g. l⁻¹ à différents temps d'incubation, sur la production de spiramycine.

sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 30 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 50 mM comme source d'azote .

Afin de préciser les résultats précédents, nous avons eu recours aux systèmes des cellules non proliférantes (CNP).

Des cultures de *S. ambofaciens* sont menées sur un milieu favorisant la production de la spiramycine (milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et de la valine à 50 mM). Des cellules sont prélevées à partir de ce milieu à différents temps d'incubation : à 48 h, avant le début de la production de spiramycine ; à 72 h, au début de la production ; à 96 h, après le début de la production. Elles sont resuspendues dans le milieu synthétique de base sans azote, sans streptomycine (MSA) ou avec addition de streptomycine à 100 mg. l⁻¹ (MSAS), avec glycérol à 60 g. l⁻¹ (MSAG) ou avec glycérol à 60 g. l⁻¹ plus streptomycine à 100 mg. l⁻¹ (MSAGS). Le tableau III. 2. 5 récapitule les résultats obtenus à partir de ces différentes expériences.

Dans les systèmes MSA et MSAS, la production de spiramycine a lieu avec des cellules prélevées à 48 et 72 h avec des rendements non significativement différents selon le temps du prélèvement. Les cellules récoltées à 96 h ne sont pas productives. Ces résultats indiquent la présence des systèmes enzymatiques nécessaires à la biosynthèse de la spiramycine, mis en place avant 48 h. Ces systèmes enzymatiques ne sont plus fonctionnels après 96 h de culture (phase de lyse cellulaire et de protéolyse). Les cellules non proliférantes prélevées à 48 et 72 h produisent plus de spiramycine en présence de streptomycine qu'en son absence (augmentation de 75 et 50% des rendements à 48 et 72 h). L'effet stimulant de la streptomycine sur cette synthèse semble significatif, mais d'interprétation délicate. S'agit-il d'une réorientation des métabolites vers la production de spiramycine au lieu de la production des protéines ?

Dans les systèmes contenant du glycérol, quel que soit l'âge des cellules utilisées (48 ou 72 h), l'addition du glycérol en présence ou en absence de streptomycine supprime la production de spiramycine. Contrairement à son effet observé dans d'autres systèmes, nos expériences démontrent que le glycérol agit comme inhibiteur de produits de gènes déjà exprimés (enzymes du métabolisme secondaire). Wei-Shou *et al.* (1984) ont décrit des systèmes de cellules non proliférantes chez *S. clavuligerus* où l'ajout simultané de glycérol et d'un inhibiteur de la synthèse protéique permet la production de céphalosporine alors que cette biosynthèse n'a pas lieu en présence de glycérol seul. Ces résultats suggéraient que le glycérol agirait en assurant la synthèse d'une protéine désactivant une ou plusieurs enzymes intervenant dans la biosynthèse de la céphalosporine.

Conditions des systèmes CNP	Age de la culture		
	48 h	72 h	96 h
	Rendement global en spiramycine (mg. g ⁻¹ MS)		
MSA	10	9,5	0
MSAS	17,5	14,5	0
MSAG	0	0	0
MSAGS	0	0	0

Tableau III. 2. 5 : Effet de l'addition de streptomycine ou de glycérol sur la production de spiramycine en utilisant les systèmes CNP.

CNP : cellules non proliférantes

MSA : Milieu synthétique de base Sans Azote et contenant des dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone

MSAS : Milieu synthétique de base Sans Azote contenant des dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone avec addition de Streptomycine à 100 mg. l⁻¹.

MSAG : Milieu synthétique de base Sans Azote contenant des dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone avec addition de Glycérol à 60 g. l⁻¹.

MSAGS : Milieu synthétique de base Sans Azote contenant des dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone avec addition simultanée de Streptomycine à 100 mg. l⁻¹ et de Glycérol à 60 g. l⁻¹.

4. Effet du glucose et de ses analogues (le 2-désoxy-D-glucose et le 3-O-méthyl -D-glucose) sur la production de la spiramycine

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme par lequel les sources carbonées rapidement assimilables telles que le glucose exercent leur effet négatif sur la biosynthèse de la spiramycine, nous avons comparé sur des cellules en état de produire de la spiramycine l'effet du glucose et de deux de ses analogues : le 2-désoxy-D-glucose et le 3-O-méthyl-D-glucose. Le 2-désoxy-D-glucose est transporté à l'intérieur de la cellule, phosphorylé en 2-désoxy -D-glucose-6-phosphate non catabolisé par la plupart des bactéries. Le 3-O-méthyl -D-glucose est transportable mais non phosphorylable (Dietz et Heppel, 1971 ; Weber, 1973). Le glucose et chacun de ces analogues, à une concentration de 30 g. l⁻¹, ont été ajoutés à des cultures de *S. ambofaciens* de 56 h qui étaient en croissance sur le milieu synthétique de base permettant la production de spiramycine (dextrines 15 g. l⁻¹ et valine 25 mM). Au moment de cet ajout la phase de croissance est terminée et les systèmes permettant la production des métabolites secondaires sont en place. Le tableau III. 2. 6 et les Fig. III. 2. 5a et III. 2. 5b résument les résultats obtenus.

<i>Additions</i>	<i>Rendement global en spiramycine (mg. g⁻¹MS)</i>	<i>Remarques</i>
<i>glucose</i>	16	Inhibition partielle par rapport au témoin
<i>3-O-méthyl-glucose</i>	26	Rendement égal au témoin
<i>2-désoxy-glucose</i>	0	Inhibition totale de la production
<i>Témoin</i>	25	

Tableau III. 2. 6 : Récapitulation des effets du glucose et de ses analogues (le 2-désoxy-D-glucose et le 3-O- méthyl -D- glucose), ajoutés à 30 g. l⁻¹ et à 56 h , sur la production de spiramycine.

sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 25 mM comme source d'azote.

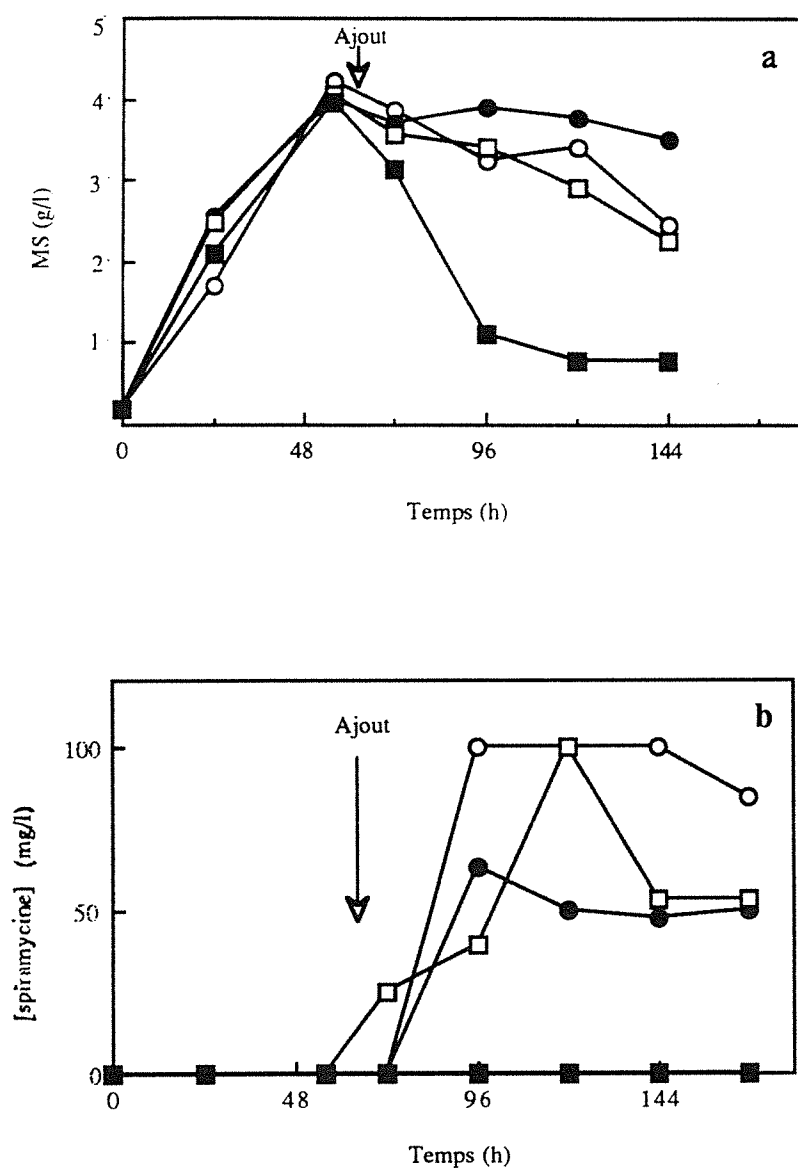


Fig. III. 2. 5 : Effet de l'ajout du glucose et de ses analogues (le 2-désoxy-D-glucose et le 3-O-méthyl-D-glucose), à 56 h, sur la croissance (a) et la production de spiramycine (b). Témoin (sans ajout) (O), avec ajout de glucose (●), avec ajout du 2-désoxy-D-glucose (■), avec ajout du 3-O-méthyl-D-glucose (□) sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 25 mM comme source d'azote.

L'addition de glucose et de 3-O-méthyl-D-glucose ne modifie pas significativement la densité microbienne alors que le 2-désoxy-D-glucose entraîne une chute rapide de la biomasse. Par rapport au témoin, l'addition du glucose provoque une diminution de la production de spiramycine d'environ 50 %. Le 2-désoxy glucose empêche totalement la production de spiramycine alors que le 3-O-méthyl-glucose ne modifie pas significativement cette production.

Ces résultats semblent indiquer que la phosphorylation du sucre est nécessaire pour cette action inhibitrice.

5. Effet des ions phosphate sur les productions de biomasse et de spiramycine

5. 1. Effet des différentes concentrations initiales des ions phosphate sur les productions de biomasse et de spiramycine

A partir des considérations précédentes, nous avons voulu vérifier l'influence des ions phosphate sur la production de spiramycine.

Nous avons réalisé plusieurs fermentations sur le milieu synthétique de base avec différentes concentrations de phosphate en présence de valine 25 mM et de glycérol 5 g. l⁻¹. La Fig. III. 2. 6 indique qu'en deça de 5 mM la concentration initiale en phosphate limite la production de biomasse. La concentration en phosphate résiduel, nulle jusqu'à 10 mM de phosphate initial, croît avec l'augmentation de la concentration en phosphate initial. Le rendement global en spiramycine chute rapidement quand la concentration en phosphate excède 10 mM. Dans le cas d'un milieu dépourvu de phosphate, la croissance est très lente et le début de la production est précoce (48 h au lieu de 72 h). Les vitesses de consommation du glycérol sont presque identiques quelle que soit la concentration en phosphate. L'excrétion d'ions ammonium est d'autant plus faible que les concentrations en phosphate sont élevées (résultats non montrés). Ceci pourrait s'interpréter par une protéolyse plus active en absence de phosphate.

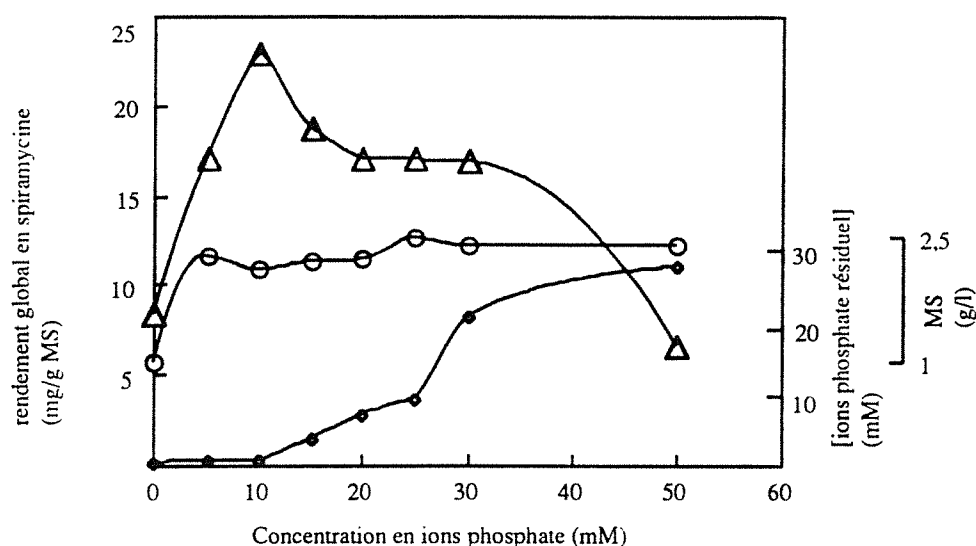


Fig. III. 2. 6 : *Effet de différentes concentrations initiales en ions phosphate sur la croissance et la production de spiramycine.*

Biomasse maximale (○), concentration résiduelle en ions phosphate (◇), rendement global en spiramycine (Δ) sur milieu synthétique de base contenant la valine à 25 mM comme source d'azote et le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone.

5. 2. Effet du temps d'ajout du phosphate sur la production de spiramycine

Des ajouts d'une concentration inhibitrice de phosphate (50 mM) à différents stades de la croissance (0, 12, 36, 48, 56, 72, 84, et 96 h) ont été effectués sur le milieu synthétique de base avec le glycérol à 5 g. l⁻¹ et la valine à 25 mM. Les résultats obtenus sont représentés sur la Fig. III. 2. 7.

Les ajouts lors de la phase de croissance (jusqu'à 48 h, avant le début de la production) réduisent la production de spiramycine de 60%. Par contre les additions après le début de la production ne font chuter la production que de 20%.

La production de spiramycine est d'autant plus sensible à l'effet de concentrations élevées d'ions phosphate que ceux-ci sont apportés lors de la croissance.

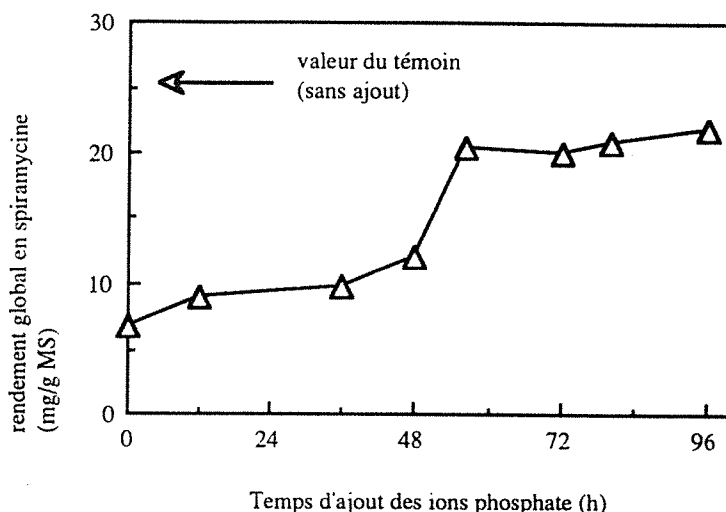


Fig. III. 2. 7 : Effet du temps d'ajout de 50 mM d'ions phosphate sur la production de la spiramycine.

(Δ) : rendement global en spiramycine sur milieu synthétique de base, contenant de la valine à 25 mM comme source d'azote et le glycérol à 5 g. l⁻¹ comme source de carbone, et additionné de 50 mM d'ions phosphate à différents temps d'incubation.

6. Effet de la source énergétique et des ions phosphate sur la concentration intracellulaire d'ATP et la production de spiramycine

6. 1. Comparaison de la concentration d'ATP dans des cultures avec les dextrines ou le glycérol comme source de carbone

Par la méthode de bioluminescence la concentration en ATP intracellulaire a été suivie sur des cultures en croissance sur le milieu synthétique de base avec les dextrines (30 g. l⁻¹) ou le glycérol (10 g. l⁻¹) comme source de carbone et la valine 50 mM comme unique source d'azote (Fig. III. 2. 8a et III. 2. 8b). Avec les dextrines comme source d'énergie, les cellules produisent 60% moins d'ATP (mesuré au moment de la production, soit à 72 h) que dans le cas d'une source facilement assimilable. Un ajout de glycérol (60 g. l⁻¹), sur milieu de base avec dextrines (30 g. l⁻¹) comme source de carbone et valine 50 mM comme source d'azote, supprime la production de spiramycine et provoque une forte élévation de la concentration intracellulaire d'ATP (2 fois) (Fig. III. 2. 8c).

6. 2. Comparaison de la concentration d'ATP dans les cultures à faible et à forte concentration en phosphate

Nous avons suivi la production d'ATP intracellulaire par *S. ambofaciens* au cours de sa croissance sur milieu synthétique de base contenant du glycérol (10 g. l⁻¹), de la valine (50 mM) et des phosphates à 14 mM ou 100 mM.

La production de spiramycine a été décelée uniquement avec 14 mM de phosphate. Dans ce dernier cas la production d'ATP augmente linéairement avec la croissance jusqu'à la fin de la phase exponentielle où on observe un maximum puis une chute durant la phase de production (Fig. III. 2. 8b). Par contre dans le cas d'une forte concentration en phosphate, la teneur en ATP des cellules est maintenue à un niveau élevé tout le long de la fermentation (Fig. III. 2. 8d). En phase de production (120 h par exemple), la teneur en ATP des cellules de la culture à faible concentration en phosphate est 40% plus faible que dans les cellules issues d'une culture à concentration élevée.

L'ensemble de ces résultats montrent une corrélation entre une moindre production en spiramycine (voire nulle) et une teneur élevée en ATP, teneur liée à une source d'énergie rapidement utilisable ou une teneur élevée en phosphates. Ces résultats ne permettent cependant pas de préjuger d'éventuel(s) effecteur(s) intracellulaire(s) commun(s) à ces deux effets.

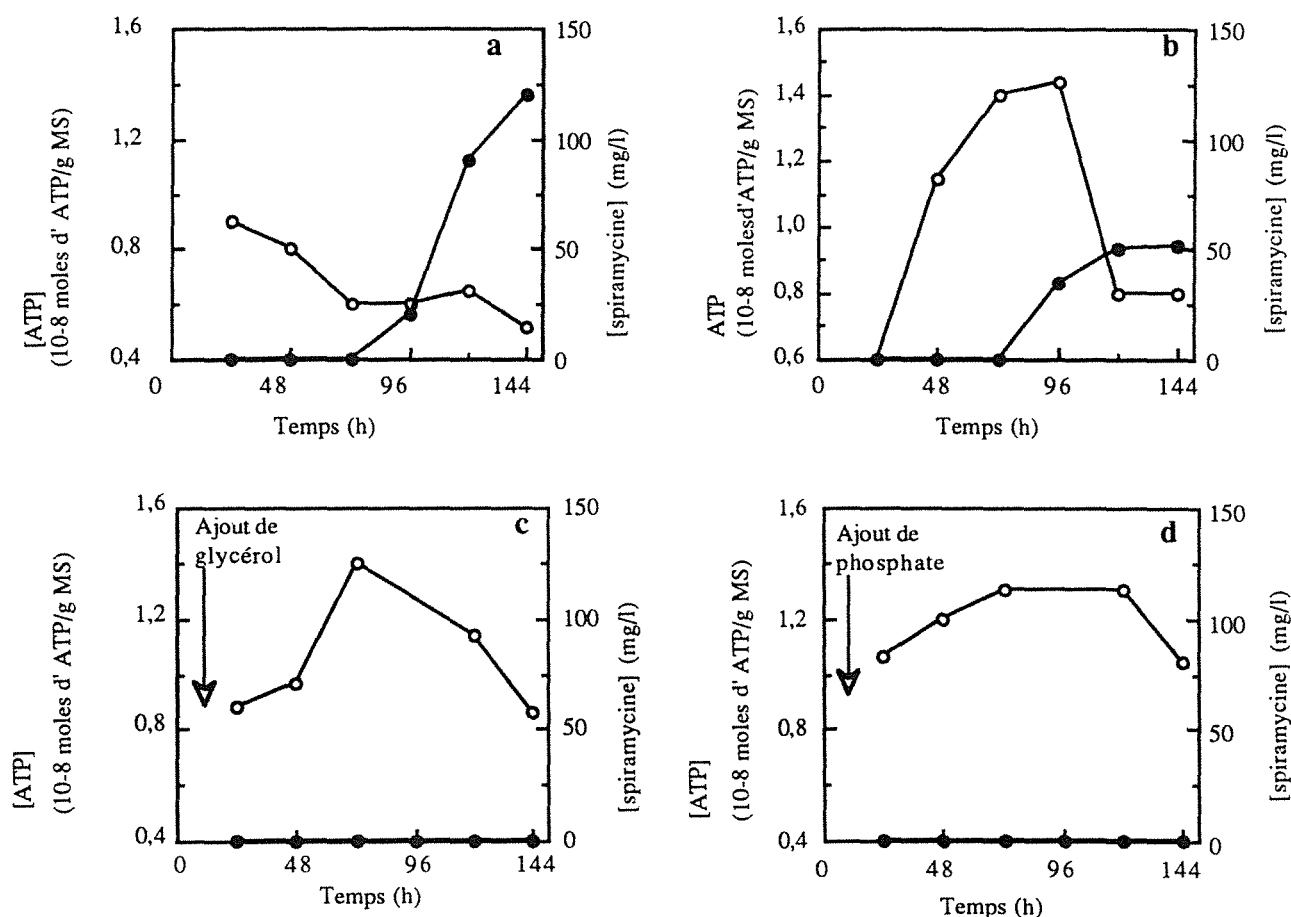


Fig. III. 2. 8 : Effet de la source énergétique et des ions phosphate sur la concentration intracellulaire en ATP (o) et la production de spiramycine (●)

a : sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone, la valine à 25 mM comme source d'azote et en présence de 14 mM d'ions phosphate.

b : sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 50 mM comme source d'azote et en présence de 14 mM d'ions phosphate.

c : sur milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ comme source de carbone initiale, la valine à 25 mM comme source d'azote, les ions phosphate à 14 mM et additionné à 12 h d'incubation de 60 g. l⁻¹ de glycérol.

d : sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ comme source de carbone, la valine à 50 mM comme source d'azote et en présence de 100 mM d'ions phosphate.

7. Quelques niveaux d'action des ions phosphate

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action au niveau intracellulaire de l'effet négatif des ions phosphate sur la production de spiramycine, les biosynthèses des protéines intracellulaires totales, de l'ADN, de l'ARN, de la valine déshydrogénase (VDH) et des phosphatases alcalines extra et intracellulaires ont été suivies sur le milieu synthétique de base avec le glycérol (10 g. l⁻¹) et la valine (50 mM) et comparées en présence de 14 (P) et 100 mM (P+) d'ions phosphate.

7. 1. Comparaison des productions de biomasse, de spiramycine, des teneurs en ADN, en ARN et de biosynthèse des protéines intracellulaires dans des cultures en présence d'une faible ou d'une forte concentration en ions phosphate

Deux fermentations menées sur milieu synthétique de base avec le glycérol à 10 g. l⁻¹, la valine à 50 mM et en présence de 14 ou 100 mM de phosphate ont été comparées.

A de fortes concentrations en phosphate la croissance est accélérée (Fig. III. 2. 9a) et la production en spiramycine est nulle (Fig. III. 2. 8d). En phase de croissance, les teneurs en protéines intracellulaires (Fig. III. 2. 9b), en ADN (Fig. III. 2. 9c) et en ARN (Fig. III. 2. 9d) sont plus élevées, dans le milieu contenant 100 mM de phosphate. Une chute de la concentration d'ARN en phase de production est observée dans les cellules en croissance à faible concentration de phosphate alors que le niveau d'ARN en présence d'une forte concentration de phosphate demeure assez élevé.

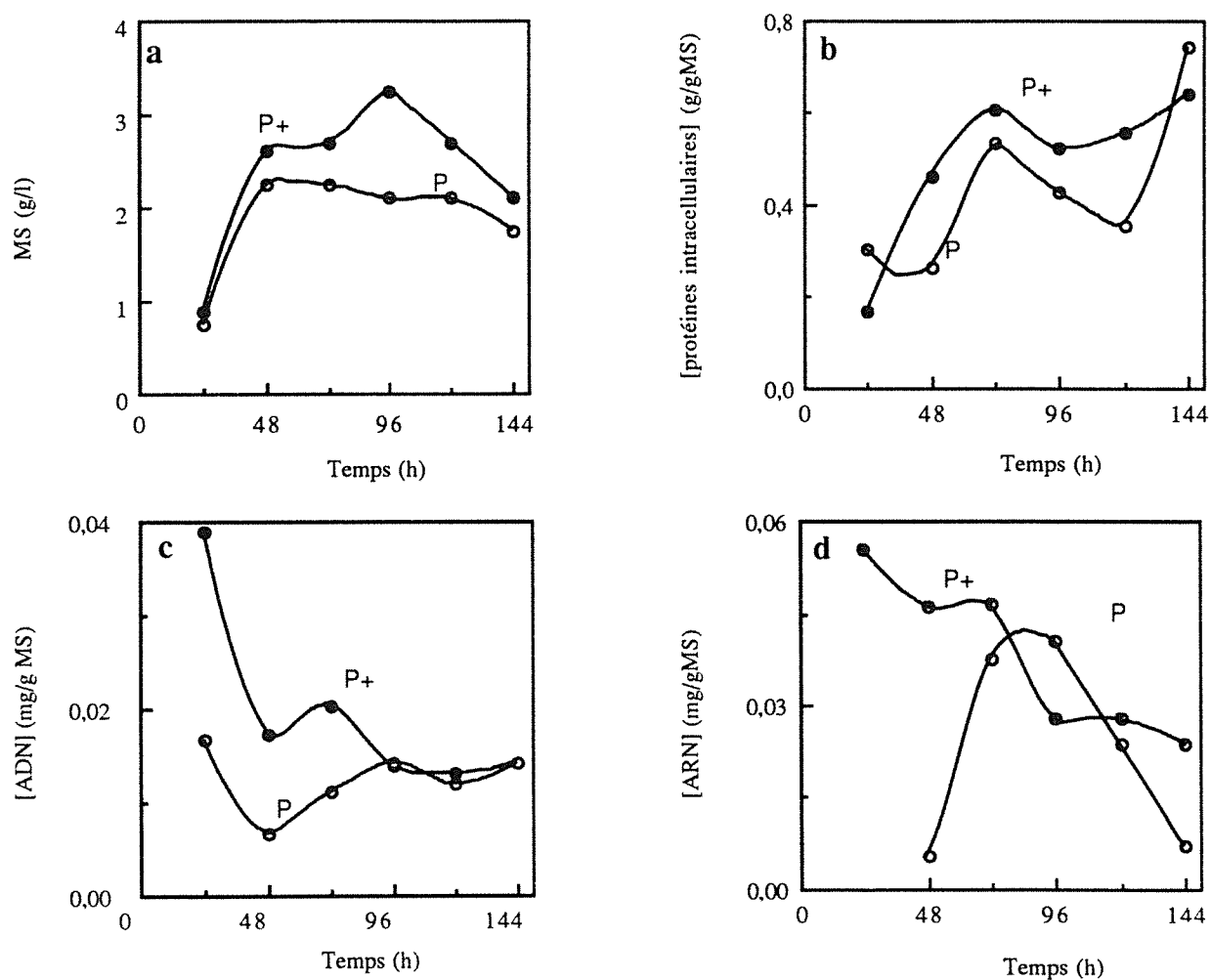


Fig. III. 2. 9 : Effets de la concentration des ions phosphate sur la croissance (a) et les teneurs intracellulaires en protéines (b), en ADN (c) et en ARN (d)

sur milieu synthétique de base contenant la valine à 50 mM comme source d'azote, le glycérol à 10 g. l⁻¹ comme source de carbone et en présence de 14 mM (symboles vides) ou 100 mM d'ions phosphate (symboles pleins).

7. 2. Biosynthèse de la valine désyhydrogénase (VDH) en présence d'une faible (P) ou d'une forte concentration de phosphate (P+)

Les Fig. III. 2. 10b et c montrent que l'activité spécifique VDH est significativement réduite par de fortes concentrations en ions phosphate parallèlement à une suppression de production de spiramycine.

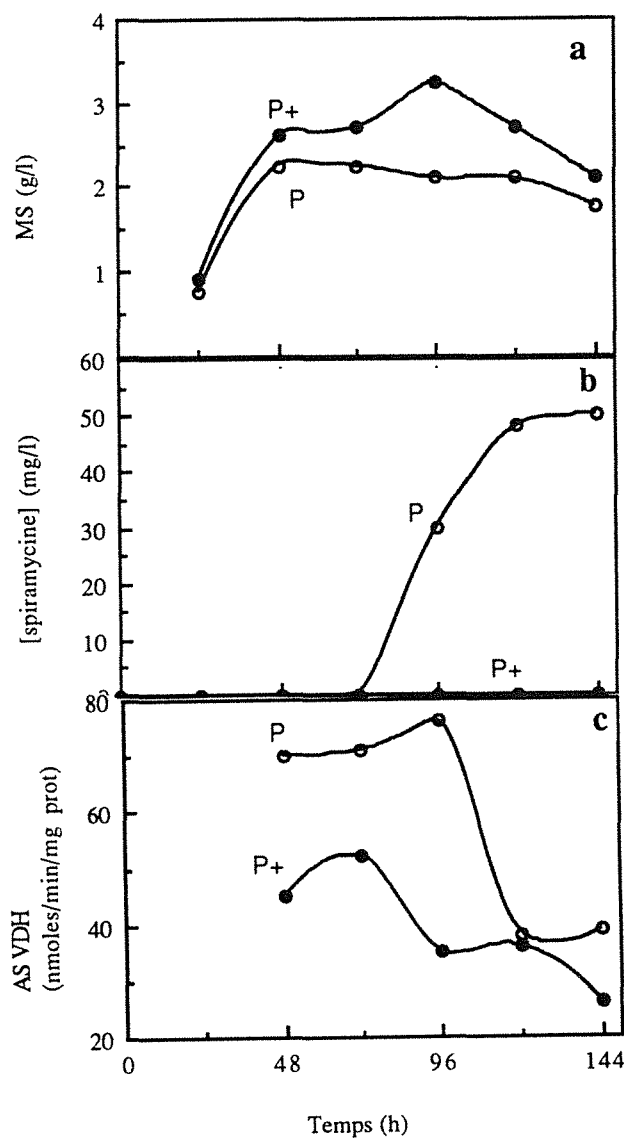


Fig. III. 2. 10. *Effet de la concentration des ions phosphate sur la croissance (a), la production de spiramycine (b) et la biosynthèse de la valine désyhydrogénase (VDH) (c)*

sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et la valine à 50 mM

P (o) : en présence de 14 mM d'ions phosphate

P (●) : en présence de 100 mM d'ions phosphate

7. 3. Biosynthèse des phosphatases alcalines intracellulaires et extracellulaires en présence d'une faible (P) ou d'une forte concentration de phosphate (P+)

L'effet des ions phosphate sur la biosynthèse des phosphatases alcalines extra et intracellulaires est illustré sur le Fig. III. 2. 11. L'activité des phosphatases alcalines extracellulaires et intracellulaires est significativement réduite dans les cellules mises en culture en présence d'une forte concentration en phosphate respectivement de 98% et 70% au début de la production.

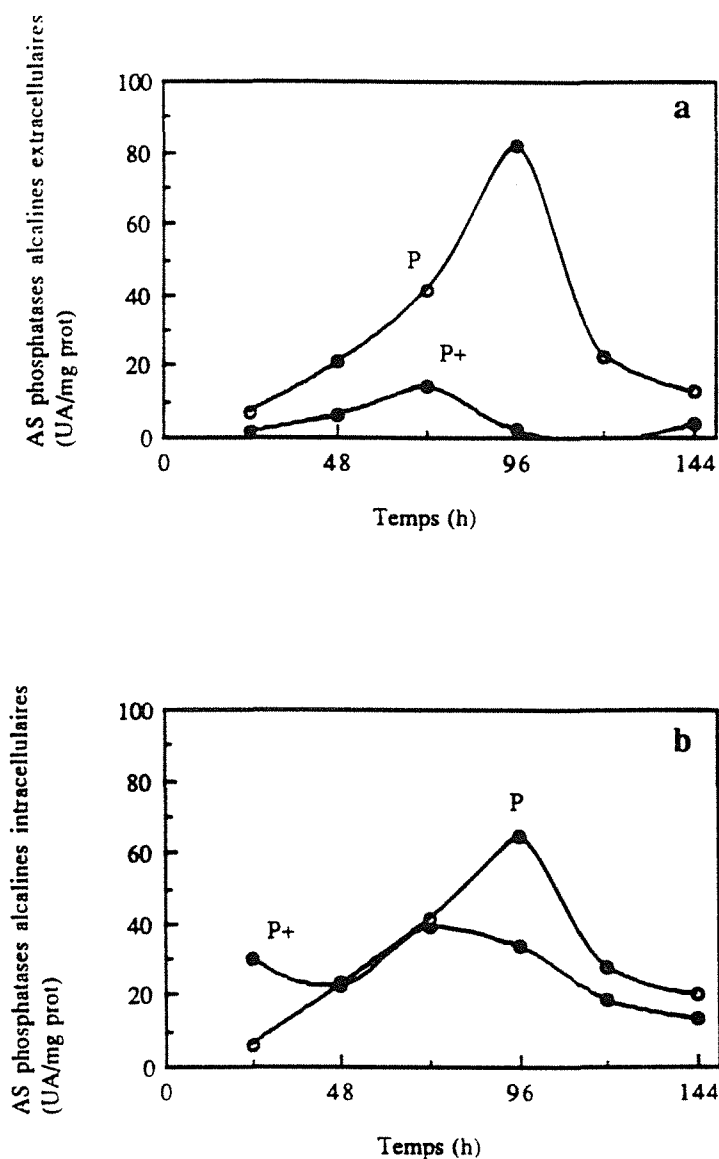


Fig. III. 2. 11 : Effet de la concentration des ions phosphate sur la biosynthèse des phosphatases alcalines extracellulaires (a) et intracellulaires (b)

sur milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 50 mM comme source d'azote.

P (o) : en présence de 14 mM d'ions phosphate

P+(●) : en présence de 100 mM d'ions phosphate.

DISCUSSION

Dans les milieux à faible concentration en ions phosphate (14 mM), les cinétiques de production de biomasse et de spiramycine varient en fonction de la source d'énergie. Les dextrines, source de carbone et d'énergie lentement assimilable, favorisent la production de spiramycine par rapport au glucose et au glycérol qui sont des sources de carbone et d'énergie rapidement métabolisables. Ceci est probablement dû à des conditions de limitation en énergie. L'effet négatif des carbohydrates rapidement assimilables sur la production des métabolites secondaires semble général. L'influence du glucose, du maltose ou du glycérol sur les productions de céphalosporine (Kennel et Demain, 1978 ; Majumdar et Majumdar, 1971) et des β -lactams fongiques et bactériens a été largement citée dans la littérature (Cortes *et al.*, 1986 ; Demain, 1963 ; Hu *et al.*, 1984). Cependant lorsque l'ajout de la source de carbone est contrôlé, le métabolite secondaire est produit efficacement (Kitao *et al.*, 1979 ; Vu-Trong et Gray, 1982).

Une relation inverse entre la vitesse spécifique de croissance et la production de spiramycine existe avec les différentes sources de carbone. Un taux de croissance élevé entraîne une faible production de spiramycine. Ceci est probablement lié à la vitesse de consommation des substrats carbonés en phase exponentielle qui est plus élevée avec le glycérol qu'avec le glucose et les dextrines, entraînant ainsi un taux de croissance plus important. Il a été montré au laboratoire (Untrau-Taghian, 1993) qu'un taux de croissance faible pouvait conduire à une production de spiramycine pendant la phase de croissance. En effet chez beaucoup d'espèces de *Streptomyces*, la production d'antibiotiques est influencée par la vitesse de croissance. Ainsi, chez *S. fradiae*, le taux de biosynthèse spécifique de la tylosine est inversement proportionnel au taux de croissance. L'augmentation du taux de croissance réprime l'activité de la 3'-O-méthyltransférase, enzyme catalysant la conversion de la macrocine en tylosine (Vu-Trong et Gray, 1982).

L'addition de concentrations croissantes de glycérol ou de glucose fait chuter le rendement global en spiramycine et augmenter la vitesse spécifique de croissance d'autant plus que la concentration initiale croît. Nous avons montré que cet effet inhibiteur n'est dû ni à un changement de pH dans la culture ni à une limitation en oxygène.

Afin de s'affranchir de l'effet stimulateur des carbohydrates facilement assimilables sur la vitesse spécifique de croissance, des ajouts de ces sources carbonées réalisés en phase de ralentissement, dans des conditions de limitation en azote, ont montré que les actions inhibitrices du glycérol et du glucose sur la production de la spiramycine ne sont pas uniquement la conséquence d'une élévation du taux de croissance. L'intensité des effets négatifs du glycérol et du glucose sur la biosynthèse de la spiramycine dépend de la concentration et du temps d'ajout. L'action du glycérol est plus marquée que celle du glucose.

Il semble que la biosynthèse de la spiramycine soit régulée par le métabolisme énergétique indépendamment de la croissance. Ces effets des différentes sources de carbone

et d'énergie semblent intimement liés au métabolites phosphorylés. L'addition des ions phosphate à forte concentration dans des milieux de culture contenant le glycérol comme unique source de carbone, réduit la production de spiramycine. Cet effet s'observe également lorsque les dextrines ou le glucose constituent les sources de carbone (résultats non montrés).

Nous avons montré, dans différentes conditions de culture, que des teneurs élevées en ATP sont mesurées avec les sources les plus rapidement assimilables ainsi qu'en présence d'un excès d'ions phosphate, cette observation étant corrélée à la réduction ou la suppression de la production de spiramycine. L'implication possible de l'ATP dans le contrôle de la biosynthèse des antibiotiques a été suggérée par Janglova *et al.* (1969). Ils ont montré que les concentrations en ATP étaient plus faibles chez des souches hyperproductrices de *B. brevis* et *Streptomyces aureofaciens*. Liras *et al.* (1977) en suivant l'évolution dans le temps de la teneur en ATP intracellulaire de cellules productrices d'antibiotiques ont suggéré que la concentration en ATP jouerait un rôle clé : élevée pendant la trophophase elle décroît rapidement pendant l'idiophase. La concentration en ATP intracellulaire ou la charge énergétique a été également suggérée comme effecteur de la régulation par les ions phosphate dans la biosynthèse de la candicidine (Martin et Demain, 1977). Escalante *et al.* (1982) ont aussi signalé le rôle de l'ATP dans la biosynthèse de l'érythromycine par *S. erythreus*.

L'ajout des analogues de structure du glucose, alors que les protéines du métabolisme secondaire étaient en place, avait pour objet de commencer à préciser le mécanisme d'action de ce contrôle par les sources d'énergie. Un blocage total de la production de spiramycine est observé lors de l'addition du 2-désoxy-D-glucose, probablement phosphorylé en 2-désoxy-6-phosphate-D-glucose sans être métabolisé. En revanche l'ajout du 3-O-méthyl-D-glucose qui est assimilable et non phosphorylé n'a aucun effet inhibiteur sur la biosynthèse de la spiramycine. Ces deux constatations suggèrent un effet inhibiteur important du glucose-6-phosphate. Pour juger de l'effet inhibiteur du glucose, il serait intéressant de mesurer les concentrations intracellulaires des dérivés phosphorylés de la glycolyse. Les travaux de Madry *et al.* (1979) ont proposé une fonction possible du glucose-6-phosphate en tant que médiateur commun aux deux effets inhibiteurs du glucose et des ions phosphate. Ils ont montré que le glucose, le 2-désoxy-D-glucose et le phosphate inorganique inhibaient la production de tylosine ainsi que l'oxydation des acides gras. Ils ont vérifié que le glucose-6-phosphate s'accumulait dans les cultures excédentaires en ions phosphate. Ils suggèrent que les deux effets négatifs puissent avoir un mécanisme d'action partiellement similaire : l'inhibition de l'utilisation des acides gras à longues chaînes qui provoquerait une diminution de la fourniture des précurseurs (par exemple, l'acétyl-CoA). Ces résultats confirment le rôle de la glucokinase dans la répression catabolique démontré par Ikeda *et al.* (1984).

Nous avons montré que l'effet négatif des ions phosphate sur la production de spiramycine pouvait se manifester à différents niveaux du métabolisme cellulaire. En présence d'un excès de phosphate (concentration inhibitrice de la production de spiramycine), parallèlement à l'élévation de la teneur intracellulaire en ATP, les productions de biomasse,

des protéines intracellulaires, de l'ADN et de l'ARN sont augmentées. Les ions phosphate semblent stimuler les processus du métabolisme primaire au détriment du métabolisme secondaire (Martin, 1977). La chute de l'ARN caractéristique de la fin de la trophophase semble déclencher la production de l'antibiotique (Mertz et Doolin, 1973 ; Liras *et al.*, 1977).

Une enzyme du métabolisme primaire, la valine déshydrogénase (première enzyme du catabolisme de la valine, pourvoyeur de précurseurs de l'aglycone de la spiramycine) a une activité spécifique réduite en présence de fortes concentrations de phosphates. Ceci a été également observé chez *S. fradiae* productrice de tylosine (Vu-Trong *et al.*, 1981). Les ions phosphates en exerçant leur effet négatif sur la valine déshydrogénase limiteraient la disponibilité des précurseurs de l'aglycone de la spiramycine.

De fortes concentrations en phosphate inhibent fortement les activités phosphatases alcalines intra et extracellulaires. Les phosphatases, comme cible d'action du phosphate inorganique, ont été également décrites chez *S. fradiae* (Majumdar et Majumdar, 1971) et chez *S. griseus* (Walker et Walker, 1971).

Les expériences avec utilisation de la streptomycine en cultures sur milieu producteur (dextrines-valine) et en systèmes de cellules non proliférantes ont permis de situer dans le temps la synthèse des systèmes enzymatiques nécessaires au métabolisme secondaire. Dans nos conditions de culture cette mise en place a lieu généralement entre 48 et 96 h. Après 96 h ces protéines sont totalement inactivées.

Des expériences analogues par ajout de glycérol en culture sur milieu producteur et en système de cellules non proliférantes ont permis de démontrer uniquement l'effet inhibiteur du métabolisme du glycérol sur les systèmes de production de spiramycine. L'effet inhibiteur sur la synthèse des antibiotiques exercé par les sources carbonées a été décrit chez *S. clavuligerus* (Aharonowitz et Demain, 1978 ; Hu *et al.*, 1984 ; Lebrihi *et al.*, 1988). Le mécanisme de la régulation par le glycérol de la biosynthèse de la céphamycine chez *C. acremonium*, *S. clavuligerus* et *S. lactamdurans* est dû, en partie, à la répression et à l'inhibition de l'ACV synthétase, de la cyclase, de l'épimérase et de l'expandase (Cortes *et al.*, 1986 ; Lebrihi *et al.*, 1988).

Ces résultats suggèrent d'élaborer des hypothèses sur la mise en place des systèmes enzymatiques indispensables à la production de spiramycine, quelle que soit la source d'énergie, l'expression de ces protéines pouvant être inhibée par des métabolites fortement énergétiques. Ce ne sont là que des indications indirectes qu'il conviendrait d'étayer par le suivi de l'évolution dans le temps et l'analyse directe des protéines intracellulaires dans les différentes conditions de culture favorisant ou non la production de spiramycine.

PARTIE
III. 3

**PRODUCTION DE SPIRAMYCINE
EN CULTURES SEMI-CONTINUES
A AMMONIUM ET SOURCE
CARBONÉE CONTRÔLÉS**

INTRODUCTION

Les procédés de fermentation continus et semi-continus sont des techniques appropriées pour l'approfondissement de l'étude des régulations du métabolisme. La première approche est difficile à mettre en oeuvre dans le cas des *Streptomyces*. En raison de leur croissance lente, le temps de stabilisation est long et les risques de contamination et de pannes d'appareillage sont importants. De plus, les cultures sont souvent peu homogènes (adsorption des cellules sur les surfaces ; formation de "pelotes" de tailles diverses, etc...). Nous avons donc essayé de contourner ce problème en optant pour le semi-continu. Celui-ci est un outil de choix aussi bien pour l'expérimentateur en physiologie microbienne que pour l'industriel. En utilisant ce type de procédé de fermentation, la limitation en apport de certains substrats (par exemple : sources de carbone ou d'azote rapidement assimilables) permet de s'affranchir des phénomènes de répression et/ou d'inhibition catabolique.

Dans de telles conditions d'utilisation, il a été montré que le glucose assurait une bonne production de spiramycine (Kitao *et al.*, 1979) et que le glycérol permettait la synthèse de tylosine (Vu-Trong et Gray, 1982). Les études en semi-continu offrent l'avantage par rapport au système continu d'être moins coûteuses tant sur le plan de l'utilisation des substrats que sur le plan de la durée des expérimentations.

Vu-Trong *et al.* (1980) ont pu à l'aide de résultats provenant de continus, mettre au point un milieu en discontinu induisant la production de tylosine. En 1982, ces mêmes auteurs ont utilisé le continu pour comprendre la synthèse de tylosine par *S. fradiae* en étudiant la régulation de certaines enzymes de la biosynthèse de l'antibiotique (Vu-Trong et Gray, 1982). En 1987, ils ont mis au point un système cyclique d'alimentation en semi-continu. En faisant varier l'amplitude de la durée d'alimentation en glucose et en glutamate de sodium, ils sont parvenus à augmenter linéairement la vitesse spécifique de production de la tylosine pendant plus de 200 heures (Vu-Trong et Gray, 1987).

Les fermentations que nous avons réalisées en batch sur le milieu synthétique de base décrit dans le chapitre "Matériels et méthodes", ont montré que les ions ammonium, le glycérol ainsi que les ions phosphate pouvaient exercer un effet négatif marqué sur la production de spiramycine lorsqu'ils sont en excès. Par conséquent, nous avons procédé à des fermentations en semi-continu, assurant une alimentation faible en glycérol afin de satisfaire la demande en énergie de la souche, mais évitant les effets de la répression catabolique sur la production de la spiramycine. Les ions phosphate sont uniquement présents dans le milieu de base initial à une concentration de 10 mM. Une série de trois expériences a été menée en utilisant un milieu d'alimentation avec une concentration de glycérol choisie de manière à obtenir un quotient métabolique (q_{gly}) de $0,1 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$, avec des modifications dans les concentrations des ions ammonium de façon à étudier l'effet de la vitesse spécifique de consommation des ions ammonium sur la production de la spiramycine. Des productions de

spiramycine intéressantes ont été obtenues. Grâce à la technique de culture en semi-continu, des relations entre la production de spiramycine et les différents quotients métaboliques tels que vitesse spécifique de croissance, de consommation des substrats peuvent être établies.

Toutes les expériences qui seront présentées dans cette partie ont été réalisées dans un fermenteur de 7 l. Le pH est consigné à $7 \pm 0,5$ et la température à $28 \pm 1^\circ\text{C}$. L' O_2 dissous est régulé à 25% de saturation pour éviter toute limitation en oxygène, par action simultanée sur la vitesse d'agitation (400 ± 100 rpm) et l'ouverture du débitmètre massique (de 0 à 30%).

RESULTATS

1. Caractéristiques de croissance et de production de spiramycine d'une fermentation batch sur un milieu synthétique de base avec 10 g. l⁻¹ de glycérol et 20 mM de NH_4Cl

Nous avons montré dans les parties précédentes qu'une fermentation en batch utilisant le milieu synthétique de base avec le glycérol à 10 g. l⁻¹ et les ions ammonium à 50 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote, ne permet pas la production de spiramycine car le rapport entre les sources carbonée et azotée entraîne un excédent en azote.

En revanche, des conditions de limitation en azote (glycérol à 10 g. l⁻¹ et ammonium à 20 mM) permettent la production de spiramycine (Fig. III. 3. 1). La synthèse de la spiramycine commence à 50 h avec une vitesse spécifique maximale de production (q_{spira}) de 0,25 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS. Elle atteint une production volumétrique maximale de 35 mg. l⁻¹ et un rendement global maximum de 14 mg. g⁻¹MS. La production de spiramycine n'a commencé qu'après épuisement total du milieu de culture des sources azotée et carbonée respectivement à 36 h et 48 h après l'inoculation. Cette fermentation en culture batch est caractérisée par un taux de croissance d'environ 0,055 h⁻¹ et des vitesses spécifiques maximales de consommation du glycérol et des ions ammonium respectives de 0,2 g. h⁻¹. g⁻¹ MS et 0,5 mmol. h⁻¹. g⁻¹ MS. L'utilisation des ions ammonium à 20 mM pour une concentration de glycérol à 10 g. l⁻¹ semble minimiser l'influence négative des ions ammonium sur la synthèse de la spiramycine .

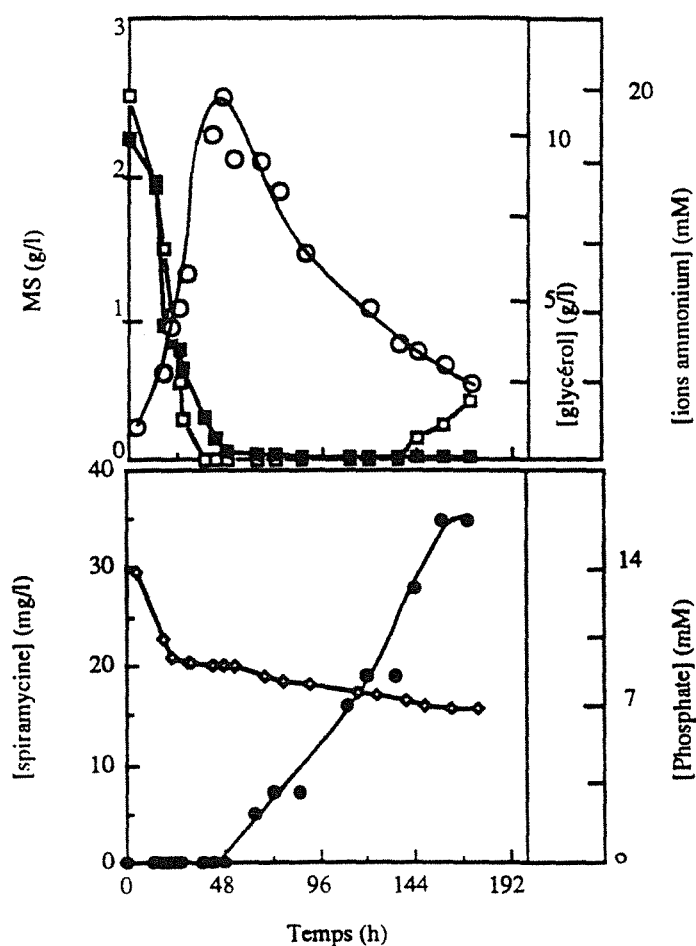


Fig. III. 3. 1. : Culture en batch dans des conditions de limitation en ammonium par rapport au glycérol

Cinétiques de croissance (○), de consommation du glycérol (■), de consommation et de production des ions ammonium (□), de consommation des ions phosphate (◇) et de production de spiramycine (●) en culture discontinue sur milieu synthétique de base avec le glycérol à 10 g. l^{-1} et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote.

2. Caractéristiques de croissance et de production de spiramycine de fermentations fed-batch avec alimentation continue à débit constant

Dans tous les semi-continus qui seront présentés dans cette partie, la fermentation débute d'abord par un batch sur un milieu initial qui est porté à 3 l avec, outre les éléments du milieu synthétique de base décrit dans le chapitre "Matériels et méthodes", du glycérol à raison de 10 g. l⁻¹ et de l'ammonium à 20 mM. La biomasse estimée lors du commencement de l'alimentation est d'environ 2 g. l⁻¹ (Fig. III. 3. 1). L'alimentation n'est commencée que lorsque le glycérol résiduel est de l'ordre de 0,5 g. l⁻¹. Le milieu d'alimentation est composé uniquement de deux éléments : le glycérol et les ions ammonium dans différents rapports azote/carbone qui serviront à maintenir une faible croissance cellulaire et à stimuler la production. Les ions magnésium, zinc, cobalt, chlorure et sulfate ne sont pas ajoutés car ils pourraient s'accumuler et provoquer des inhibitions de croissance et / ou de production. Ainsi par exemple le zinc et le cobalt influent directement sur la production des trois spiramycines (Ninet et Verrier, 1960). Quant au chlorure de sodium et au chlorure de calcium, qui jouent sur l'état membranaire des cellules, ils sont présents uniquement dans le milieu initial à des concentrations identiques à celles citées dans le chapitre "Matériels et méthodes". Les ions phosphate étant peu utilisés pour la croissance, sont seulement contenus dans le milieu initial à 10 mM (concentration faible et constante durant le semi-continu pour éviter leur effet négatif sur la production).

En discontinu, pendant la phase exponentielle de croissance, pour 10 g. l⁻¹ de glycérol, 18,75 mM d'ammonium sont consommés ($q_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 0,5 \text{ mmol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$). La vitesse maximale de consommation du glycérol est de 0,2 g. h⁻¹. g⁻¹MS (Fig. III. 3. 1). Nous avons choisi une concentration en glycérol dans l'alimentation telle que la vitesse spécifique de consommation du glycérol souhaitée au départ soit nettement plus faible et proche de 0,1 g. h⁻¹. g⁻¹MS dans les différentes expériences du semi-continu.

2. 1. Alimentation de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 180 mM d'ammonium avec un débit de 19 ml. h⁻¹

Dans cette première expérience, le débit est fixé à $19 \pm 1 \text{ ml. h}^{-1}$. Le milieu d'alimentation est composé de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 180 mM d'ammonium. L'alimentation est déclenchée à 43 h de fermentation. Le milieu d'alimentation et le débit utilisés entraînent des vitesses spécifiques de consommation de glycérol et d'ammonium, au démarrage du fed-batch, de 0,1 g. h⁻¹. g⁻¹ (q_{gly}) et 0,45 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS ($q_{\text{NH}_4\text{Cl}}$) respectivement. Sur les Fig. III. 3. 2 et III. 3. 3 sont présentées les cinétiques expérimentales de la fermentation et leurs interprétations.

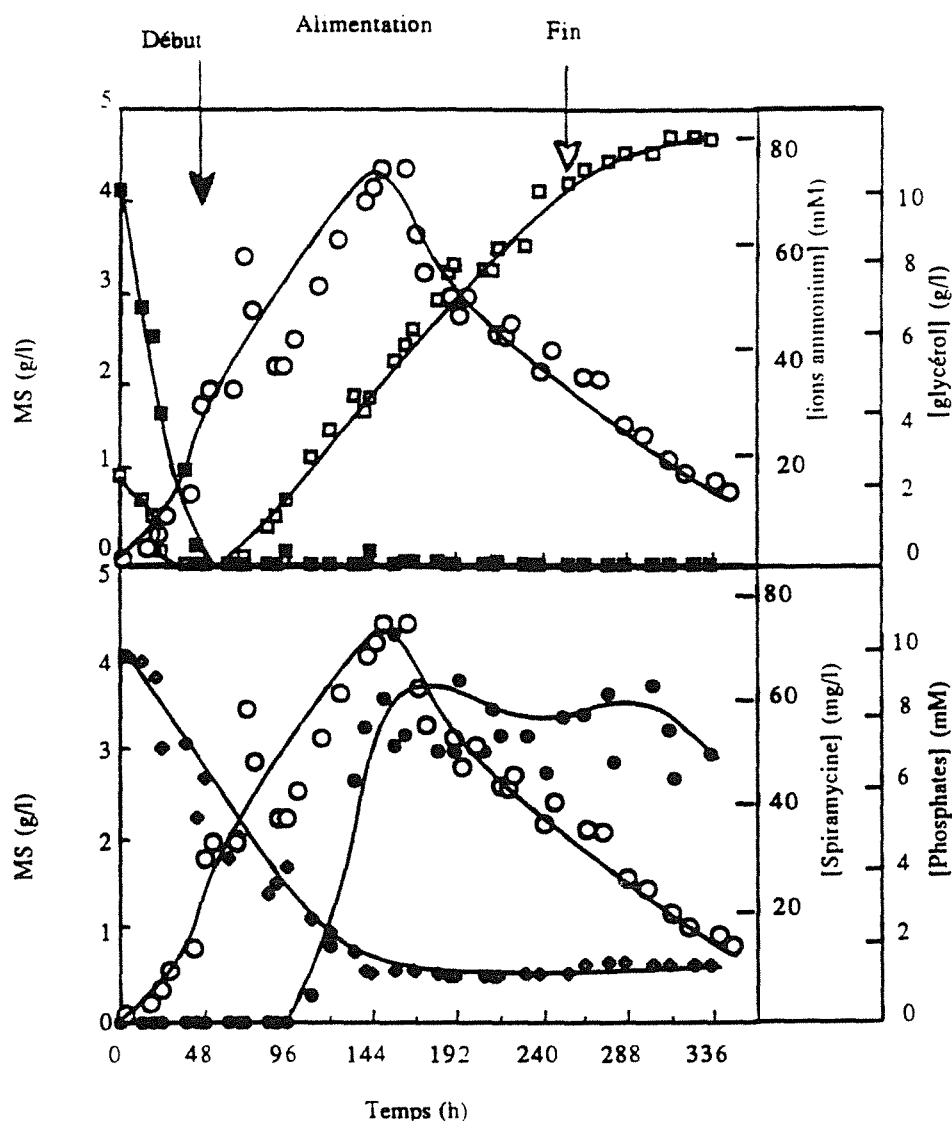


Fig. III. 3. 2. Culture en fed-batch dans des conditions d'excès en ammonium par rapport au glycérol

Cinétiques de croissance (○), de consommation du glycérol (■), de consommation et de production des ions ammonium (□), de consommation des ions phosphate (◇) et de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l^{-1} et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote, avec une alimentation continue composée de 40 g. l^{-1} de glycérol et 180 mM d' ammonium à débit constant de 19 ml. h^{-1} .

→ : marque le début de l'alimentation.

→ : marque la fin de l'alimentation

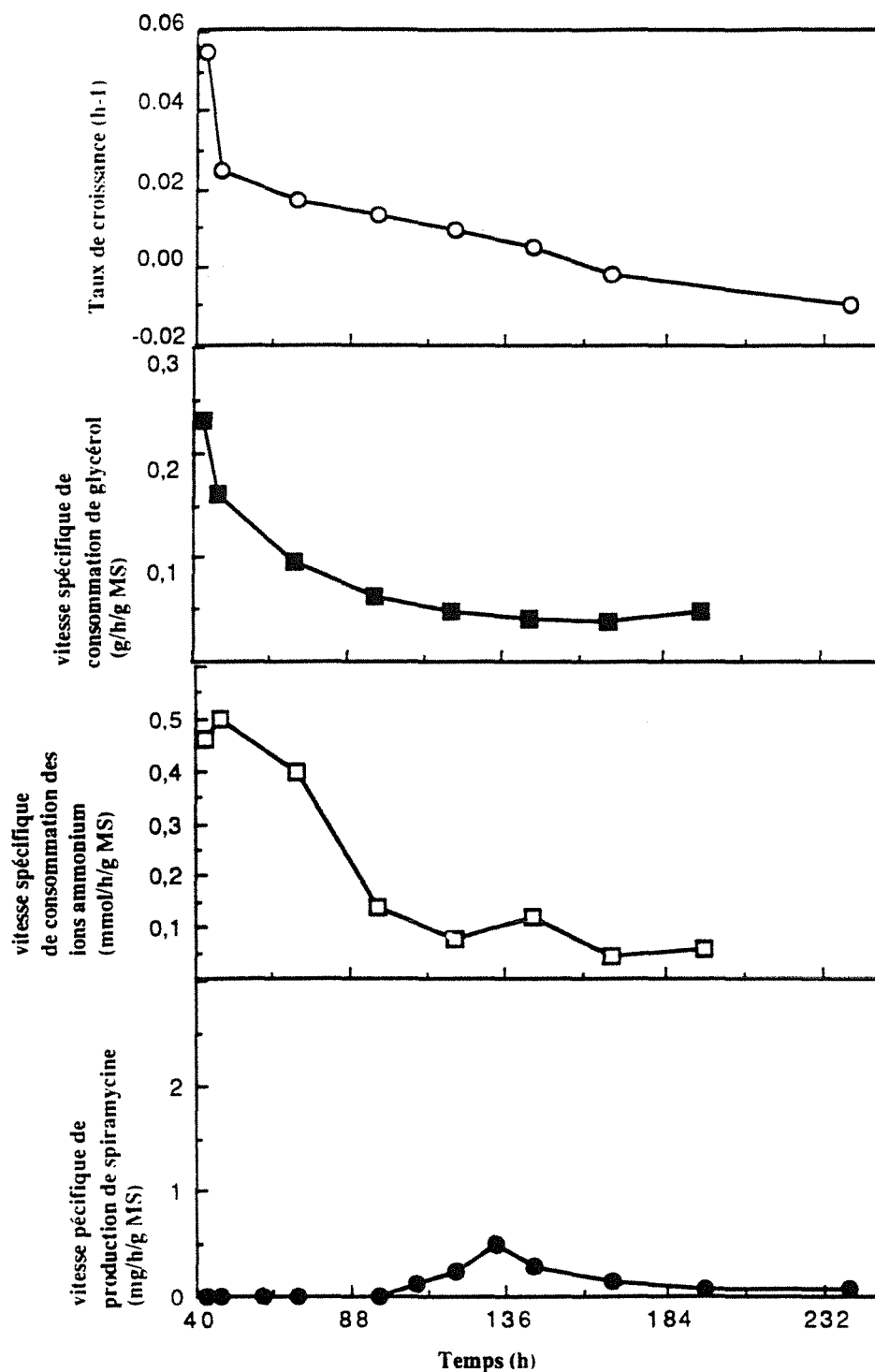


Fig. III. 3. 3. : Evolution des paramètres cinétiques d'une culture fed-batch excédentaire en ammonium.

Evolution des vitesses spécifiques de croissance (○), de consommation de glycérol (■), de consommation des ions ammonium (□) et de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique de base contenant du glycérol à 10 g. l⁻¹ et d'ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote et une alimentation continue composée de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 180 mM d'ammonium à débit constant de 19 ml. h⁻¹.

Nous constatons que le glycérol, apporté à la concentration de 40 g. l⁻¹ avec un débit de 19 ml. h⁻¹, est totalement consommé. Seul 0,5 g. l⁻¹ est dosé pendant toute la durée de la fermentation. Nous sommes bien en conditions de limitation en source carbonée. Durant le semi-continu la vitesse spécifique de consommation du glycérol a diminué jusqu'à stabilisation à une valeur moyenne de 0,05 g. h⁻¹. g⁻¹MS à partir de 120 h. En revanche, les ions ammonium sont largement excédentaires, ce qui se traduit par une accumulation atteignant une concentration de 70 mM en fin d'alimentation. L'alimentation apportée (180 mM) avec un débit de 19 ml. h⁻¹ dépasse les besoins de consommation azotée de la bactérie. La vitesse spécifique de consommation des ions ammonium chute progressivement pour atteindre une valeur moyenne de 0,075 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS au bout de 120 h. Bien que les vitesses spécifiques de consommation des deux substrats baissent au cours de l'alimentation, leur assimilation continue. Le taux de croissance chute également pendant le semi-continu, se maintient à des valeurs relativement faibles puis devient négatif, ce qui indique une mortalité des bactéries.

Lors de cette fermentation, bien que les ions ammonium se soient accumulés, la biosynthèse de la spiramycine a débuté à 100 h. A ce moment de la fermentation, les vitesses spécifiques de consommation du glycérol et des ions ammonium sont respectivement de 0,06 g. h⁻¹. g⁻¹MS et 0,1 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS ($Y_{\text{azote/carbone}} = 1,7 \text{ mmol. g}^{-1}$). Le taux de croissance est de 0,015 h⁻¹. La production maximale de spiramycine est de 60 mg. l⁻¹, ce qui équivaut à un rendement de 14 mg. g⁻¹MS. Cette production est égale à celle obtenue en discontinu (Fig. III. 3. 1). Cependant la vitesse spécifique maximale de production est supérieure au discontinu puisqu'elle atteint 0,5 mg. h⁻¹. g⁻¹MS contre 0,25 mg. h⁻¹. g⁻¹MS. Cette valeur maximale ne se maintient pas dans le temps. La vitesse spécifique maximale de production de spiramycine a été obtenue lorsque les vitesses spécifiques de consommation du glycérol et des ions ammonium sont respectivement de 0,05 g. h⁻¹. g⁻¹MS et 0,1 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS ($Y_{\text{azote/carbone}} = 2 \text{ mmol. g}^{-1}$) et le taux de croissance de 0,01 h⁻¹. Cette vitesse spécifique maximale de production de spiramycine est observée à 133 h alors que nous étions en présence de 32 mM d'ions ammonium dans le milieu de culture. L'excrétion des ions ammonium observée après l'arrêt de l'alimentation est probablement due à la protéolyse.

2. 2. Alimentation continue de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 66 mM d'ammonium avec un débit de 19 ml. h⁻¹

Le choix d'une concentration de 40 g. l⁻¹ de glycérol avec un débit de 19 ml. h⁻¹, traduisant une vitesse spécifique de consommation du glycérol au départ de 0,1 g. h⁻¹. g⁻¹MS, semble satisfaisant et est donc maintenu dans cette seconde expérience de semi-continu. Cependant, afin d'éviter l'accumulation des ions ammonium et par là même son éventuel effet négatif sur la production de spiramycine, nous avons choisi un rapport azote/carbone dans le milieu d'alimentation pour être en déficit en ammonium (40 g. l⁻¹ de glycérol et 66 mM en ammonium au lieu de 180 mM auparavant). Cette concentration d'ammonium apportée à ce débit correspond à un apport initial à la vitesse spécifique de 0,16 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS. Dans ce cas la vitesse spécifique d'alimentation est bien inférieure à la vitesse spécifique maximale de consommation des ions ammonium qui est de l'ordre de 0,5 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS. Cette alimentation servira comme apport indispensable au métabolisme cellulaire, à maintenir une faible croissance cellulaire et à créer ainsi les conditions nécessaires pour la production de la spiramycine. L'alimentation est déclenchée à 60 h.

Les résultats expérimentaux sont représentés sur la Fig. III. 3. 4 et l'évolution du taux de croissance ainsi que les différentes vitesses spécifiques de consommation des substrats et de production de spiramycine sur la Fig. III. 3. 5. Dans ces conditions de fermentation, le glycérol était présent à une concentration constante de l'ordre de 0,5 g. l⁻¹, par contre aucune trace d'ions ammonium n'a été détectée, ceci pourrait indiquer une trop forte limitation en ammonium. Les ions ammonium détectés en fin de fermentation pourraient être le résultat de la protéolyse. La production de spiramycine commence à 96 h avec une vitesse spécifique maximale de production égale à 1,5 mg. h⁻¹. g⁻¹MS. Le rendement est de 21 mg. g⁻¹ MS. La production débute et est maximale quand les vitesses spécifiques de consommation du glycérol et d'ammonium sont respectivement de 0,05 g. h⁻¹. g⁻¹MS et 0,01 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS ($Y_{\text{azote/carbone}} = 2 \text{ mmol. g}^{-1}$) et le taux de croissance de 0,035 h⁻¹. La vitesse spécifique maximale de production de spiramycine est 3 fois supérieure à celle obtenue dans les conditions du semi-continu précédent et 6 fois plus élevée que celle estimée dans la culture discontinue. L'évolution de la vitesse spécifique de production de spiramycine est caractérisée par une valeur élevée au départ puis une chute brusque.

Il est intéressant de signaler que *S. ambofaciens* a sporulé sur ce milieu de culture, ceci pourrait traduire des conditions de limitations extrêmes, notamment en ammonium. Des études sur *S. griseus* (Kendrick et Ensign, 1983) ont montré que la sporulation apparaissait en milieu liquide lorsque ce dernier devenait limitant en sources carbonée et azotée.

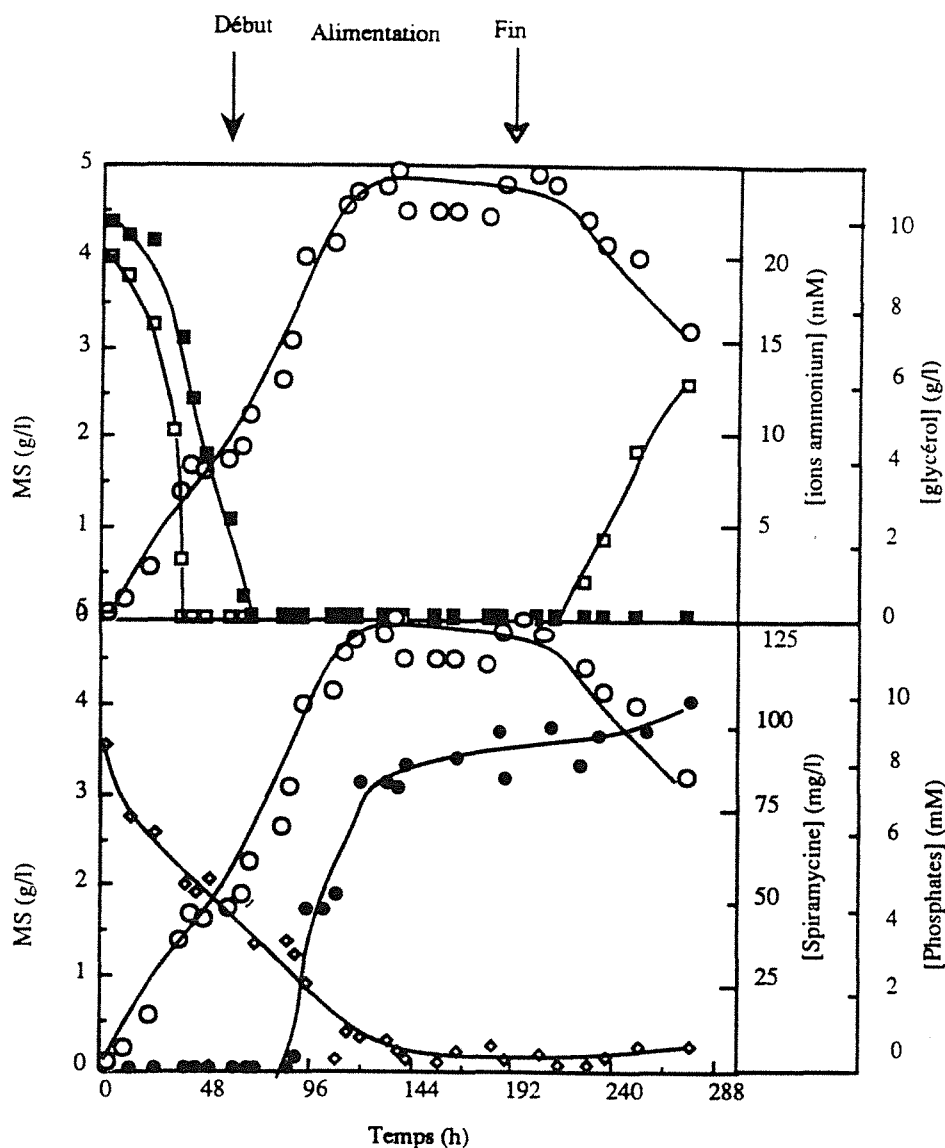


Fig. III. 3. 4. Culture fed-batch dans des conditions de limitation en ammonium par rapport au glycérol

Cinétiques de croissance (○), de consommation du glycérol (■), de consommation des ions ammonium (□), de consommation des ions phosphate (◇), de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote, avec une alimentation continue composée de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 66 mM d'ammonium à débit constant de 19 ml. h⁻¹.

→ : marque le début de l'alimentation.

→ : marque la fin de l'alimentation

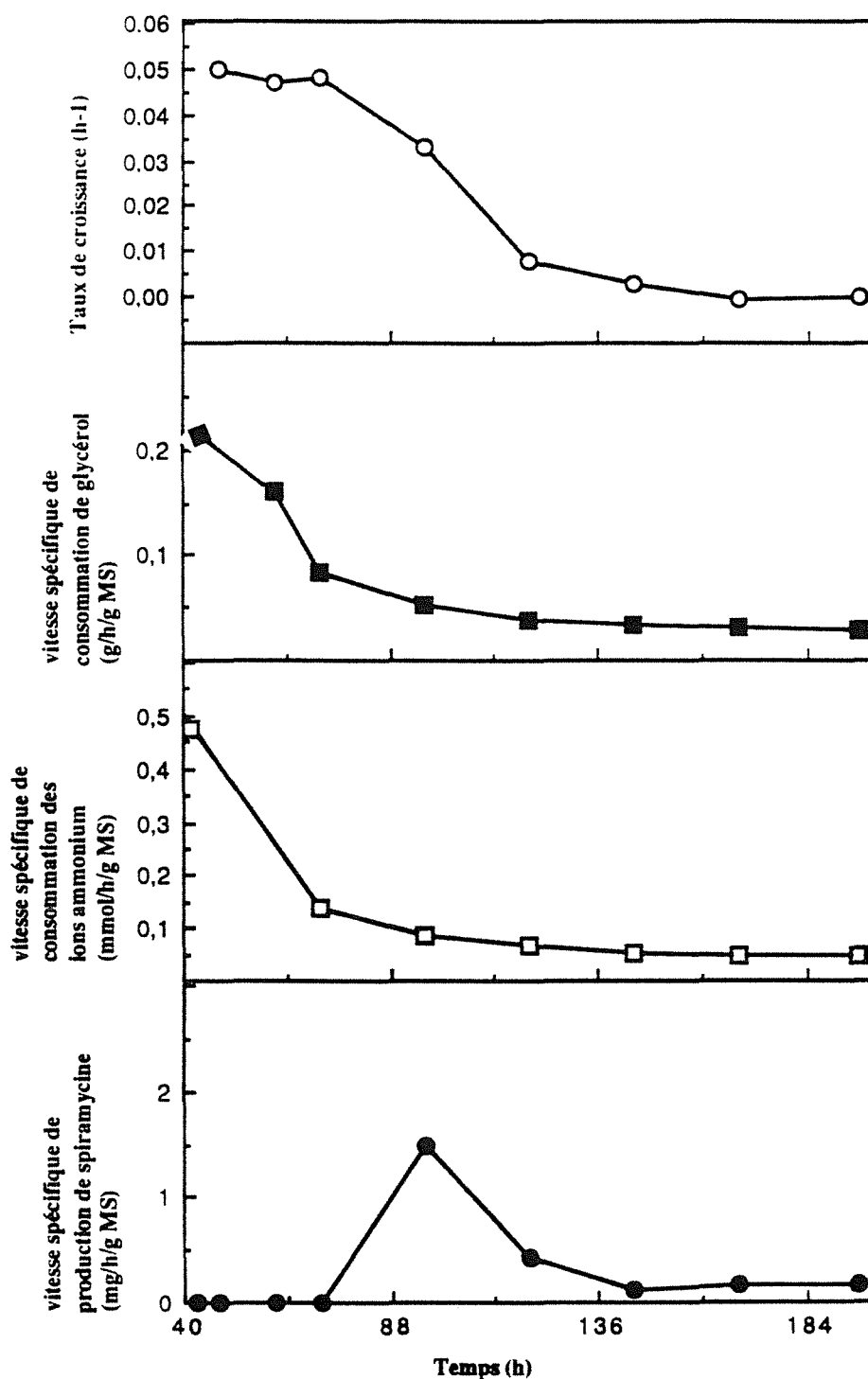


Fig. III. 3. 5. : Evolution des paramètres cinétiques d'une culture fed-batch limitante en ammonium.

Evolution des vitesses spécifiques de croissance (○), de consommation de glycérol (■), de consommation des ions ammonium (□) et de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote avec une alimentation continue composée de 40 g. l⁻¹ de glycérol et 66 mM d'ammonium à débit constant de 19 ml. h⁻¹.

2. 3. Alimentation continue de 25 g. l⁻¹ de glycérol et 100 mM d'ammonium à un débit constant de 27 ml. h⁻¹

Les conditions expérimentales de la fermentation précédente semblent trop limitantes en azote. Ainsi dans le but d'accroître davantage la vitesse spécifique de production de spiramycine et d'essayer de maintenir plus longtemps ce quotient métabolique à une valeur élevée, une troisième expérience avec une alimentation de 27 ml. h⁻¹ contenant du glycérol (25 g. l⁻¹) et des ions ammonium (100 mM) a été réalisée. Ceci permet d'obtenir des vitesses spécifiques de consommation initiales respectives de 0,1 g. h⁻¹. g⁻¹MS (q_{gly} demeurant toujours identique) et 0,36 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS (valeur intermédiaire entre celle du premier semi-continu et le second).

L'alimentation a été démarrée à 47,5 h. Les cinétiques sont présentées sur la Fig. III. 3. 6. L'évolution des paramètres cinétiques est indiquée sur la Fig. III. 3. 7. La production de spiramycine a commencé à 90 h, alors que le taux de croissance était de 0,005 h⁻¹ et les vitesses spécifiques de consommation du glycérol et des ions ammonium étaient respectivement de l'ordre de 0,05 g. h⁻¹. g⁻¹MS et 0,13 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS ($Y_{azote/carbone} = 2,6$ mmol. g⁻¹). Dans ces conditions, la production volumétrique a atteint 125 mg. l⁻¹ et la vitesse spécifique maximale de production a été améliorée de 2 fois par rapport au second semi-continu (3 mg. h⁻¹. g⁻¹MS). Nous constatons toujours une chute brusque de la vitesse spécifique de production de spiramycine, néanmoins le minimum demeure à une valeur relativement élevée en comparaison avec ces fermentations. Pendant toute la durée du semi-continu le glycérol ainsi que les ions ammonium ont été détectés à des concentrations respectives de l'ordre de 0,5 g. l⁻¹ et 0,3 mM dans le milieu de culture. Ceci traduit de bonnes conditions d'équilibre entre les sources azotée et carbonée. Cependant une excrétion d'ammonium avec une vitesse spécifique de 0,3 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS, atteignant 13 mM d'ammonium à la fin de l'alimentation a été observée. La protéolyse est probablement à l'origine de ce relargage d'ammonium.

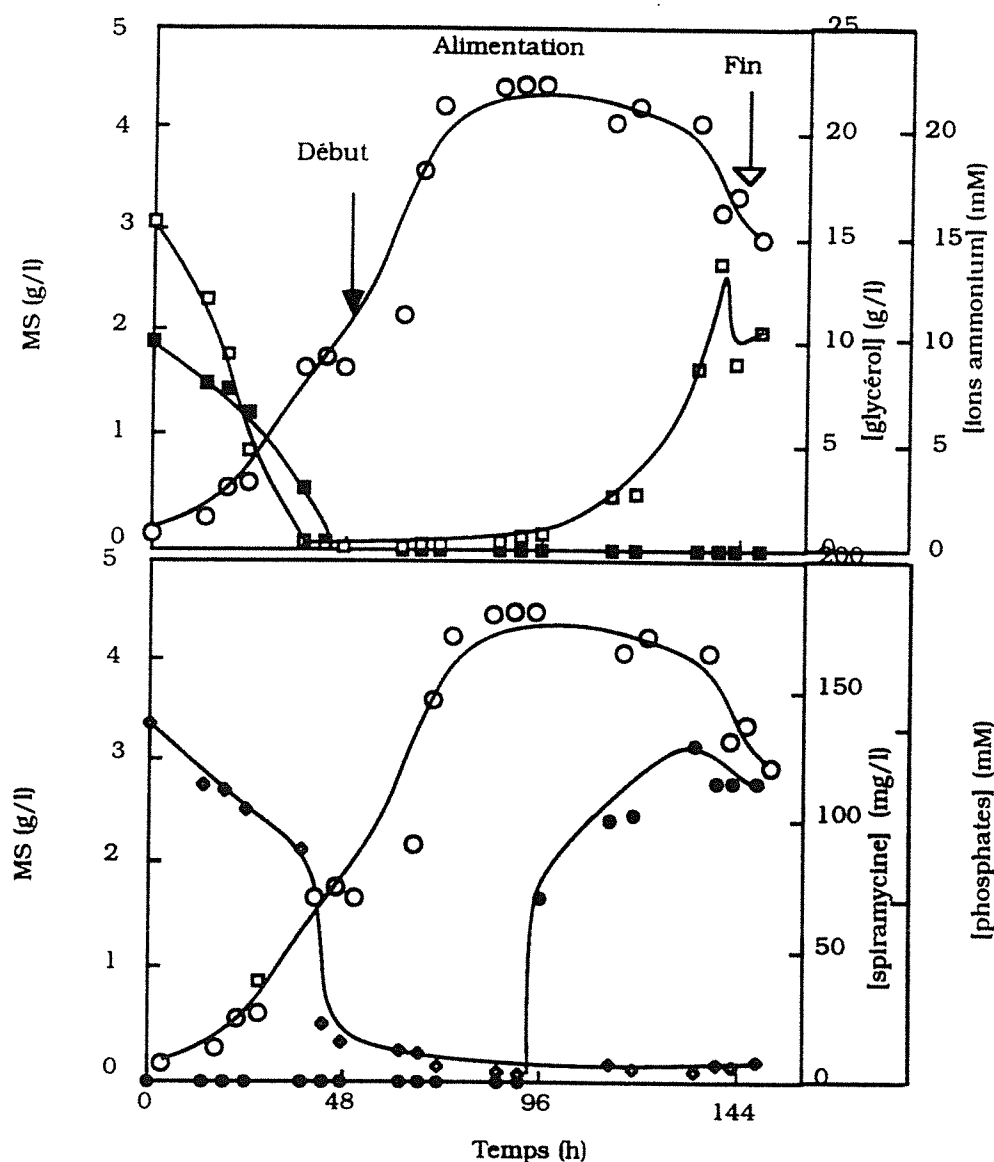


Fig. III. 3. 6. Culture en fed-batch dans des conditions d'équilibre en ammonium et glycérol.

Cinétiques de croissance (○), de consommation du glycérol (■), de consommation et de production des ions ammonium (□), de consommation des ions phosphate (◇), de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d' azote, avec une alimentation continue composée de 25 g. l⁻¹ de glycérol et 100 mM d'ammonium à débit constant de 27 ml. h⁻¹.

→ : marque le début de l'alimentation.

→ : marque la fin de l'alimentation

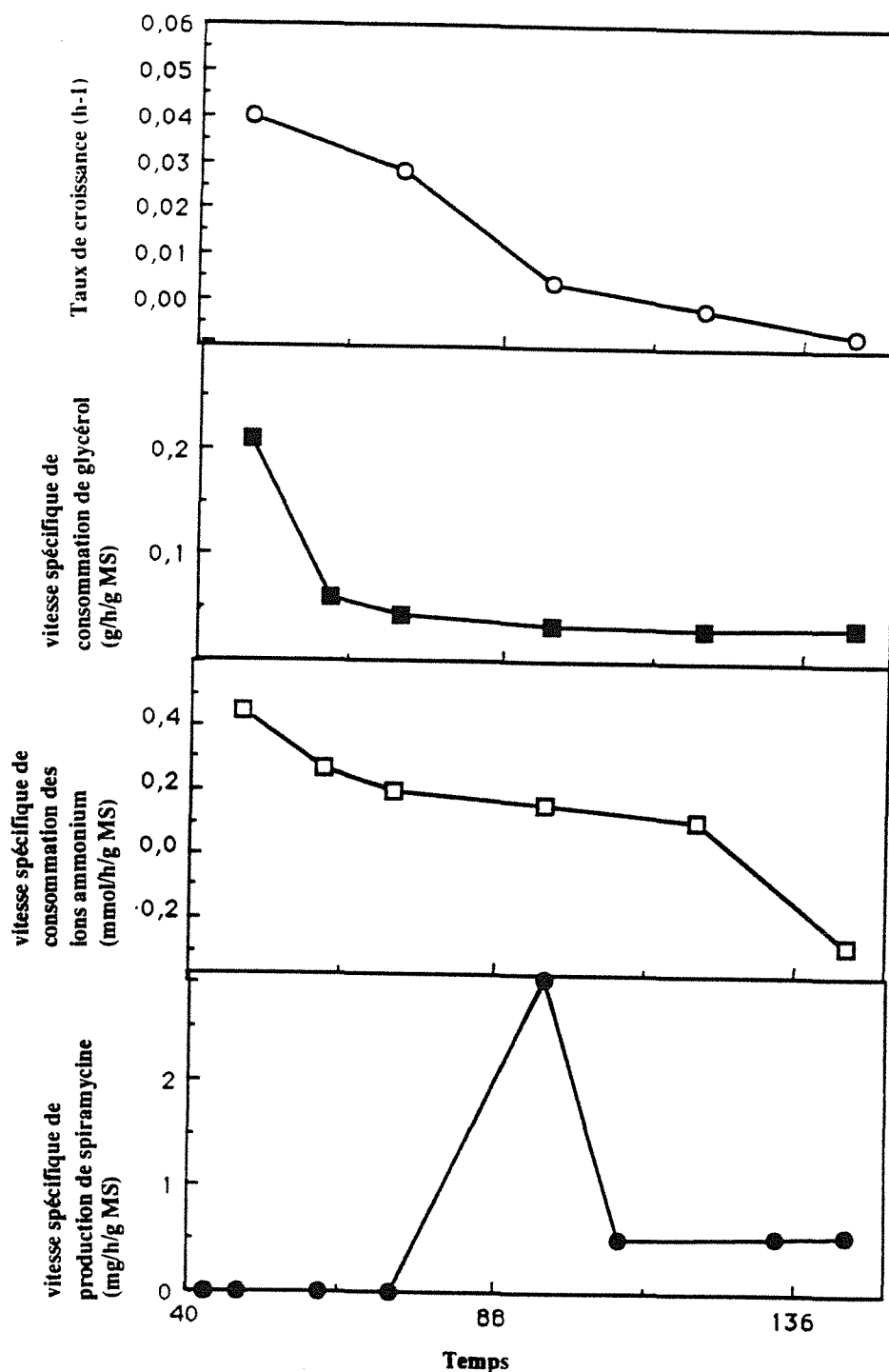


Fig. III. 3. 7. : Evolution des paramètres cinétiques d'une culture fed-batch équilibrée en glycérol et en ammonium.

Evolution des vitesses spécifiques de croissance (○), de consommation de glycérol (■), de consommation des ions ammonium (□) et de production de spiramycine (●) en culture semi-continue sur un volume initial de 3 l de milieu synthétique contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et les ions ammonium à 20 mM respectivement comme sources de carbone et d'azote avec une alimentation continue composée de 25 g. l⁻¹ et 100 mM d'ammonium à débit constant de 27 ml. h⁻¹.

DISCUSSION

Les semi-continus décrits ont été réalisés sur le milieu synthétique de base initial qui contient en plus de tous les éléments décrits dans le chapitre "Matériels et méthodes", 10 g. l⁻¹ de glycérol et 20 mM d'ammonium. Les différents milieux d'alimentation fournissent du glycérol et de l'ammonium de sorte que l'apport du glycérol permette une vitesse spécifique de consommation du glycérol au départ (q_{gly}) de 0,1 g. h⁻¹. g⁻¹MS. Ils diffèrent par leur teneur en azote de sorte que le rapport azote/carbone des différentes alimentations simulent des conditions d'excès, de limitation en azote et des conditions plus équilibrées.

La comparaison des quotients métaboliques de consommation des sources carbonée et azotée au moment de la synthèse de la spiramycine obtenues dans les différentes fermentations, le taux de croissance au début de la production ainsi que les vitesses spécifiques maximales de production de la spiramycine pourraient nous renseigner sur les paramètres clés qui permettent de déclencher la biosynthèse de la spiramycine.

Sur l'ensemble des expériences, il apparaît que la synthèse de spiramycine est fonction d'un paramètre important combinant les vitesses spécifiques de consommation du glycérol et des ions ammonium : le rapport $Y_{azote/carbone}$. D'après nos expériences les conditions favorisant la production de la spiramycine correspondent à un rapport $Y_{azote/carbone}$ de l'ordre de 2,6 mmol. g⁻¹. C'est le rapport carbone/azote qui doit être judicieusement choisi pour améliorer la production de spiramycine et non pas la concentration d'un des substrats indépendamment de l'autre. Nos résultats suggèrent que le rapport des vitesses spécifiques de consommation des substrats azotés et carbonés joue certes un rôle primordial dans l'initiation de la production de spiramycine, mais aussi que la concentration des ions ammonium présente dans le milieu de culture au moment de la production influence considérablement la vitesse spécifique maximale de production de spiramycine. En effet les rapports $Y_{azote/carbone}$ sont relativement proches dans les différentes conditions de fermentations semi-continues réalisées dans ce travail, cependant le meilleur quotient métabolique de production de spiramycine a été obtenu lorsque les ions ammonium sont présents à une concentration très faible (0,3 mM). L'excès d'ammonium (32 mM), observé lors du premier semi-continu, ainsi que la trop forte limitation obtenue avec le second semi-continu conduisent à des vitesses spécifiques de production plus faibles.

Un taux de croissance faible semble également constituer un facteur essentiel. Nos résultats ne précisent pas clairement l'influence de ce paramètre étant donné que des vitesses spécifiques maximales de production de spiramycine de 0,5, 1,5, et 3 mg. h⁻¹. g⁻¹ MS ont été obtenues avec des taux de croissance respectifs de 0,01, 0,035 et 0,005 h⁻¹.

Les résultats présentés dans cette partie illustrent bien que la productivité d'une fermentation d'antibiotiques peut être considérablement améliorée par des manipulations environnementales. Des conditions favorisant l'obtention de vitesses élevées de biosynthèse de la spiramycine peuvent se produire grâce à une alimentation équilibrée des nutriments clés

de la fermentation de spiramycine et en évitant l'effet inhibiteur des substrats rapidement assimilables. Le rapport $Y_{\text{azote/carbone}}$ semble avoir une influence sur la productivité de la spiramycine. Quand l'alimentation en chlorure d'ammonium du milieu de culture est contrôlée, la production de spiramycine est augmentée. En plus du rôle régulateur, la source azotée semble nécessaire pour la biosynthèse. Lorsque l'ammonium est trop limitant dans le milieu, la production de spiramycine est réduite alors qu'une alimentation à concentration appropriée en ammonium améliore la production. Il est possible qu'une source d'azote soit nécessaire pour la biosynthèse de la spiramycine puisque cet antibiotique contient deux sucres aminés. Dans une situation analogue Pirt et Righelato (1967) ont montré que bien que la production de pénicilline soit sensible à la répression catabolique par le glucose, ce substrat est indispensable à la fois en tant que source énergétique et source biosynthétique.

En conclusion l'augmentation de production de spiramycine en réponse à une alimentation contrôlée du chlorure d'ammonium confirme l'effet négatif des ions ammonium, quand ils sont en excès, sur la biosynthèse de la spiramycine.

La chute brusque de la vitesse spécifique de production de spiramycine pourrait être due à un manque d'éléments nutritifs, en particulier les sources carbonée et azotée, dans le milieu de culture. Dans ce cas le phénomène serait réversible et il serait possible de maintenir à un niveau élevé q_{spira} . Un pulse de glycérol et d'ammonium, apportés avec un rapport approprié ($Y_{\text{azote/carbone}} = 2,6$ par exemple), effectué lorsque le quotient métabolique de la spiramycine est maximum, aurait pu permettre de vérifier cette hypothèse.

Pour obtenir des améliorations plus avantageuses, en particulier un maintien durable à une valeur élevée de la vitesse de production de tylosine par *S. fradiae*, Gray et Vu-Trong (1987) ont appliqué des alimentations cycliques d'un milieu contenant du glutamate, du glucose et du méthyloléate à des cultures fed-batch.

PARTIE
III. 4

REGULATION PAR LES SOURCES
AZOTEES ET CARBONEES DE DEUX
ENZYMES DU CATABOLISME DE LA
VALINE :

LA VALINE DESHYDROGENASE
ET LA CETOISOVALERATE
DESHYDROGENASE

INTRODUCTION

La synthèse des antibiotiques macrolides est inhibée par de fortes concentrations d'ions ammonium et stimulée par le catabolisme de certains acides aminés. Ceci a été démontré pour les macrolides à 14-membres, l'érythromycine (Flores et Sanchez, 1985) et à 16-membres, la leucomycine (Omura *et al.*, 1980a), la tylosine (Omura *et al.*, 1984a et 1984b) et la spiramycine (Lebrihi *et al.*, 1992). Le catabolisme de la valine, de la leucine et de l'isoleucine a été étudié en partie chez *S. fradiae* (Omura et Tanaka, 1986a) et chez *S. ambofaciens* (Lebrihi *et al.*, 1992). Les ions ammonium suppriment la biosynthèse de l'aglycone de la tylosine et de la spiramycine par interférence avec le catabolisme de la valine (Omura *et al.*, 1983b). La synthèse de la valine déshydrogénase est réprimée en présence d'un excès d'ions ammonium. Nous avons choisi de préciser quelque peu la régulation du catabolisme de la valine chez *S. ambofaciens*.

La valine déshydrogénase est la première enzyme mise en oeuvre dans la voie du catabolisme de la valine (Fig. III. 4. 1). Elle conduit à la production d'ammonium et d' α -cétoisovalérate. Cette désamination oxydative confère à la valine son rôle de source d'azote. Les étapes ultérieures permettent de cataboliser l' α -cétoisovalérate jusqu'au succinyl-CoA alimentant le cycle de Krebs. L' α -cétoisovalérate peut donc jouer le rôle de source de carbone et d'énergie. Il a été suggéré que l'isobutyryl-CoA produit par déshydrogénation de l' α -cétoisovalérate pouvait être isomérisé en butyryl-CoA (Reynolds *et al.*, 1988 ; Rezanka *et al.*, 1991).

Ce catabolisme de la valine peut permettre de fournir à la cellule les principaux intermédiaires précurseurs de la synthèse de la partie aglycone des macrolides.

Le méthylmalonyl-CoA est formé par carboxylation du propionyl-CoA. Cette réaction enzymatique est incluse dans la chaîne des réactions du catabolisme de la valine.

L'éthylmalonyl-CoA pourrait être produit par carboxylation du butyryl-CoA.

Le malonyl-CoA ne semble pas directement lié au catabolisme de la valine. Chez *S. ambofaciens*, Laakel (1992) a 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. Un modèle a été proposé concernant les différentes voies de formation du malonyl-CoA (Fig. III. 4. 2). Cultivée 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. Sur milieu valine, un effet régulateur positif de cet acide aminé semble s'exercer à la fois sur la voie pyruvate-acétyl-CoA et la production de spiramycine.

L'acétyl-CoA, précurseur du malonyl-CoA pourrait être obtenu à partir du butyryl-CoA, cette production étant directement liée au catabolisme de la valine. Elle pourrait également être

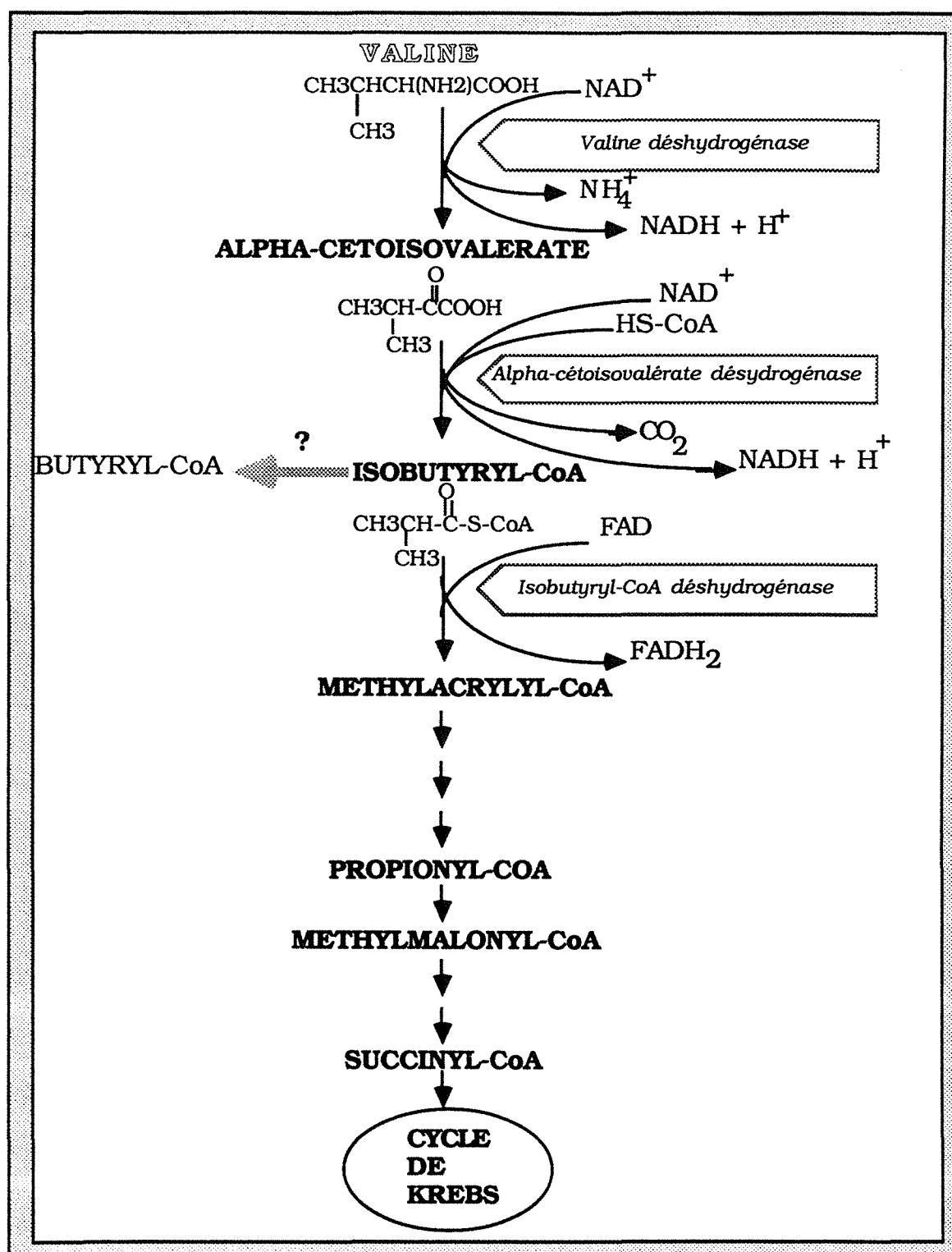


Fig. III. 4. 1 : Voie simplifiée du catabolisme de la valine



obtenue indirectement via le succinyl-CoA qui en alimentant le cycle de Krebs permettrait une relative accumulation d'acétyl-CoA provenant de la dégradation d'autres sources de carbone et d'énergie.

Le catabolisme de la valine pourrait également favoriser la production de malonyl-CoA à partir d'oxaloacétate, celui-ci étant produit à partir du succinyl-CoA.

Les travaux antérieurs sur l'effet de la valine ont montré que cet acide aminé favorisait la biosynthèse de la spiramycine et de la tylosine alors que les ions ammonium la défavorisaient. En effet une addition d'ammonium abaisse la production. Inversement un ajout de valine sur un milieu excédentaire en ammonium n'améliore pas la production (Lamsaïf, 1992). Par contre l'addition d'intermédiaires du catabolisme de la valine tels que l'isobutyrate ou le mélange isobutyrate, cétoisovalérate, restaure la production, même en excès d'ammonium (Omura *et al.*, 1984a et 1984b ; Lebrihi *et al.*, 1992). Ces résultats indiquent que les ions ammonium agissent principalement dans la partie amont du catabolisme de la valine. La valine déshydrogénase est l'un des sites d'action des ions ammonium.

L'analyse des cinétiques de production et d'assimilation des intermédiaires du catabolisme de la valine (acétate, isobutyrate) au cours de différentes conditions de fermentation utilisant différentes sources d'azote et de carbone amène à se poser la question sur d'éventuelles régulations des enzymes du catabolisme de la valine par les sources azotées (ions ammonium, valine) et carbonées (dextrines, glycérol). Pour cela deux enzymes ont été étudiées :

- La VDH (valine déshydrogénase) grâce à laquelle la valine fournit l'azote nécessaire à la cellule.
- La CIVDH (α -cétoisovalérate déshydrogénase) première enzyme qui engage la valine en tant que source de carbone et d'énergie et source de précurseurs de l'aglycone.

Toutes les expériences qui seront présentées ci-dessous ont été effectuées sur le milieu synthétique de base décrit dans le chapitre "Matériels et méthodes § I. 4. 2. 2". Les sources carbonées et azotées varient en fonction du but de la manipulation.

RESULTATS

1. Effets des sources azotées sur la croissance et la production de spiramycine

Deux sources azotées, valine et NH_4Cl (50 mM) avec les dextrines (30 g. l⁻¹) comme seule source de carbone ont été testées pour la croissance de *S. ambofaciens* et la production de la spiramycine.

Dans ces conditions la croissance est limitée par la concentration de la source azotée (50 mM). *S. ambofaciens* croît plus rapidement sur NH_4Cl ($\mu_{\text{max}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$) que sur valine ($\mu_{\text{max}} = 0,033 \text{ h}^{-1}$). Les dextrines sont consommées à une vitesse spécifique plus élevée sur NH_4Cl ($q_{\text{dex}} = 0,18 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) que sur valine ($q_{\text{dex}} = 0,09 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$).

En présence de la valine, la biosynthèse de la spiramycine commence après 86 h de fermentation ; le maximum de production de spiramycine est atteint après 144 h avec un rendement maximum (Y_{spira}) de 17 mg. g⁻¹ MS et une production volumétrique finale de 120 mg. l⁻¹. La vitesse spécifique de consommation de la valine (q_{val}) est de 0,2 mmol. h⁻¹.

g⁻¹MS. Nous observons la production de 1,2 g. l⁻¹ d'acétate et de 3 g. l⁻¹ d'isobutyrate, réassimilés par la suite (Fig. III. 4. 3). La vitesse spécifique de production de l'isobutyrate est de 0,2 mmol. h⁻¹. g⁻¹ MS et le rendement ($Y_{\text{iso/val}}$) est de 0,7 mol. mol⁻¹.

En présence de NH_4Cl , la biosynthèse de la spiramycine commence après 56 h de fermentation ; le maximum de production de spiramycine est atteint après 72 h avec un rendement maximum de 10 mg. g⁻¹MS et une production volumétrique finale de 70 mg. l⁻¹ de spiramycine. La vitesse spécifique de consommation de NH_4Cl ($q_{\text{NH}_4\text{Cl}}$) est de 0,38 mmol. h⁻¹. g⁻¹MS (Fig. III. 4. 4).

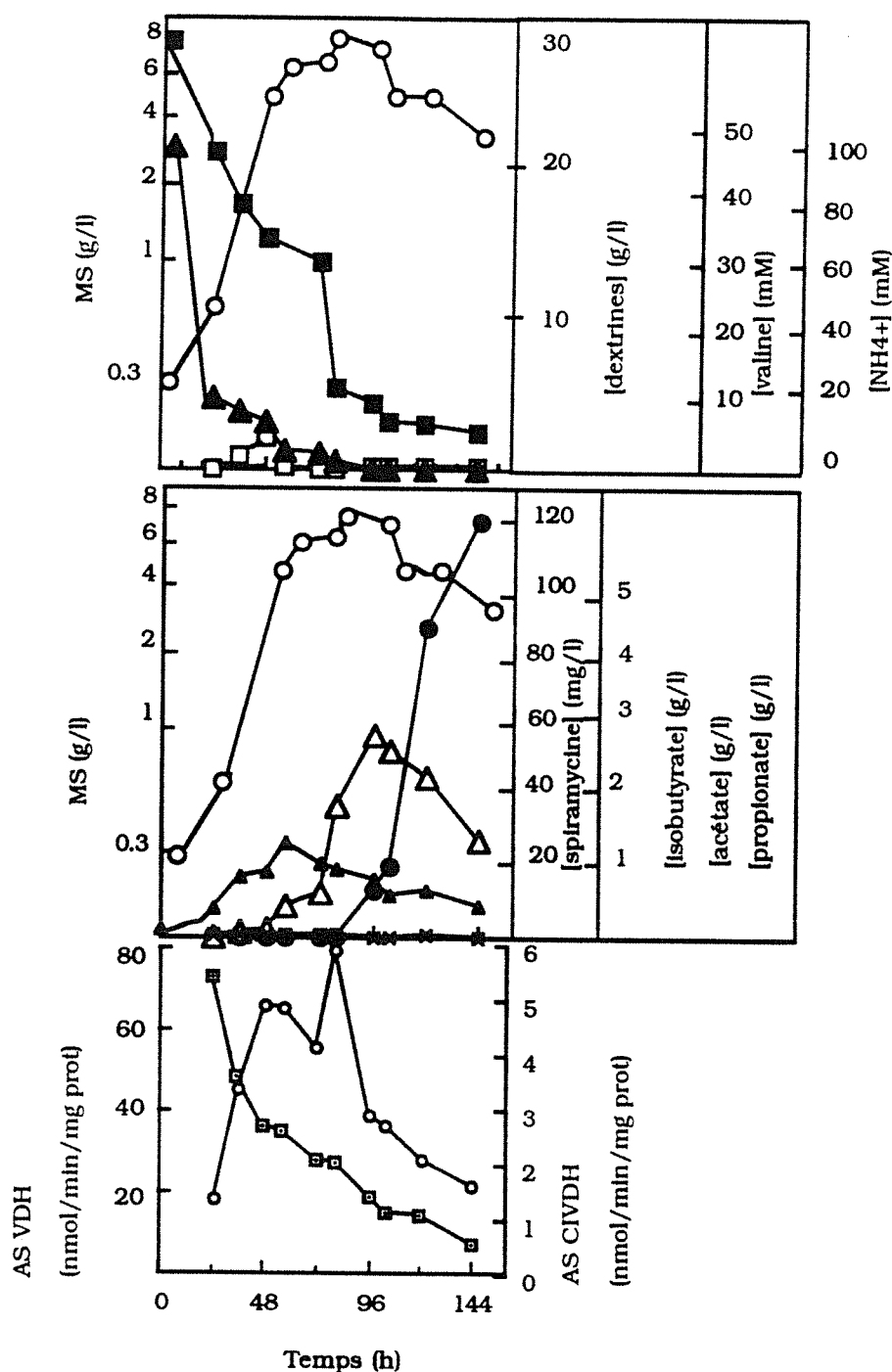


Fig. II. 4. 3. Effet de la valine et des dextrines sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation des dextrines (■), de consommation de la valine (▲), de production d'ammonium (□), de production de spiramycine (●), de production et de réassimilation d'acétate (▲) et d'isobutyrate (Δ), de biosynthèse de la VDH (◻) et de biosynthèse de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et de la valine à 50 mM.

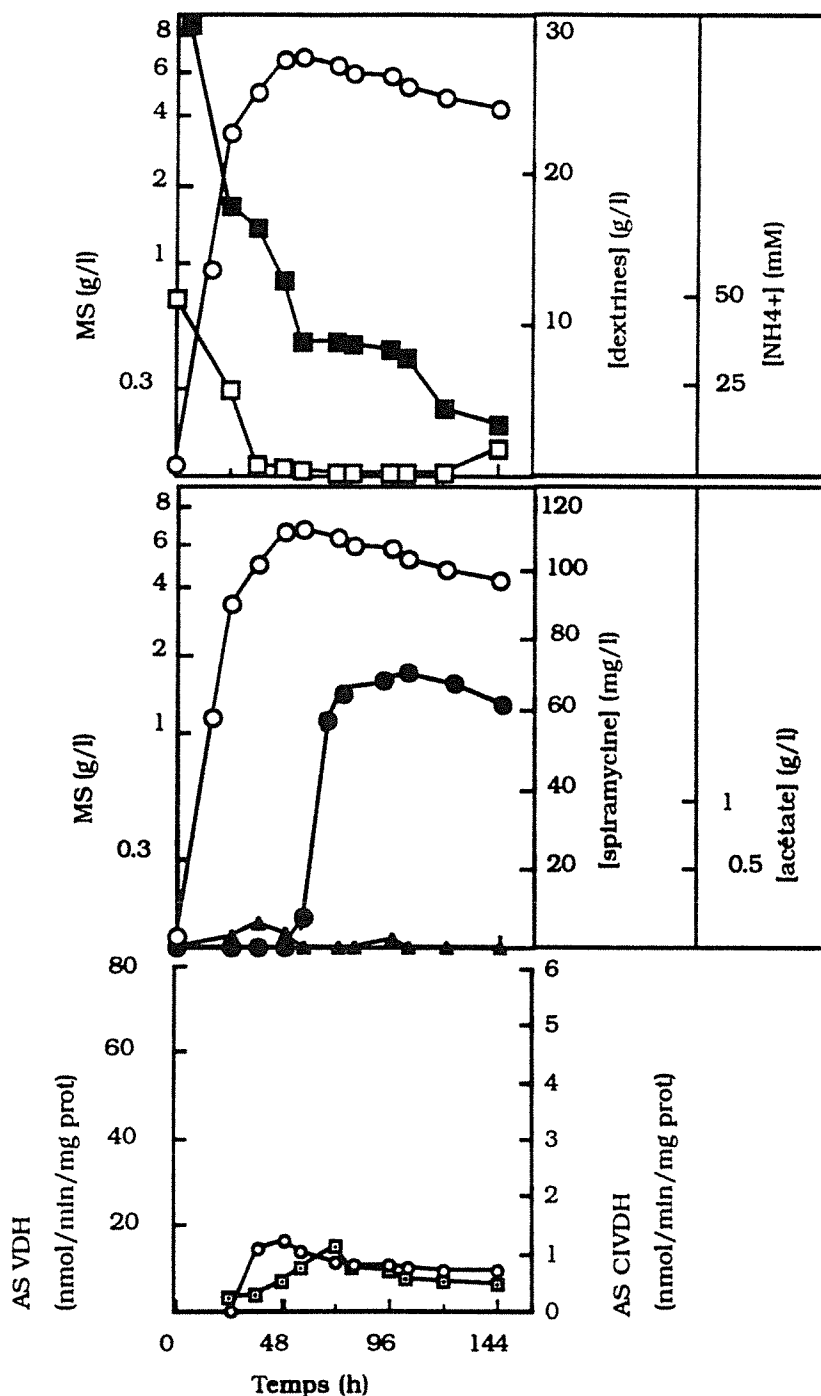


Fig. III. 4. 4. effet du chlorure d'ammonium et des dextrines sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation des dextrines (■), de consommation et de production d'ammonium (□), de production de spiramycine (●), de production et de réassimilation d'acétate (▲), de biosynthèse de la VDH (◻) et de biosynthèse de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et du NH₄Cl à 50 mM.

2. Effets des sources carbonées sur la croissance et la production de la spiramycine

Deux sources de carbone, les dextrines (30 g. l⁻¹) et le glycérol (10 g. l⁻¹) avec la valine à 50 mM comme seule source d'azote ont été testées pour la croissance de *S. ambofaciens* et la production de la spiramycine.

Dans ces conditions, la croissance est limitée par la concentration de la source azotée (valine 50 mM) (Fig. III. 4. 3 et III. 4. 5). *S. ambofaciens* croît plus rapidement sur le glycérol ($\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$) que sur les dextrines. La vitesse spécifique de consommation du glycérol est élevée ($q_{\text{gly}} = 0.15 \text{ g. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$). La valine est consommée plus rapidement sur glycérol ($q_{\text{val}} = 0,55 \text{ mmol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) que sur dextrines. L'apparition des deux acides gras à courtes chaînes : d'abord de l'acétate en phase de croissance puis de l'isobutyrate en phase de ralentissement suivie de leur réassimilation, s'observe avec les deux types de sources carbonées. Les vitesses spécifiques de production de l'isobutyrate sont respectivement de 0,07 et 0,2 mmol. h⁻¹ · g⁻¹MS sur glycérol et dextrines. Les rendements $Y_{\text{iso/val}}$ sont respectivement de 0,45 et 0,7 mol. mol⁻¹ sur glycérol et dextrines. L'excrétion de 20 mM d'ions ammonium en fin de fermentation est observée seulement quand le glycérol est source de carbone. En présence du glycérol, la biosynthèse de la spiramycine commence après 96 h de fermentation ; le maximum de production de spiramycine est atteint à 120 h avec une production volumétrique maximale de 50 mg. l⁻¹ et un rendement maximum de 8 mg. g⁻¹MS (50% de moins que sur dextrines).

3. Effets des sources azotées sur les biosynthèses de la VDH et de la CIVDH

Les cinétiques de biosynthèse de la VDH et de la CIVDH ont été déterminées sur des fermentations avec 50 mM de valine ou d'ammonium et 30 g. l⁻¹ de dextrines (Fig. III. 4. 3 et III. 4. 4).

En présence de valine (Fig. III. 4. 3), l'activité spécifique (AS) VDH est relativement élevée à 24 h de fermentation (78 nmol. min⁻¹ · mg⁻¹prot). Dès la phase de ralentissement, l'AS VDH chute (60% en deux jours). La CIVDH est synthétisée en phase exponentielle de croissance, atteignant une AS_{max} de 5 nmol. min⁻¹ · mg⁻¹prot à 48 h et en début de phase stationnaire avec une AS_{max} de 6 nmol. min⁻¹ · mg⁻¹prot à 80 h de fermentation (Fig. III. 4. 3).

En présence d'ammonium, la VDH ainsi que la CIVDH sont présentes à un niveau de base correspondant respectivement à 15 nmol. min⁻¹ · mg⁻¹prot et 1 nmol. min⁻¹ · mg⁻¹prot (Fig. III. 4. 4).

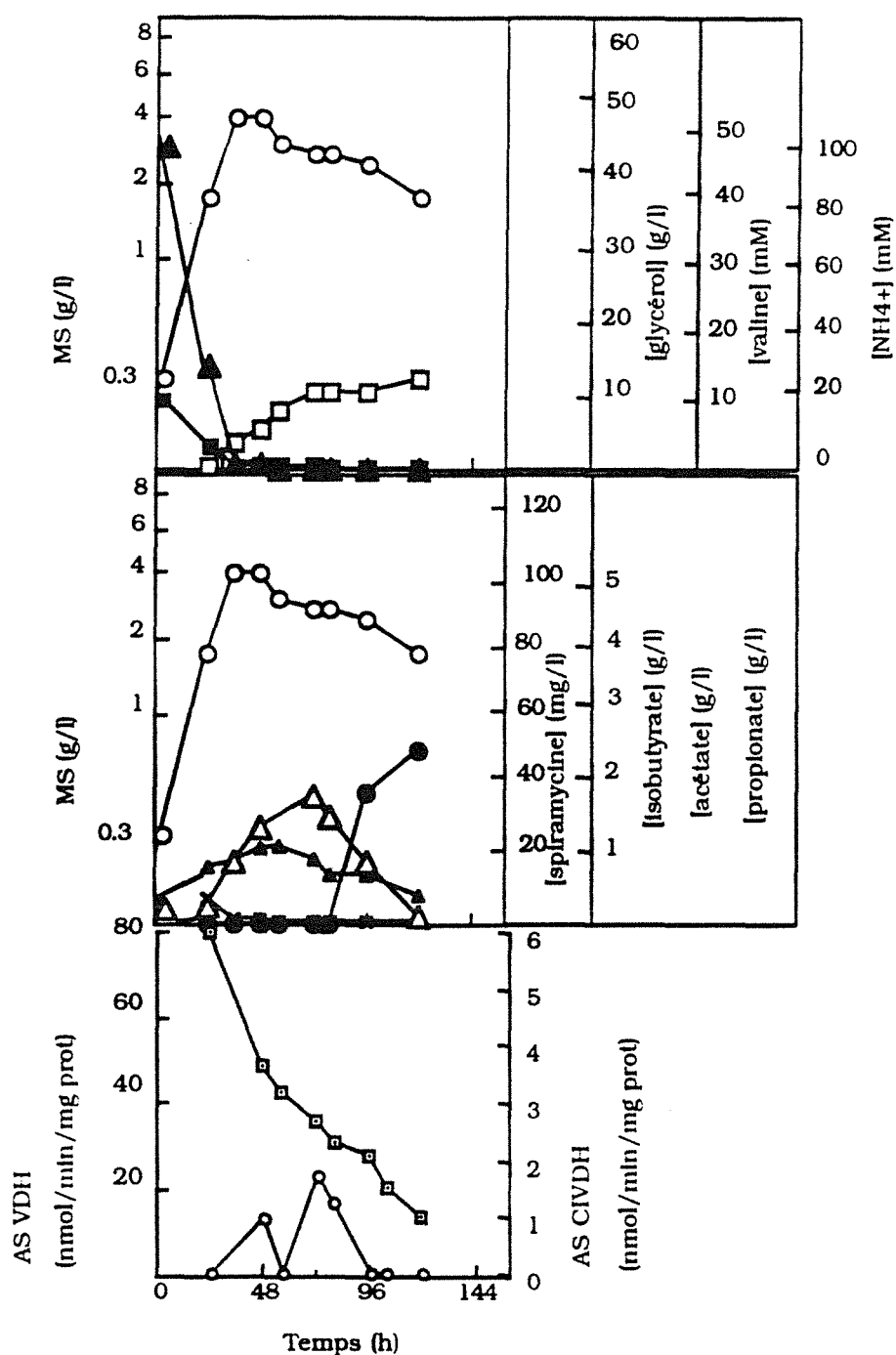


Fig. III. 4. 5. Effet de la valine et du glycérol sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation de glycérol (■), de consommation de la valine (▲), de production d'ammonium (□), de production de spiramycine (●), de production et de réassimilation d'acétate (▲), d'isobutyrate (Δ) et de propionate (x) et de biosynthèse de la VDH (▣) et de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant du glycérol à 10 g. l⁻¹ et de la valine à 50 mM.

La VDH est synthétisée très tôt en début de phase de croissance. La synthèse de la CIVDH a lieu pendant la phase de croissance. Pendant cette phase, sa synthèse se poursuit plus longtemps que celle de la VDH.

4. Effets des sources carbonées sur les biosynthèses de la VDH et de la CIVDH

Les cinétiques de biosynthèse de la VDH et de la CIVDH ont été mesurées dans les fermentations avec 30 g. l⁻¹ de dextrines ou 10 g. l⁻¹ de glycérol et 50 mM de valine comme source azotée.

Quelle que soit la source carbonée, dextrines ou glycérol, l'activité spécifique de la VDH est détectée pendant la phase exponentielle de croissance et atteint environ 80 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot à 24 h (Fig. III. 4. 5). En début de phase stationnaire, la VDH perd 60% de son activité en deux jours (Fig. III. 4. 3 et III. 4. 5).

Deux pics d'activité spécifique de la CIVDH ont été détectés, aussi bien sur les dextrines que sur le glycérol, l'un en phase exponentielle de croissance et l'autre en phase de production de l'antibiotique. En présence des dextrines, la CIVDH montre une activité spécifique qui atteint d'abord un maximum (5 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot) en phase exponentielle de croissance puis un autre maximum est détecté à 80 h (6 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot). En présence du glycérol, la CIVDH montre un premier pic d'activité spécifique, avec un maximum à 48 h (1 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot) et un second pic avec un maximum à 72 h (2 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot) (Fig. III. 4. 5).

Sur dextrines comme sur glycérol, la synthèse de la VDH est très active en tout début de croissance, la synthèse de la CIVDH est active pendant toute la durée de la multiplication cellulaire.

Remarques

- Sur le milieu synthétique de base avec le glycérol 10 g. l⁻¹ comme seule source de carbone et les ions ammonium 50 mM comme seule source d'azote, la production de la spiramycine est nulle et on ne détecte aucune activité VDH ou CIVDH (Fig. III. 4. 6).

- Effets de la concentration des ions ammonium et du glycérol sur l'AS VDH

Afin de déterminer si le glycérol et les ions ammonium agissent sur l'activité de la VDH en tant qu'inhibiteur, différentes concentrations de glycérol (jusqu'à 500 g. l⁻¹) et d'ammonium (jusqu'à 500 mM) ont été ajoutées dans l'essai enzymatique avant incubation (Fig. III. 4. 7).

L'ajout de glycérol jusqu'à 20 g. l^{-1} a un effet activateur sur la réaction VDH. Ceci confirme le fait que le glycérol puisse être utilisé comme agent stabilisateur de l'activité VDH. Par contre au delà de cette concentration, le glycérol a un effet inhibiteur. L'addition de 500 g. l^{-1} fait chuter l'AS VDH de 86%.

Les ions ammonium ont un effet inhibiteur sur la réaction VDH. L'addition de 500 mM d'ammonium fait chuter l'AS VDH de 86%.

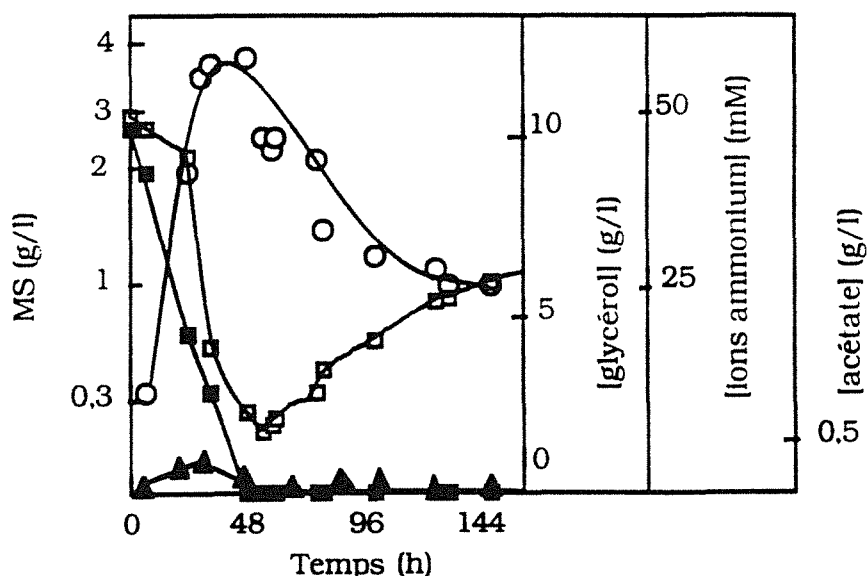


Fig. III. 4. 6. Effet du chlorure d'ammonium et du glycérol sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation de glycérol (■), de consommation et de production d'ammonium (□), de production et de réassimilation d'acétate (▲) sur milieu synthétique de base contenant du glycérol à 10 g. l^{-1} et du NH_4Cl à 50 mM .

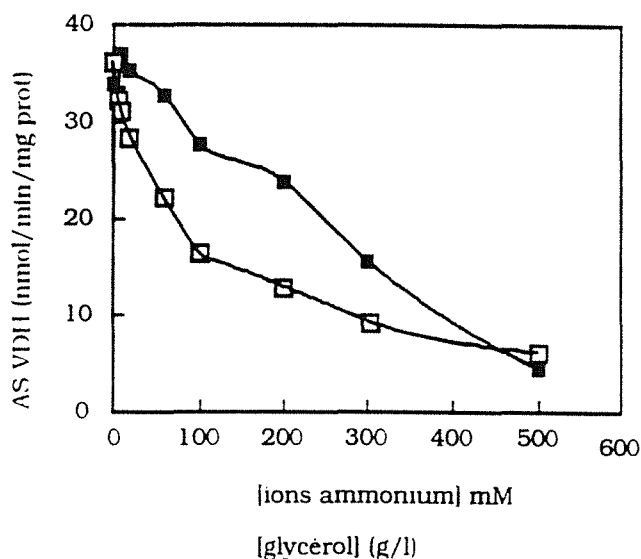


Fig. III. 4. 7. Effet des différentes concentrations d'ions ammonium et de glycérol sur la réaction VDH.

ions ammonium : (□), glycérol : (■)

DISCUSSION

Ces études comparatives des effets de deux sources d'azote (ions ammonium et valine) et de deux sources de carbone (glycérol et dextrines) confirment des résultats déjà connus. La biosynthèse de la spiramycine est favorisée avec la valine comme source d'azote plutôt qu'avec l'ammonium, dans cette gamme de concentrations. Les sources carbonées facilement assimilables permettent une bonne croissance microbienne mais conduisent à des rendements faibles en antibiotiques. Ces études font apparaître également sur valine l'excrétion d'acétate et d'isobutyrate qui sont réassimilés ultérieurement, ce qui démontre la mise en oeuvre du catabolisme de la valine pour fournir des précurseurs de la synthèse de l'aglycone. Le dosage des deux activités enzymatiques VDH et CIVDH rendent compte de leur rôle dans le catabolisme de la valine. En effet les activités spécifiques VDH et CIVDH ne sont présentes qu'à un niveau de base très faible avec les ions ammonium alors qu'elles peuvent être fortement induites en présence de valine comme unique source d'azote : induction de la VDH quelle que soit la source de carbone et d'énergie, induction de la CIVDH dépendant de la source de carbone et d'énergie.

La biosynthèse de ces enzymes semble être régulée différemment sur glycérol ou sur dextrines. La VDH est synthétisée très rapidement en début de croissance de manière sensiblement identique sur dextrines ou glycérol ($80 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Quelle que soit la source d'énergie et de carbone cette activité est nécessaire pour fournir l'azote à la cellule. Par contre les cinétiques d'AS CIVDH sont très différentes sur glycérol et dextrines. La biosynthèse de la CIVDH a été réprimée sévèrement en présence de glycérol $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Les activités spécifiques maximales de la CIVDH détectées en phase de croissance et de production ont été réduites respectivement de 80 et 70% par comparaison à la culture sur dextrines. Sur dextrines, il y a une très forte induction de la synthèse de la CIVDH pendant toute la phase de croissance. Sur glycérol la synthèse pendant la phase de croissance ne dépasse pas le niveau de base mesuré en absence de valine. Toutefois, sur glycérol, une faible synthèse de la CIVDH s'observe en début de phase stationnaire après utilisation du glycérol. Il semble que le catabolisme du glycérol réprime la synthèse de la CIVDH permettant au cétoisovalérate de servir de source de carbone et d'énergie. Néanmoins, sur milieu glycérol, on observe une accumulation intermédiaire d'isobutyrate, ce qui laisse supposer une activité de base de la CIVDH.

Afin de préciser ces phénomènes, des pulses d'ammonium, de valine et de glycérol ont été effectués, et leur influence sur la production de la spiramycine et la biosynthèse de la VDH et de la CIVDH a été déterminée.

5. Effets des pulses d'ammonium et de valine sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH

Les effets de la valine et de l'ammonium sur la spiramycine et la biosynthèse de la VDH et de la CIVDH ont été déterminés par deux expériences ; dans la première, la fermentation est commencée sur milieu synthétique de base avec de la valine (50 mM) et des dextrines à 30 g. l⁻¹. Un pulse de 100 mM de NH₄Cl, après 12 h de culture, est réalisé (Fig. III. 4. 8).

La seconde a consisté en un pulse de valine (50 mM) après 12 h de culture sur une fermentation ayant commencé sur milieu synthétique de base avec 50 mM de NH₄Cl et 30 g. l⁻¹ de dextrines (Fig. III. 4. 9).

Dans la première expérience, le pulse d'ammonium provoque une importante augmentation de la croissance ($\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$). La vitesse spécifique de consommation des dextrines est augmentée jusqu' à atteindre celle obtenue sur NH₄Cl ($q_{\text{dex}} = 0,2 \text{ g. h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$). La vitesse spécifique de consommation de la valine (q_{val}) est de $0,45 \text{ mmol. h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$. L'isobutyrate est produit avec une vitesse spécifique de $0,5 \text{ mmol. h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$ et un rendement Y_{iso/val} de $0,45 \text{ mol. mol}^{-1}$. L'ammonium ajouté 12 h après le début de la fermentation est utilisé jusqu'à ce qu'il ne reste que 40 mM avec une vitesse spécifique de consommation de $0,54 \text{ mmol. h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$. Il n'y a pas eu de production de spiramycine durant cette fermentation. Le maximum d'activité spécifique de la VDH à 36 h est de $50 \text{ nmol. min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ (37% moindre que l'AS obtenue sur valine 50 mM comme seule source d'azote) (Fig. III. 4. 8). Pour la CIVDH, deux pics d'activité apparaissent, 24 h plus tôt que lorsque la valine est utilisée comme seule source d'azote. Le maximum d'activité détectée en phase de croissance est de $5,5 \text{ nmol. min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$. Le maximum d'activité mesurée en début de phase stationnaire est de $4 \text{ nmol. min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ (33% plus faible que l'AS_{max} obtenue quand la valine à 50 mM est source unique d'azote) (Fig. III. 4. 8).

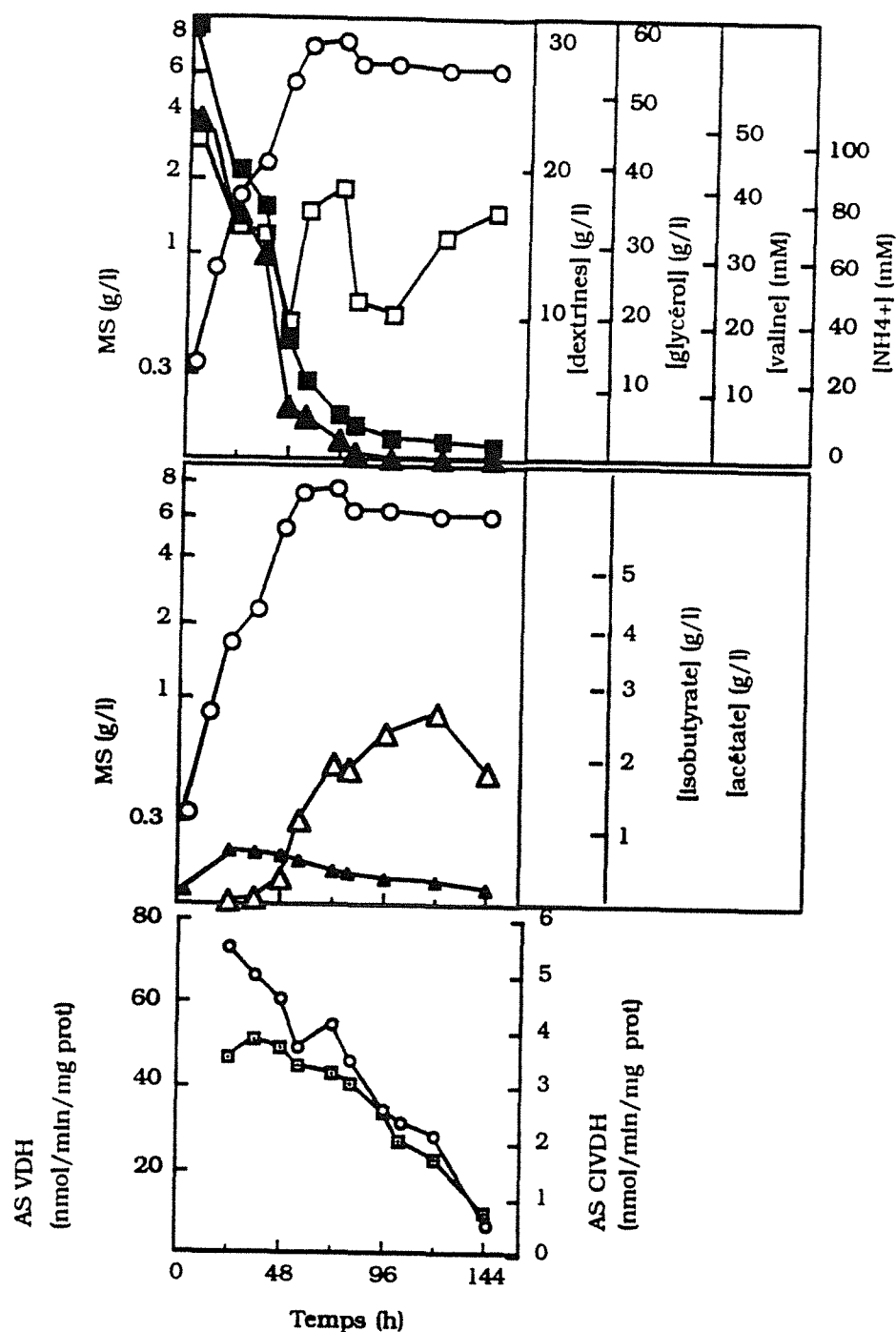


Fig. III. 4. 8. Effet du pulse d'ammonium sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation des dextrines (■), de consommation de la valine (▲), de consommation et de production d'ammonium (□), de production et de réassimilation d'acétate (▲) et d'isobutyrate (Δ) et de biosynthèse de la VDH (◻) et de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et de la valine à 50 mM avec un pulse d'ammonium de 100 mM à 12 h de fermentation.

Dans la seconde expérience, la vitesse de croissance est imposée par les ions ammonium et donc elle est plus élevée que sur valine seule ($\mu_{\max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$) (Fig. III. 4. 9). La vitesse spécifique de consommation des dextrines est plus élevée ($q_{\text{dex}} = 0,15 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$). La valine ajoutée 12 h après le début de la fermentation est totalement utilisée après 72 h et la vitesse spécifique de consommation de la valine est de $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$. L'isobutyrate est produit avec une vitesse spécifique très faible ($0,02 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) et le rendement $Y_{\text{iso/val}}$ est également faible ($0,06 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$). 70 mM d'ammonium ont été détectés à la fin de la fermentation.

Avec ce pulse de valine, la production de spiramycine commence après 96 h, le maximum de production est atteint après 120 h avec une production spécifique de $13,4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$ et une production volumétrique de $85 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de spiramycine.

L'activité VDH ($50 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{prot}$) est stimulée par l'addition de valine (50 mM) quand elle est comparée avec le niveau obtenu sur NH_4Cl comme seule source d'azote mais elle n'atteint pas l'activité mesurée sur valine comme seule source d'azote (Fig. III. 4. 9). Le premier pic de l'AS CIVDH est stimulé jusqu'à atteindre ($6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{prot}$) alors que le second pic ne l'est pas ($1,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{prot}$) (Fig. III. 4. 9).

6. Effets du pulse de glycérol sur la croissance et les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH

Les effets du glycérol sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH ont été déterminés dans une fermentation ayant commencé sur milieu synthétique de base avec des dextrines à $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ comme source de carbone et de la valine (50 mM) comme source d'azote. Un pulse de glycérol ($60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a été effectué au temps 12 h (Fig. III. 4. 10).

Le pulse de glycérol a provoqué une importante augmentation dans la croissance ($\mu_{\max} = 0,05 \text{ h}^{-1}$). La vitesse spécifique de consommation de la valine ($q_{\text{val}} = 0,33 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) a été augmentée. Par contre les vitesses spécifiques de consommation du glycérol ($q_{\text{gly}} = 0,08 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) ainsi que celle des dextrines ($q_{\text{dex}} = 0,064 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$) sont toutes les deux plus faibles que celles obtenues sur dextrines à $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ et valine à 50 mM respectivement comme seules sources de carbone et d'azote. Les deux sources carbonées sont utilisées simultanément. La biosynthèse de la spiramycine a été supprimée. Le pulse de glycérol provoque l'excrétion de $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ d'acétate et de $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de propionate qui sont réassimilés presque complètement. L'isobutyrate est produit avec une vitesse spécifique de $0,07 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$ et un rendement $Y_{\text{iso/val}}$ de $0,96 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, mais il n'est pas reconsommé (Fig. III. 4. 10).

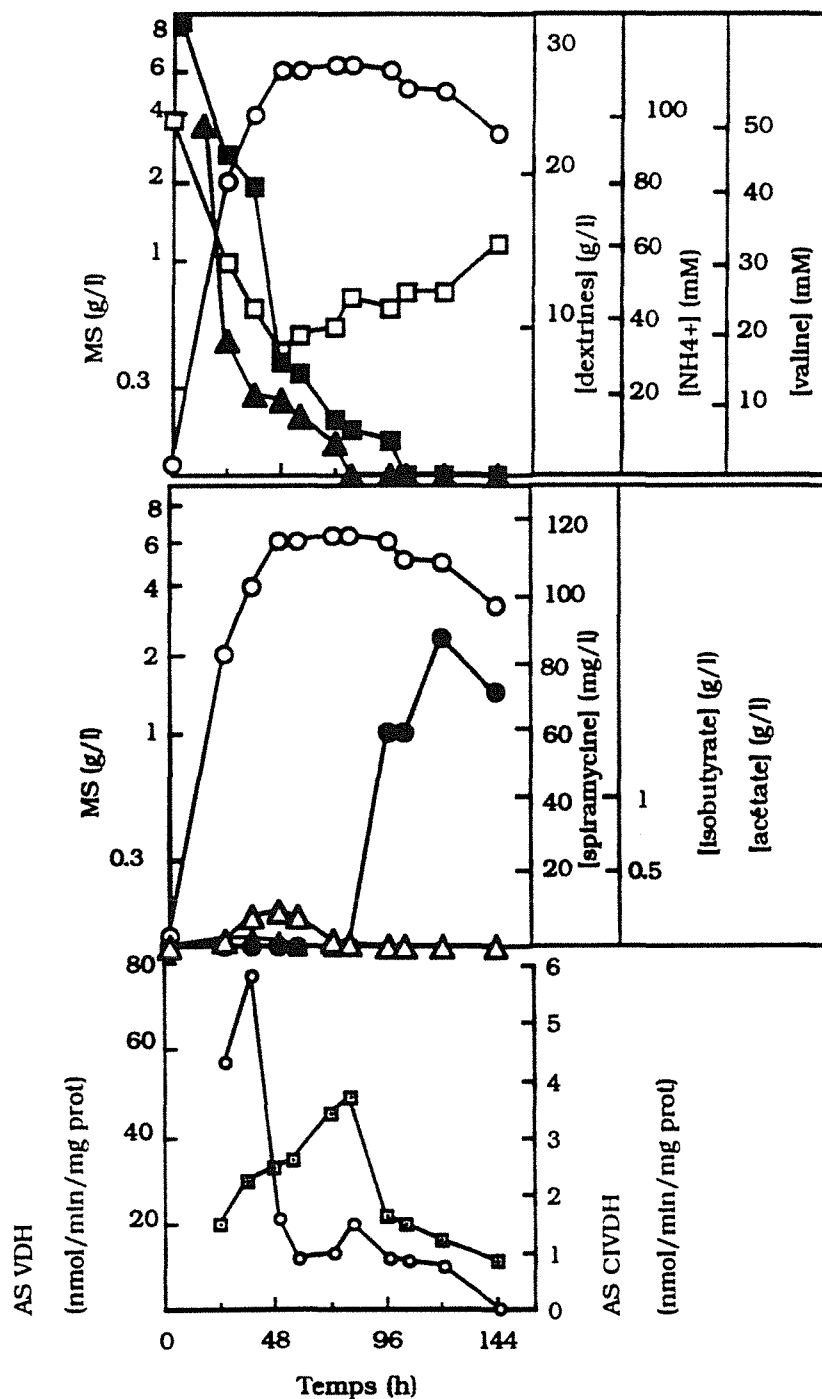


Fig. III. 4. 9. *Effet du pulse de valine sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.*

Cinétiques de croissance (O), de consommation des dextrines (■), de consommation de la valine (▲), de production d'ammonium (□), de production de spiramycine (●), de production et de réassimilation d'acétate (▲) et d'isobutyrate (Δ) et de biosynthèse de la VDH (▣) et de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et NH₄Cl à 50 mM avec un pulse de valine de 50 mM à 12 h de fermentation.

L'AS VDH a été réduite de 40% quand on la compare avec l'AS VDH mesurée sur dextrines ou glycérol comme seule source de carbone (Fig. III. 4. 10).

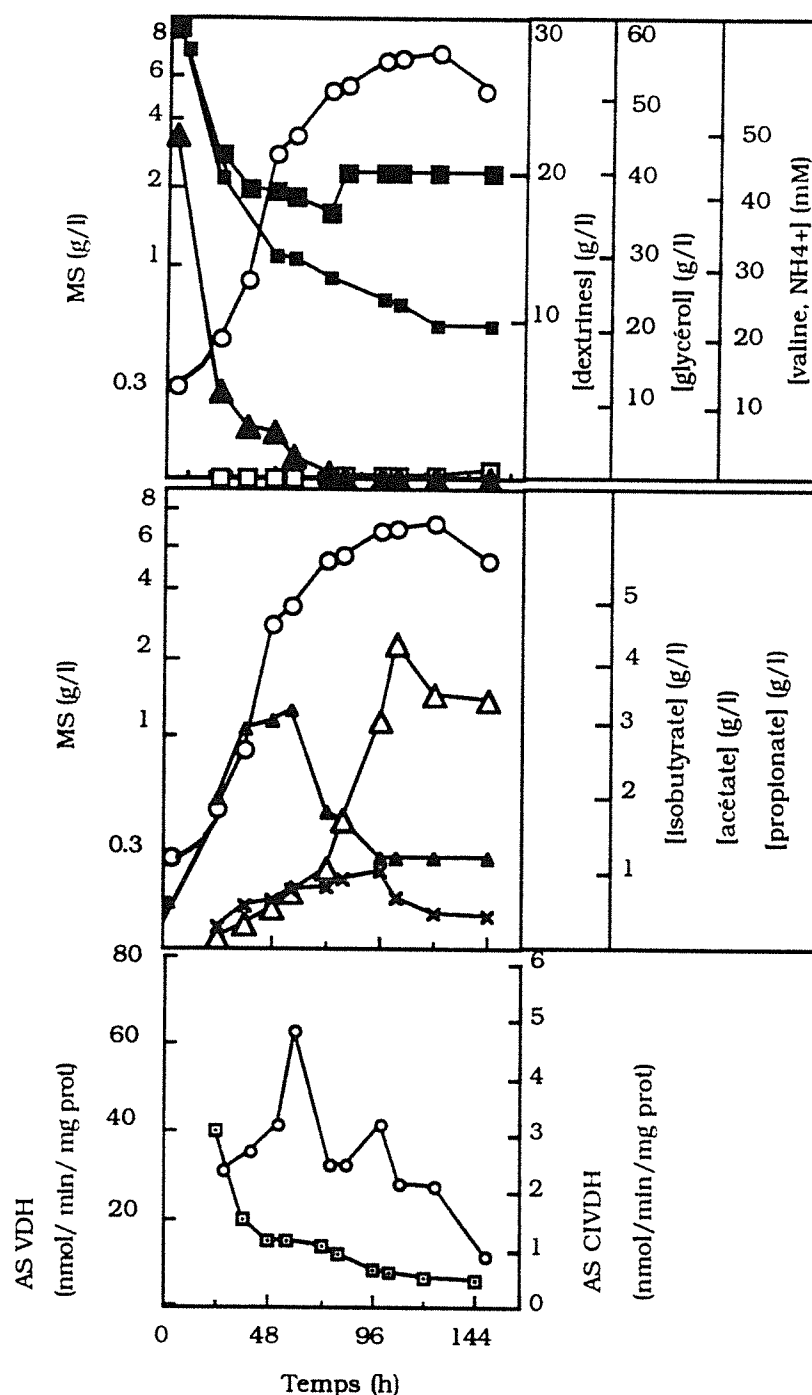


Fig. III. 4. 10. Effet du pulse de glycérol sur les biosynthèses de la spiramycine, de la VDH et de la CIVDH.

Cinétiques de croissance (O), de consommation des dextrines (■), de consommation de glycérol (■), de consommation de la valine (▲), de production d'ammonium (□), de production et de réassimilation d'acétate (▲), d'isobutyrate (Δ) et de propionate (x) et de biosynthèse de la VDH (□) et de la CIVDH (o) sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ et de la valine à 50 mM avec un pulse de glycérol de 60 g. l⁻¹ à 12 h de fermentation.

Cette chute semble significative car d'autres essais de pulses de glycérol dans des conditions ne variant que par la concentration des pulses du glycérol, ont permis de constater des abaissements de l'activité spécifique de la VDH en fonction de ces différentes concentrations : chute de 19, 28 et 40% respectivement avec du glycérol à 20, 40 et 60 g. l⁻¹ (Fig. III. 4. 11). La biosynthèse de la CIVDH montre la même évolution que sur dextrines ou glycérol comme seule source de carbone, mais le maximum d'AS du second pic a été diminué de 50% (3 nmol. min⁻¹. mg⁻¹prot) par le pulse de glycérol (Fig. III. 4. 10).

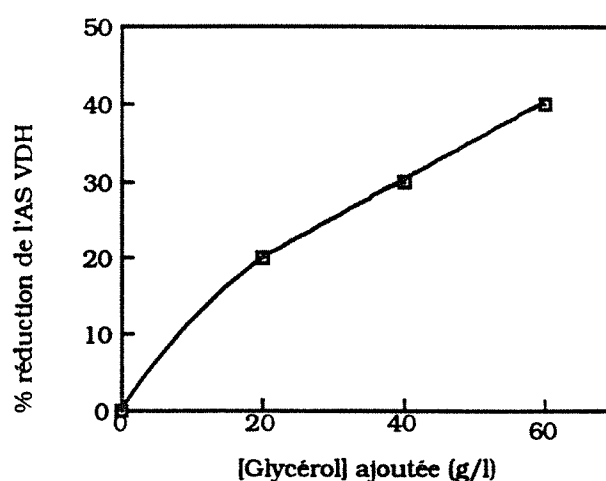


Fig. III. 4. 11. Effet sur la biosynthèse de la VDH des différentes concentrations de glycérol ajoutées à 12 h de fermentation sur milieu synthétique de base contenant des dextrines à 30 g. l⁻¹ comme source de carbone et de la valine à 50 mM comme source d'azote.

DISCUSSION

Le pulse d'ammonium provoque une augmentation du taux de croissance et la vitesse spécifique de consommation des dextrines. La valine et les ions ammonium sont utilisés simultanément. Dans ces conditions, la vitesse spécifique de consommation de la valine est plus importante que celle obtenue quand la valine est unique source d'azote. L'isobutyrate excrété est partiellement réassimilé alors qu'il est complètement reconsommé quand la valine est seule source d'azote, ce qui pourrait expliquer la suppression de la production de spiramycine. Ce pulse d'ammonium a un effet répresseur sur les enzymes du catabolisme de la valine ; l'AS VDH est réduite de 36% et l'AS CIVDH synthétisée en phase de production chute de 33%.

Le pulse de valine ne réduit pas la vitesse de consommation des ions ammonium et conduit à une excrétion très faible d'isobutyrate ($0,25 \text{ g. l}^{-1}$) qui est complètement réassimilé. Il améliore légèrement la production de spiramycine par rapport à la fermentation sur NH_4Cl comme seule source d'azote mais ne permet pas d'atteindre le rendement obtenu sur valine comme unique source d'azote.

La valine a un effet inducteur sur les enzymes du catabolisme de la valine. L'AS VDH, est augmentée de 70%. Celles de la CIVDH synthétisées en phase de croissance et de production sont augmentées respectivement de 80 et 47%. Le pulse de valine ne rétablit pas les 100% des AS car les ions ammonium sont utilisés comme source azotée et exercent un effet de répression partielle qui se manifeste toujours. De même, la production de spiramycine n'est pas complètement restaurée.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'un pulse de glycérol (60 g. l^{-1}) dans une fermentation qui a commencé sur dextrines (30 g. l^{-1}) après 12 h de culture, augmente le taux de croissance et la vitesse spécifique de consommation de la valine. Il y a une forte production d'isobutyrate ($q_{\text{isobutyrate}} = 0,07 \text{ mmol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$). Le rendement ($Y_{\text{iso/val}}$) est de $0,96 \text{ mol. mol}^{-1}$. Ce rapport indique que la quasi-totalité de la valine est transformée en isobutyrate. Ce dernier s'accumule sans être réassimilé. La production de spiramycine est supprimée. Ce pulse de glycérol réduit l'AS VDH (40%). L'ASmax du premier pic de la CIVDH n'est pas affectée mais l'ASmax du second pic est sévèrement réduite (50%).

DISCUSSION GENERALE

La régulation du catabolisme de la valine par les sources azotées et carbonées a été envisagée par l'étude de deux enzymes : la VDH qui fournit l'azote nécessaire à la cellule à partir de la valine, et la CIVDH qui engage le squelette carboné de la valine en tant que source de carbone, d'énergie et de précurseurs de l'aglycone.

En présence de valine, la VDH est induite quelle que soit la source de carbone. Par contre l'induction de la CIVDH dépend de la source de carbone et d'énergie. La CIVDH est réprimée en présence de glycérol, source carbonée rapidement assimilable.

Le pulse d'ammonium provoque une répression relativement faible de la VDH et de la CIVDH. Ces deux enzymes sont toujours fonctionnelles puisque nous avons une production d'isobutyrate. Le rapport $Y_{iso/val}$ de 0,45 mol. mol⁻¹ obtenu avec le pulse d'ammonium indique que l'isobutyrate est consommé. Les précurseurs de la partie aglycone de la spiramycine sont synthétisés, mais l'excès d'ammonium bloque la synthèse de la spiramycine. Les ions ammonium ont certes un petit effet de répression sur la VDH et la CIVDH mais ils agissent probablement à d'autres niveaux du métabolisme secondaire.

Il est difficile d'apprécier l'effet régulateur du glycérol sur la synthèse des enzymes du catabolisme de la valine. Nous avons constaté un effet répresseur marquant sur le premier pic de la CIVDH quand le glycérol à 10 g. l⁻¹ était seule source de carbone mais la faiblesse de cette activité enzymatique n'empêchait pas la dégradation du cétoisovalérate, l'isobutyrate s'accumulant. Cet effet répresseur n'a pas été confirmé par le pulse de glycérol. Dans ce cas, il y a aussi accumulation d'isobutyrate et cette accumulation se fait avec un rapport $Y_{iso/val}$ proche de 1 mol. mol⁻¹, ce qui indique qu'un excès de glycérol empêche le catabolisme de l'isobutyryl-CoA. Le glycérol semble exercer son effet régulateur négatif en aval de l'isobutyrate en réprimant les systèmes d'activation ou d'assimilation de l'isobutyrate. L'isobutyryl-CoA déshydrogénase pourrait constituer l'une des cibles.

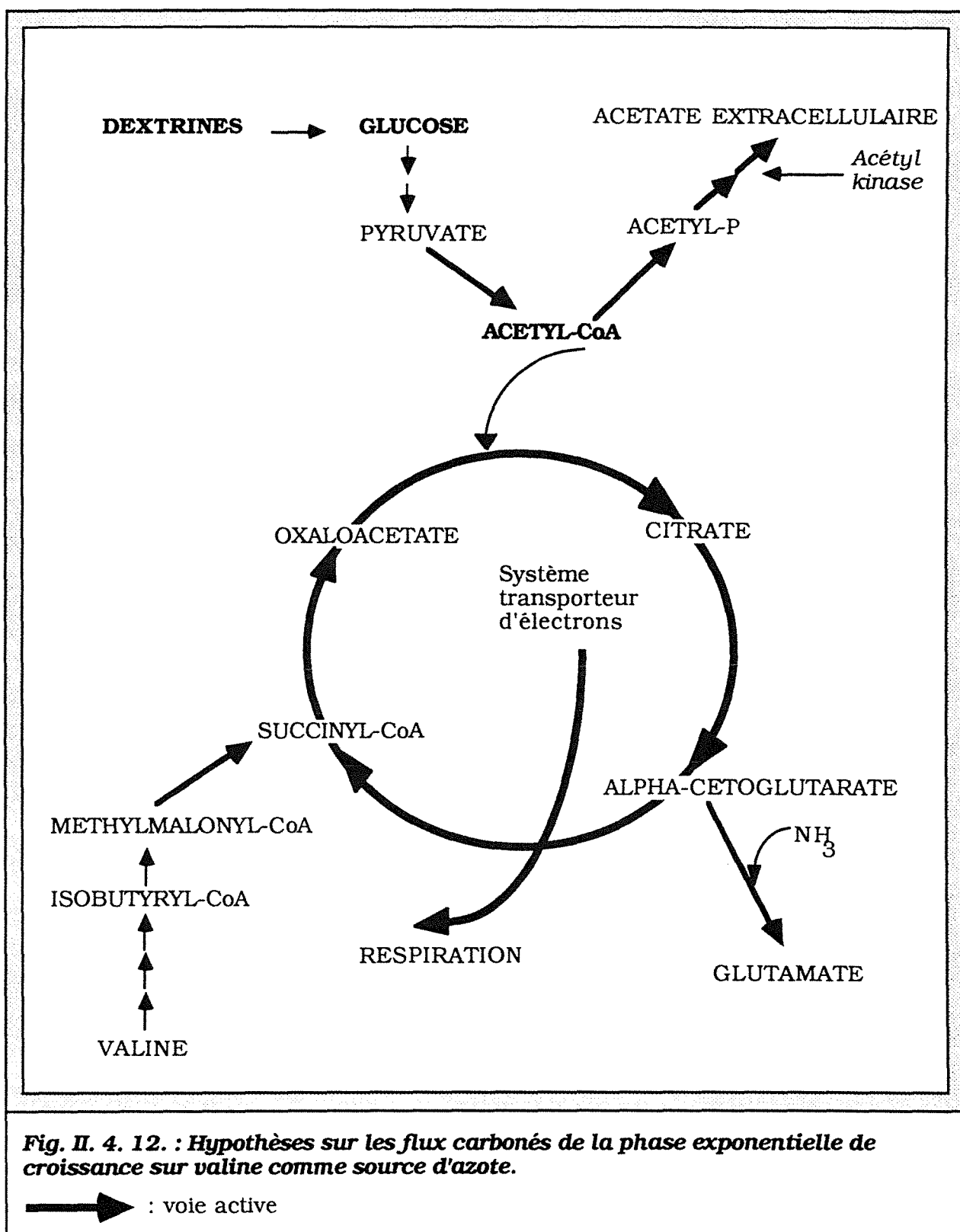
Cette conclusion ainsi que les résultats d'autres travaux réalisés au laboratoire permettent d'émettre une hypothèse sur les flux carbonés durant les phases de croissance et de production.

En présence de valine il y a une excrétion d'acétate pendant la phase de croissance, acétate qui est réassimilé pendant la phase de ralentissement ; parallèlement il y a excrétion d'isobutyrate qui est ensuite partiellement ou totalement réassimilé pendant la phase stationnaire. Ces excrétions et réassimilations séquentielles de l'acétate et de l'isobutyrate peuvent être expliquées en se basant sur le dosage des enzymes (acétate kinase, pyruvate déshydrogénase, acétyl-CoA carboxylase et oxaloacétate déshydrogénase) effectué au laboratoire par Khaoua (1990) et Laakel (1993). Pendant la première phase de croissance les dextrines aboutissent au pyruvate. Ce dernier est transformé en acétyl-CoA par l'action de la pyruvate déshydrogénase qui est fortement présente pendant cette phase (Laakel, 1992). Au

même moment la dégradation de la valine (Fig. III. 4. 1) mène à la formation, via le méthylmalonyl-CoA, du succinyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs pour assurer la croissance. Ceci aboutit à la saturation du cycle de Krebs provoquant une diminution d'entrée du flux carboné provenant de la glycolyse dans ce cycle. L'acétyl-CoA en excès à l'intérieur de la cellule est excrété sous forme d'acétate après l'action d'une phosphoacétyl-transférase (PTA) et de l'acétate kinase qui sont présentes pendant ce stade de la croissance (Khaoua, 1990) (Fig. III. 4. 12).

A la fin de la phase exponentielle, pendant le ralentissement de croissance, la pyruvate déshydrogénase et le cycle de Krebs (citrate synthase, isocitrate déshydrogénase) ainsi que la respiration se ralentissent (Khaoua, 1990 ; Laakel, 1992). Il y aurait à ce moment une faible transformation du pyruvate en acétyl-CoA ce qui engendrerait la réassimilation de l'acétate extracellulaire pour former l'acétyl-CoA. En même temps, il y a activation de l'oxaloacétate déshydrogénase qui transforme l'oxaloacétate en malonyl-CoA (Laakel, 1992). Ce dernier est un précurseur de l'aglycone (Fig. III. 4. 13).

L'excrétion en fin de croissance de l'isobutyrate, intermédiaire du catabolisme de la valine, augmente lorsque la concentration de la valine augmente dans le milieu. L'excrétion de l'isobutyrate pourrait être expliquée par un contrôle de l'isobutyryl-CoA déshydrogénase, soit de sa biosynthèse, soit de son activité. Nous avons choisi de mesurer l'AS CIVDH comme première enzyme liée au catabolisme énergétique de la valine ; sans doute serait-il aussi intéressant de suivre l'AS de l'isobutyryl-CoA déshydrogénase. Quant à la régulation de l'activité de l'isobutyryl-CoA déshydrogénase, elle pourrait être expliquée par le freinage de la réaction de réoxydation des flavines réduites, coenzymes nécessaires pour l'action de cette enzyme (Fig. III. 4. 1), suite à une limitation du milieu en oxygène, aux fortes concentrations cellulaires (Khaoua, 1990). Nous n'avons pas vérifié cette hypothèse qui aurait pu être éprouvée en modifiant l'aération du réacteur (soit en augmentant le transfert d'oxygène, soit en diminuant la biomasse par la concentration des constituants).



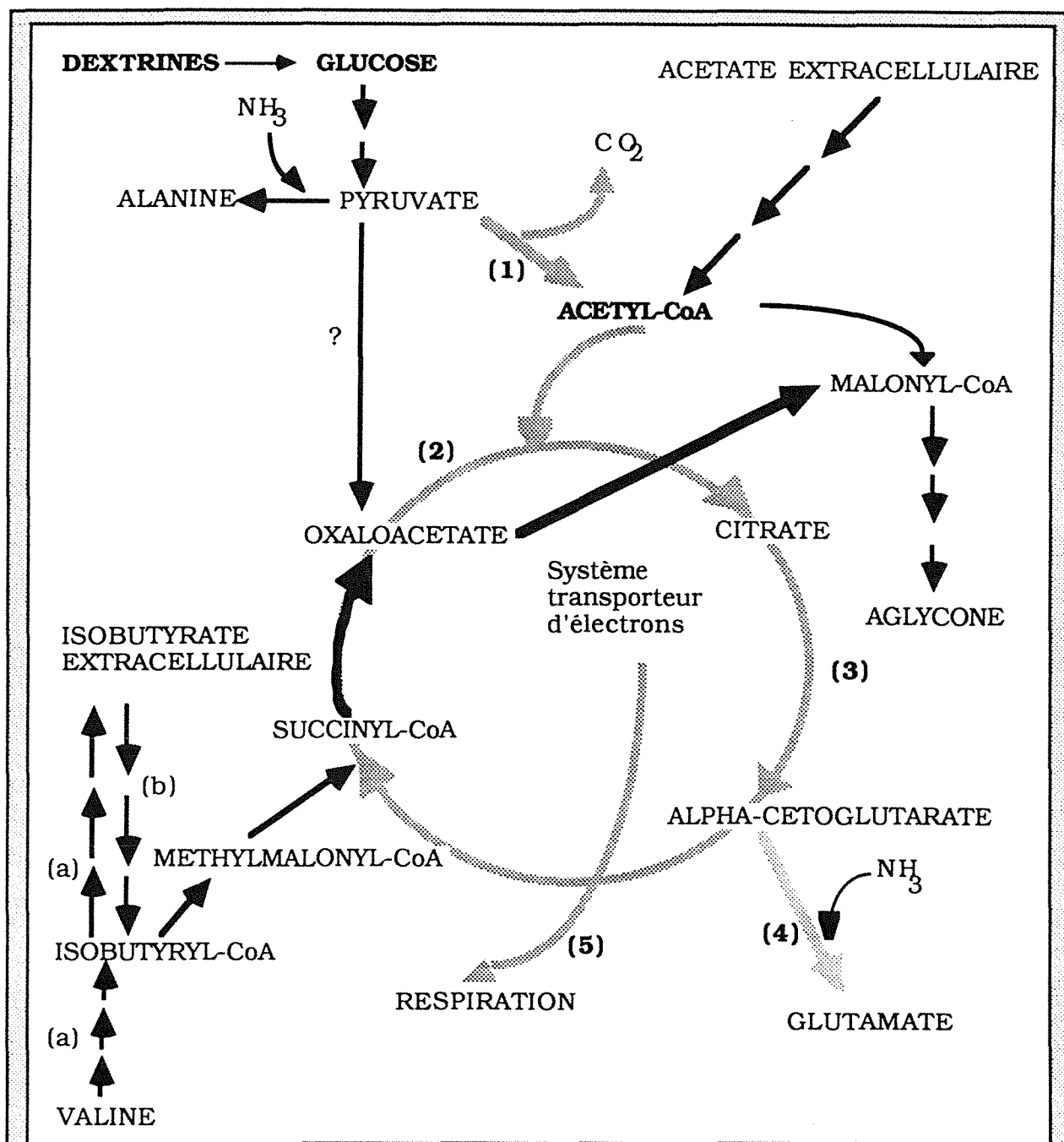


Fig. III. 4. 13. : Hypothèses sur les flux carbonés de la phase de ralentissement de croissance sur valine comme source d'azote

(1) Pyruvate déshydrogénase, (2) Citrate synthase, (3) Isocitrate déshydrogénase

(4) Glutamate déshydrogénase, (5) Enzymes respiratoires

(a) en présence de valine

(b) lorsque la valine est épuisée

→ : voie active

--- : voie ralentie

PARTIE
III. 5

**COMPARAISON DES PROFILS
ELECTROPHORETIQUES DES
PROTEINES CELLULAIRES TOTALES
SUR MILIEUX FAVORABLES
ET DEFAVORABLES A LA
PRODUCTION DE SPIRAMYCINE**

INTRODUCTION

Nous avons montré à travers l'ensemble des études présentées dans ce travail, qu'en excès, les ions ammonium, le glycérol et les ions phosphate peuvent avoir des effets négatifs sur la biosynthèse de la spiramycine. Nous avons constaté que ces effets présentent un caractère commun : ils s'exercent principalement avant la mise en place de la biosynthèse de la spiramycine. Nous avons postulé jusqu'à présent qu'il pouvait exister un effet négatif des sources de carbone et d'azote à assimilation rapide, et des ions phosphate, au niveau de l'expression des gènes codant pour des protéines nécessaires à la biosynthèse de la spiramycine. Ces gènes pourraient être aussi bien des gènes codant pour des enzymes du métabolisme général menant à des précurseurs de l'antibiotique, que des gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire. Actuellement chez *S. ambofaciens* les enzymes intervenant dans la biosynthèse de la spiramycine n'ont pas encore été mises en évidence. En suivant au cours de la croissance, l'apparition et/ou la disparition des protéines cellulaires (par électrophorèse des protéines cellulaires totales), il devrait être possible, si le phénomène existe bien, de repérer des variations dans les profils protéiques en fonction d'une part, des phases de croissance, et d'autre part, de l'ajout des nutriments provoquant la suppression de la production de spiramycine.

Cette partie de notre travail sera consacrée à une étude préliminaire des modifications de ces profils protéiques cellulaires dans différentes conditions de culture étudiées précédemment : favorables (dextrines à 15 g. l⁻¹ et valine 25 mM ; glycérol à 10 g. l⁻¹ et valine à 50 mM en présence de 14 mM d'ions phosphate) et défavorables (additions de glycérol à 60 g. l⁻¹ ou d'ammonium à 100 mM ; présence de 100 mM d'ions phosphate) à la production de spiramycine. Parallèlement aux différents dosages présentés dans les parties antérieures (biomasse, consommation des différents substrats, production de spiramycine et, dans certains cas, dosage d'activités enzymatiques), nous avons procédé à des extractions de protéines cellulaires totales (à différents temps d'incubation) et à des séparations par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration et dans des conditions dénaturantes.

RESULTATS

1. Comparaison de l'évolution des profils électrophorétiques des protéines solubles de *S. ambofaciens* dans le milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ et la valine à 25 mM (milieu producteur de spiramycine = milieu témoin n°1), et après additions de 100 mM d'ions ammonium ou 60 g. l⁻¹ de glycérol à 12 h (milieux non producteurs de spiramycine)

L'analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse a permis de révéler plusieurs bandes protéiques qui évoluent suivant l'âge et les conditions de culture (photo 1a et b ; Fig. III. 5. 1).

En phase de croissance, d'une façon générale, nous constatons des profils protéiques semblables dans les différentes conditions de culture. Ces profils sont caractérisés par une multitude de bandes avec une nette prédominance d'une bande correspondant à une protéine d'un poids moléculaire de l'ordre de 43 kDa (A) qui s'intensifie avec la croissance. En phase de production l'intensité de cette protéine s'atténue dans le milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l⁻¹ et la valine à 25 mM alors qu'elle persiste dans les milieux additionnés d'un excès d'ions ammonium ou d'un excès de glycérol. Nous visualisons deux bandes protéiques de poids moléculaires respectifs de l'ordre de 42 (B) et 36 kDa (C) qui apparaissent en début de production (à 96 h) et uniquement sur le milieu témoin n°1. Leur densité s'intensifie en fonction du temps. Ces deux bandes protéiques sont inexistantes au niveau des profils des cellules cultivées en présence d'une concentration de glycérol ou d'ions ammonium inhibitrices pour la production de la spiramycine.

2. Comparaison de l'évolution des profils électrophorétiques des protéines solubles de *S. ambofaciens* dans le milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ comme source de carbone et la valine à 50 mM comme source d'azote en présence de 14 mM (milieu producteur de spiramycine = milieu témoin n°2) ou 100 mM d'ions phosphate (milieu non producteur de spiramycine)

Les résultats obtenus sont illustrés sur la photo 2 et les Fig. III. 5. 2.

En phase de croissance, les profils électrophorétiques des protéines solubles des cellules cultivées en présence d'un excès d'ions phosphate (100 mM) montrent un plus grand nombre de bandes protéiques que les cellules en croissance sur milieu à concentration limitante en ions phosphate (14 mM). Les bandes relativement importantes se retrouvent dans les deux conditions mais avec une densité plus forte en présence d'un excès d'ions phosphate.

En phase de production, il existe principalement deux bandes correspondant à deux protéines de poids moléculaires respectifs 45 (E) et 53 (D) kDa qui apparaissent de façon beaucoup plus nette sur milieu à faible concentration en ions phosphate.

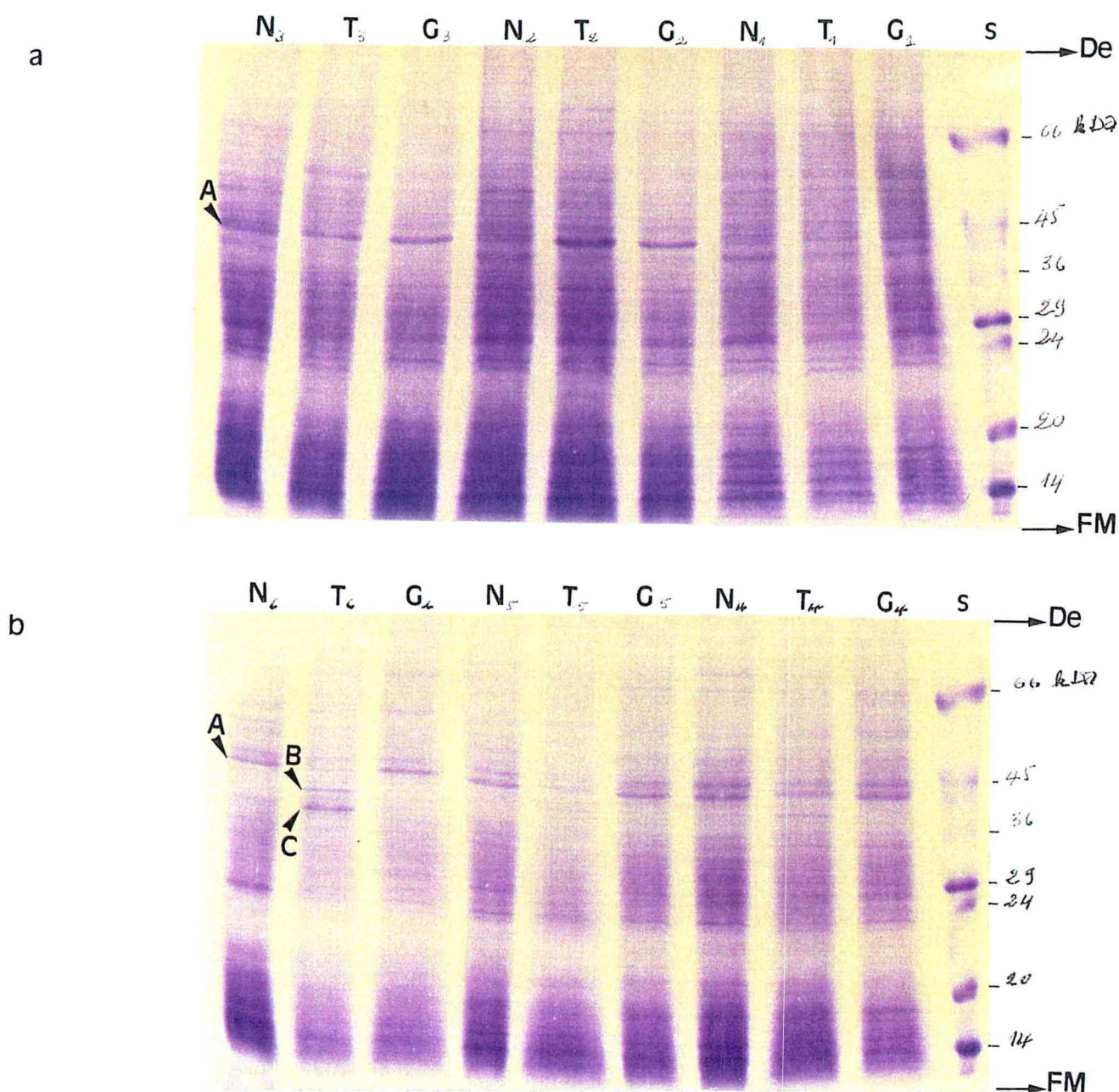


Photo 1 : séparation des protéines intracellulaires totales par électrophorèse en gradient de polyacrylamide 10-25%.

pistes T : milieu synthétique contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM. (culture témoin n°1 : milieu producteur de spiramycine)

pistes G : milieu synthétique contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM et additionné de 60 g. l^{-1} à 12 h d'incubation (milieu non producteur)

pistes N : milieu synthétique contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM et additionné de 100 mM d'ammonium à 12 h d'incubation (milieu non producteur)

pistes S : protéines standards de poids moléculaires connus (14 à 66 kDa)

pistes 1 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 24 h.
 pistes 2 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 48 h.
 pistes 3 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 72 h.
 pistes 4 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 96 h.
 pistes 5 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 120 h.
 pistes 6 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 144 h.

phase de croissance (a)

phase de production (b)

FM : front de migration

De : dépôt

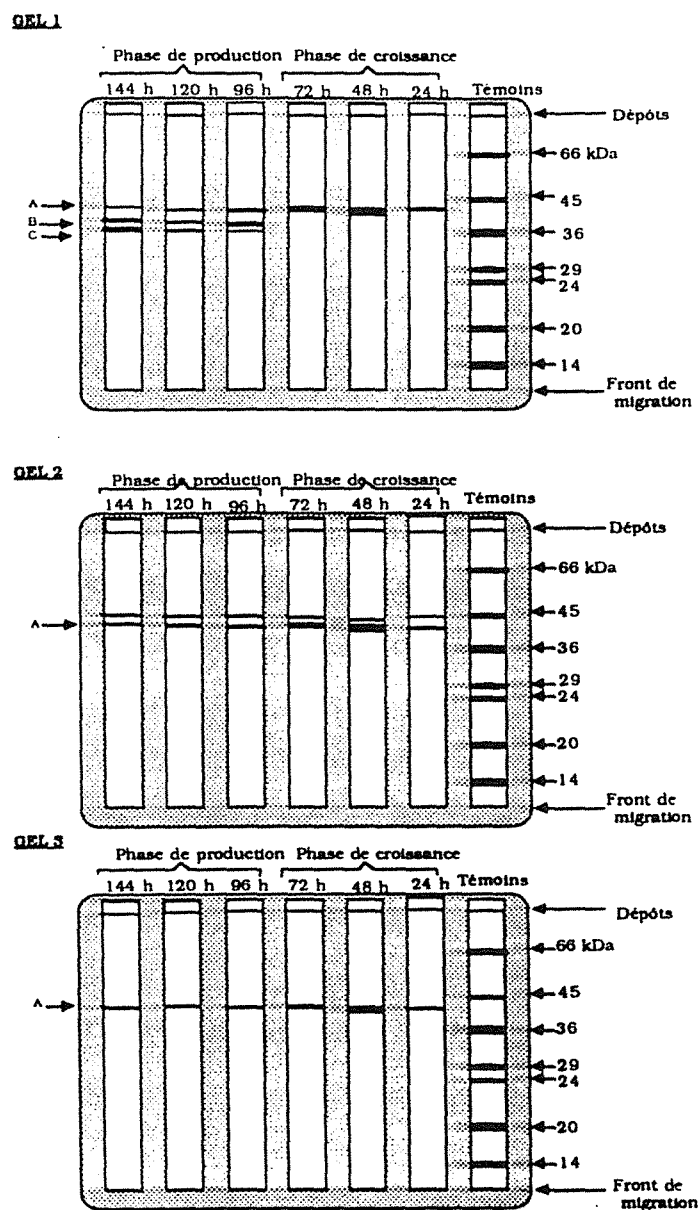


Fig. III. 5. 1 : Représentation schématique des profils électrophorétiques obtenus dans différentes conditions de culture.

GEL 1 : milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM (milieu témoin n°1 = milieu producteur de spiramycine).

GEL 2 : milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM et additionné de 100 mM d'ions ammonium à 12 h d'incubation (milieu non producteur).

GEL 3 : milieu synthétique de base contenant les dextrines à 15 g. l^{-1} et la valine à 25 mM et additionné de 60 g. l^{-1} à 12 h d'incubation (milieu non producteur).

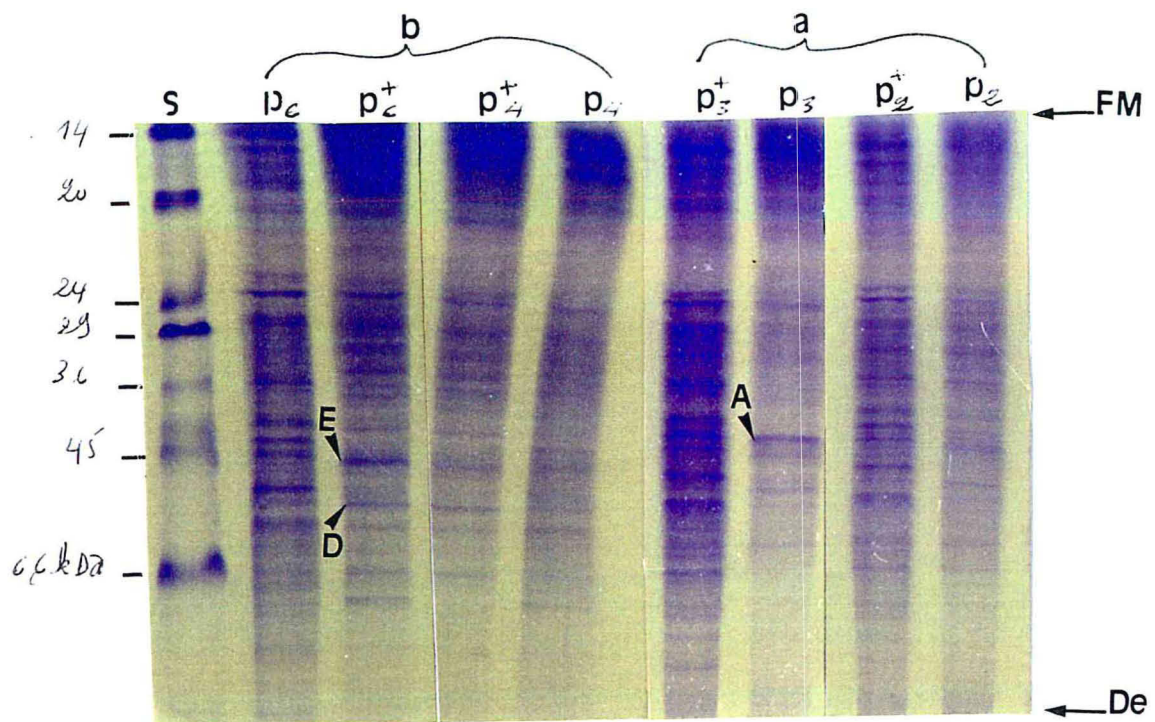


Photo 2 : séparation des protéines intracellulaires totales par électrophorèse en gradient de polyacrylamide 10-25%.

pistes P : milieu synthétique contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et la valine à 50 mM et en présence de 14 mM d'ions phosphate (culture témoin n°2 : milieu producteur de spiramycine)

pistes P⁺ : milieu synthétique contenant le glycérol à 10 g. l⁻¹ et la valine à 50 mM et en présence de 100 mM d'ions phosphate (milieu non producteur)

pistes S : protéines standards de poids moléculaires connus (14 à 66 kDa)

pistes 2 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 48 h. }

pistes 3 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 72 h. }

phase de croissance (a)

pistes 4 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 96 h. }

pistes 6 : protéines intracellulaires totales d'une culture de 144 h. }

phase de production (b)

FM : front de migration

De : dépôt

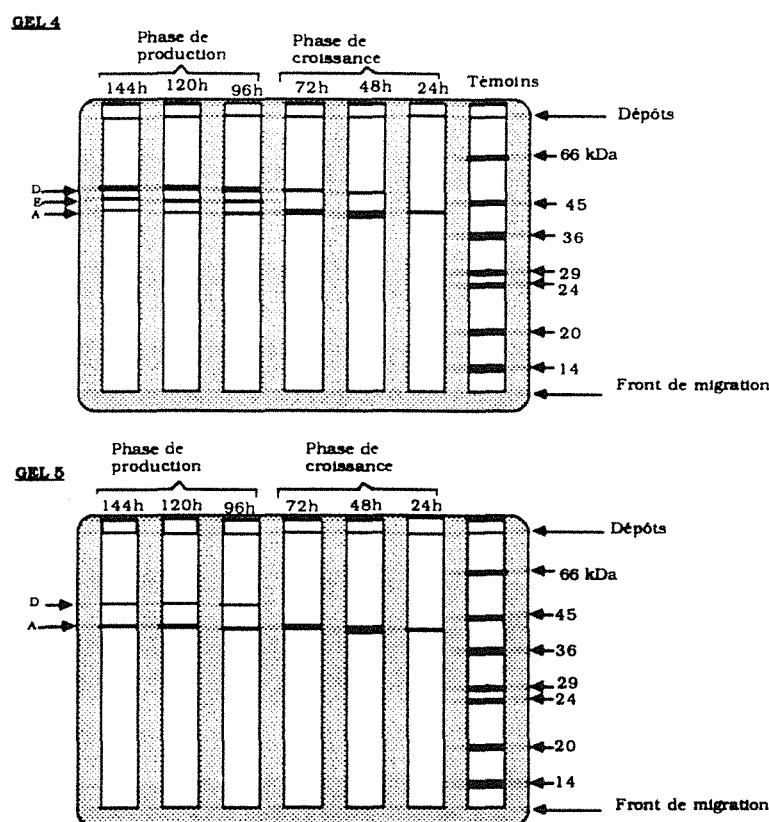


Fig. III. 5. 2 : Représentation schématique des profils électrophorétiques obtenus dans différentes conditions de culture.

GEL 5 : milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l^{-1} et la valine à 50 mM et en présence de 14 mM d'ions phosphate (milieu témoin n°2 = milieu producteur de spiramycine).

GEL 6 : milieu synthétique de base contenant le glycérol à 10 g. l^{-1} et la valine à 50 mM en présence de 100 mM d'ions phosphate à 12 h d'incubation (milieu non producteur).

DISCUSSION

En présence d'un excès d'ions ammonium, de glycérol ou d'ions phosphate, nous décelons des modifications dans les profils électrophorétiques des protéines solubles totales de *S. ambofaciens* par rapport aux cultures témoins. Le point commun qui caractérise ces différents substrats, en plus de leur action négative sur la biosynthèse de la spiramycine, est la stimulation de la croissance. La bande protéique (A) d'un poids moléculaire estimé à 43 kDa qui est majoritairement représentative de la phase de croissance dans les différentes conditions de culture, s'atténue ou disparaît pendant la phase de production dans les milieux témoin n°1 et n°2 et persiste dans les cultures en présence d'un excès d'ions ammonium, de glycérol ou d'ions phosphate. Il s'agit probablement d'une protéine indispensable à la croissance intervenant dans le métabolisme primaire. Cette protéine ne serait plus synthétisée lorsque les cellules entreraient dans un état physiologique atteignant un certain niveau de "différenciation métabolique". Sa présence pendant la phase de production réorienterait le flux des précurseurs vers des fonctions autres que celles du métabolisme secondaire. La non disponibilité de ces métabolites empêcherait la formation de la spiramycine.

Par ailleurs, deux bandes protéiques de poids moléculaires respectifs estimés à 36 (B) et 42 (C) kDa qui apparaissent en phase de production sur le milieu synthétique de base contenant les dextrans comme source de carbone et la valine comme source d'azote, sont respectivement faiblement détectable et inexistante quand ce même milieu est additionné de 100 mM d'ions ammonium ou de 60 g. l⁻¹ de glycérol à 12 h d'incubation.

L'excès d'ions phosphate semble également stimuler la synthèse des protéines cellulaires totales. Cependant, il empêcherait la synthèse de deux protéines de poids moléculaires respectifs de l'ordre de 53 (D) et 45 (E) kDa puisque celles-ci ne sont détectées de façon claire que pendant la phase de production de spiramycine sur milieu limitant en ions phosphate.

L'ensemble de ces protéines qui n'apparaissent que dans des cultures où il y a production de spiramycine et seulement en phase de production, pourraient correspondre à des protéines impliquées dans la biosynthèse de la spiramycine. Il pourrait s'agir d'enzymes de la voie de biosynthèse de la spiramycine. Mais étant donné que nous avons travaillé dans des conditions dénaturantes pour réaliser les électrophorèses, les bandes protéiques détectées en phase de production pourraient être des sous-unités, comme par exemple celle de la polykétide synthétase. En effet, leurs poids moléculaires estimés aux environs de 40 kDa sont proches de celui d'un polypeptide (37 kDa) actif envers la [³H] tétra-hydro-cérulénine détecté chez *S. erythreus*, producteur de l'érythromycine (Roberts et Leadlay, 1984). Ces protéines pourraient également correspondre à des inducteurs de la biosynthèse des antibiotiques ou de cytodifférenciation. Ainsi, Szabo *et al.* (1967) et Biro *et al.* (1980) ont décrit chez *S. griseus* l'existence d'un facteur C de nature protéique et de poids moléculaire 34 kDa qui contrôle le processus de cytodifférenciation de la souche. Cardoza *et al.* (1993) ont montré chez

Nocardia lactamdurans, la présence d'une enzyme, extracellulaire, la céphalosporine C acétylhydrolase d'un poids moléculaire de l'ordre de 39 kDa ; la synthèse de cette enzyme et la production de la céphamycine C se font simultanément.

Ces résultats nous indiquent que l'effet dépresseur provoqué par un excès des substrats à assimilation rapide (ions ammonium, glycérol) ou des ions phosphate se répercute au niveau de l'expression des gènes codant pour la synthèse de protéines responsables de la production de spiramycine. Il s'agit là d'indications préliminaires qu'il conviendrait de préciser.

**CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES**

Outre l'intérêt fondamental que suscite la compréhension du métabolisme des *Streptomyces* producteurs d'antibiotiques, les exigences de la concurrence industrielle sont telles que même avec un antibiotique "chevronné" comme la spiramycine, le travail d'optimisation de la production utilisant les ressources des techniques nouvelles (ingénierie génétique, informatique, robotique...) n'est pas prêt de s'achever.

Aujourd'hui parmi les axes d'investigation les plus actifs, la recherche de souches produisant des antibiotiques en quantité appréciable avec une vitesse élevée à partir de matières premières peu coûteuses s'accompagnant de conditions de fermentation plus économiques, occupe une place importante.

Ce travail de sélection pour être mené à bien, nécessite une bonne connaissance des caractéristiques physiologiques du microorganisme ainsi que des voies de biosynthèse de l'antibiotique produit et des régulations qui s'y opèrent.

Dans cette optique notre contribution à l'étude de la régulation de la biosynthèse de la spiramycine chez *S. ambofaciens* a permis de répondre à certaines questions. Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la spiramycine sont jusqu'à présent inconnues. Nous nous sommes alors intéressés aux relations entre métabolismes primaire et secondaire. L'étude de l'influence de certains substrats azotés (valine, ions ammonium), carbonés (dextrines, glucose, glycérol) et des ions phosphate sur la production de spiramycine par *S. ambofaciens* et la compréhension des mécanismes par lesquels ces éléments interfèrent avec cette production ont constitué l'objectif de ce travail.

L'originalité de cette étude réside dans la mise en évidence des interactions entre les métabolismes azoté, carboné et phosphaté et leur incidence sur la régulation de la biosynthèse de la spiramycine.

D'une manière générale nous avons montré qu'en présence d'un excès de ces nutriments, la production de spiramycine était défavorisée.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'effet de la valine sur la production de la spiramycine dépendait de la concentration utilisée. A concentration appropriée, la valine favorise la production de la spiramycine probablement par un bon apport de précurseurs de l'aglycone de la spiramycine, en particulier l'acétate et l'isobutyrate. *Nous avons vérifié au cours de cette étude que ces deux derniers catabolites provenaient principalement de la valine. Cependant, il serait important dans l'avenir d'étudier l'isobutyryl-CoA isomérase qui permet la formation du butyryl-CoA par isomérisation de l'isobutyryl-CoA.*

Quand la concentration de la valine est élevée l'effet devient inverse. Ceci pourrait s'interpréter principalement grâce à deux éléments observés : à concentration élevée, la désamination de la valine conduit à l'accumulation d'une forte concentration d'ammonium libre ; la dégradation de sa partie carbonée fournit les précurseurs de l'aglycone de la spiramycine mais l'isobutyrate n'est pas réassimilé. Ces deux phénomènes semblent liés ; nous avons démontré que les ions ammonium étaient à l'origine de cet effet négatif.

D'autre part nous avons montré que l'utilisation d'une source de carbone et d'énergie facilement assimilable, même en présence d'une concentration convenable de valine, défavorisait la production de la spiramycine. La nature particulièrement inhibitrice de l'effet du glycérol sur la production de spiramycine a été prouvée.

Par ailleurs nous avons trouvé qu'il existait une corrélation entre la réduction ou la suppression de la production de la spiramycine par les sources carbonées et énergétiques rapidement métabolisables ou un excès d'ions phosphate et des teneurs élevées en ATP intracellulaire. Les effets sur la production de la spiramycine des différentes sources de carbone et d'énergie semblent intimement liés aux métabolites phosphorylés. *Nos résultats suggèrent l'implication probable, en tant que médiateur commun aux deux effets inhibiteurs phosphate et glucose, des métabolites intracellulaires phosphorylés (glucose-6-phosphate par exemple). Ce n'est là qu'une hypothèse qu'il conviendrait d'éprouver dans le futur.*

A l'issu de ces différentes constatations, nous avons tenté d'apporter quelques éléments de réponse quant aux cibles d'action de tels contrôles.

L'étude de la régulation du catabolisme de la valine nous a permis de déterminer les mécanismes par lesquels l'ammonium exerce ses effets négatifs sur la biosynthèse de la spiramycine. Nous retiendrons l'inhibition et/ou la répression partielles par les ions ammonium de la valine déshydrogénase (VDH) et de la cétoisovalérate déshydrogénase (CIVDH), deux enzymes du catabolisme de la valine générateur de précurseurs de l'aglycone de la spiramycine. D'autres enzymes du métabolisme secondaire seraient probablement soumises à l'action négative des ions ammonium.

A côté des ions ammonium, le glycérol interférerait également avec le catabolisme de la valine par inhibition et/ou répression des systèmes d'activation ou d'assimilation de l'isobutyrate. *L'isobutyryl-CoA déshydrogénase pourrait constituer l'une des cibles de l'effet inhibiteur du glycérol. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en étudiant la régulation de cette enzyme par les sources de carbone et d'énergie facilement assimilables.*

L'effet phosphate semble se manifester à différents niveaux du métabolisme cellulaire. En présence d'un excès d'ions phosphate, nous assistons à une augmentation des teneurs intracellulaires en ATP, en protéines, en ADN et en ARN ainsi qu'à une réduction des biosynthèses de la VDH et des phosphatases alcalines intra et extracellulaires.

Les différents effets négatifs des ions ammonium, du glycérol et des ions phosphate sur la production de la spiramycine s'accompagnent également d'une augmentation de la vitesse spécifique de croissance. Ce dernier point n'a pas été développé au cours de cette étude car il a fait l'objet d'autres travaux réalisés au laboratoire.

Grâce à des études en semi-continu l'effet négatif des ions ammonium sur la production de la spiramycine en rapport avec la concentration de la source carbonée, le glycérol, a pu être contrôlé. Ce mode de culture nous a permis d'établir des relations entre les

vitesse spécifiques de production de spiramycine et de consommation des ions ammonium et du glycérol. La production de spiramycine est favorisée par un rapport azote/carbone judicieusement choisi. Il est important de maintenir ce paramètre à une valeur bien équilibrée. L'effet négatif sur la production de la spiramycine d'une concentration extracellulaire élevée en ions ammonium au moment de la production a été également confirmé lors de ces expérimentations. Bien que nous ayons réussi à améliorer de douze fois la vitesse spécifique de production de la spiramycine, nous ne sommes pas arrivés à la maintenir longtemps à une valeur élevée. *Pour y remédier, il serait envisageable de procéder à des cultures semi-continues avec une alimentation périodique, en sources de carbone et d'azote, contrôlée par un microprocesseur. Le mode de culture récolte-recharge pourrait également permettre un accroissement et un maintien à un bon niveau de la vitesse spécifique de production de spiramycine.*

Le fait que les ions ammonium, le glycérol et les ions phosphate exercent leurs effets négatifs principalement avant la mise en place de la production de la spiramycine nous a conduit à émettre l'hypothèse suivante : ces différents substrats exerceraient une régulation sur l'expression des gènes codant pour des protéines nécessaires à la biosynthèse de la spiramycine.

Les premières analyses des profils protéiques, par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration, ont permis de mettre en évidence :

- dans les cultures productrices de spiramycine, l'apparition en début de phase de production de bandes protéiques de poids moléculaires estimés à 36 et 42 (témoin n°1) et 53 et 45 kDa (témoin n°2), et la disparition d'une bande protéique d'un poids moléculaire estimé à 43 kDa caractérisant la phase de croissance.

- dans les cultures non productrices d'antibiotique (par additions de concentrations inhibitrices d'ions ammonium, de glycérol ou d'ions phosphate), l'absence des bandes protéiques de poids moléculaire estimés à 36 et 42 kDa (quand on ajoute de l'ammonium ou du glycérol) et à 53 et 45 kDa (quand on ajoute les ions phosphate) et la persistance de la bande de 43 kDa même durant l'idiophase.

Ce ne sont là que des indications préliminaires qu'il serait intéressant de préciser. L'électrophorèse bidimensionnelle, dans les conditions natives, permettrait de vérifier que les protéines qui caractérisent la phase de production de spiramycine dans les cultures productrices sont bien homogènes. Nous proposons la comparaison de ces profils protéiques avec ceux de mutants non producteurs. L'utilisation de la cérulénine tritiée (qui se lie spécifiquement à la fonction SH de la β -cétosynthétase) pourrait nous permettre d'identifier une éventuelle correspondance de ces bandes à la polykétide synthétase responsable de la biosynthèse de la spiramycine. Après cette vérification, la protéine intéressante pourrait être

éluée du gel et séquencée en partie. La connaissance de la séquence de l'extrémité N-terminale permettrait la création d'une sonde cDNA qui pourrait être utilisée pour identifier les gènes de biosynthèse de la spiramycine et étudier les niveaux d'expression de ces gènes. Le clonage et l'expression de ces gènes dans des bactéries dont la culture est plus aisée serait d'un grand intérêt.

L'étude des mécanismes par lesquels les différents éléments nutritifs répriment la biosynthèse de la spiramycine est d'une grande complexité. Les moyens mis en oeuvre lors de cette étude ainsi que la méconnaissance totale des enzymes du métabolisme secondaire impliquées dans la biosynthèse de la spiramycine ne nous ont pas permis de révéler avec précision les phénomènes des régulations mis en jeu. Afin de compléter et d'affiner les résultats présentés dans cette thèse, il est indispensable d'acquérir d'autres outils tels que les mutants bloqués, les marqueurs isotopiques ainsi que des techniques de biologie moléculaire qui s'avèrent nécessaires à une telle étude physiologique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

AHARONOWITZ Y. (1980) Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**, 209-233.

AHARONOWITZ Y. et DEMAIN A. L. (1978) Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 159-164.

AMIRA K., OKAZUKI H., YAMADA K. et BEPPU T. (1973) Effect of exogenous fatty acids on the cellular fatty acid composition and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2313-2317.

AN G. et VINING L. C. (1978) Intracellular levels of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate (pppGpp) in cultures of *Streptomyces griseus* producing streptomycin. *Can. J. Microbiol.* **24**, 502-511.

ANDRES N., WOLF H., ZÄHNER H., RÖSSNER E., ZEEK A., KÖNIG W. et SINNWELL V. (1989) Hormaomycin, a novel peptide lactone with morphogenetic activity on *Streptomyces*. *Helv. Chim. Acta.* **72**, 426-437.

AOKI H., SAKAI H., KOHSAKA M., KONOMI T., HOSODA J., KUBOUCHI Y., IGUCHI et IMANAA H. (1976) Nocardicin A, a new monocyclic bêta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **29**, 492-500.

ATKINSON D. E. (1969) Regulation of enzyme function. *Ann. Rev. Microbiol.* **23**, 47-68.

BALTZ R. H. et SENO E. T. (1981) Properties of *Streptomyces fradiae* mutants blocked in biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 214-225.

BALTZ R. H., SENO E. T., STONESIFER J. et WILD G. M. W. (1983) Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin : a preferred pathway from tylactone to tylosin. *J. Antibiot.* **36**, 131-141.

BAUER N. J., KREUZMAN A. J., DOTZALF J. E. et YEH W. K. (1988) Purification, characterization, and kinetic mechanism of S-adenosyl-L-methionine : Macrocin O-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 15619-15625.

BEHAL V., NEUZIL J. et HOSTALEK Z. (1983) Effect of tetracycline derivatives and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* **5**, 537-542.

BERDY J. (1974) Recent development in antibiotic research and classification of antibiotics according to the chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**, 309-406.

BERDY J. (1980) Recent advances in and prospects of antibiotic research. *Process Biochem.* **16**, 28-35.

BETINA V. (1983) In : "The chemistry and biology of antibiotics". NAUTA W. T., REKKER R. F. eds., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

BHATNAGAR R. K., DOULL J. L. et VINING L. C. (1988) Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* : Studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* **34**, 1217-1223.

BIRO S., BEKESI I., VITALIS S. et SZABO G. (1980) A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **103**, 359-363.

BOK S. H. et DEMAIN A. L. (1977) Colorimetric assay for polyols. *Anal. Biochem.* **81**, 18-20.

BROWN D. E. et ZAINUDEEN M. A. (1978) Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1045-1061.

- BROWN D., FOSTER J., HITCHCOCK M. J., OCHI K., TROOST T. et KATZ E. (1983) Regulation of tryptophan metabolism and its relationship to actinomycin D synthesis. In : "Proceeding of the 4th international symposium on the genetics of industrial microorganisms". IKEDA Y., BEPPU T. eds., Kodansha Ltd, Tokyo. pp. 85-91.
- BU'LOCK J. D. (1961) Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* **3**, 293-342.
- BU'LOCK J. D., HAMILTON D., HULM M. A., POWEL A. J., SMALLEY H. M., SHEPHERD D. et SMITH C. G. (1965) Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. *Can. J. Microbio.* **11**, 765-778.
- BUCHANAM R. E. et GIBBONS N. E. (Editors) (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition, The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- BURG R. W. (1982) Fermentation products in animal health. *ASM News.* **48**, 460-463.
- BURTON K. (1956) A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315-323.
- BUSHELL M. (1989) The process physiology of secondary metabolite production. In : "Microbial products : new approaches". BAUMBERG S., HUNTER I., RHODES M. eds., Cambridge University Press, Cambridge. pp. 95-120.
- CALAM C. T. (1976) Starting investigational and production cultures. *Process Biochem.* **11**, 7-12.
- CAMPBELL I. M. (1984) Secondary metabolism and microbial physiology. *Adv. Microbiol. Physiol.* **25**, 1-60.
- CAMPBELL I. M., DOERFLER D. L., BIRD B. A., REMALEY A. T., ROSATO L. M. et DAVIES B. N. (1982) Secondary metabolism and colony development in solid cultures of *Penicillium brevicompactum* and *Penicillium patulum* In : "Overproduction of microbial products". KRUMPHANZL V., SIKYTA B., VANEK Z. eds Academic Press London. pp. 141-151.
- CARDOZA R. E., MARTIN J. F. et LIRAS P. (1993) Purification and characterization of an extracellular cephalosporin C acetylhydrolase from the cephamycin C producer *Nocardia lactamdurans*. *Abstract Books Vol. 2. Sixth european congress on biotechnology.*
- CASHEL M. (1975) Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. *Ann. Rev. Microbiol.* **29**, 301-318.
- CHATER K. F. (1990) The improvement prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*. *Bio/Technology.* **8**, 115-121.
- CHATER K. F. et HOPWOOD D. A. (1989) Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. In : "Genetics of bacterial diversity". (Eds) CHATER K. F. and HOPWOOD D. A. Academic Press Inc, London. pp. 129-150.
- CHERUY A. et DURAND A. (1979) Optimization of erythromycin biosynthesis by controlling pH and temperature : theoretical aspects and practical application. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **9**, 303-320.
- CHOPRA C., HOOK D. J. et VINING L. C. (1979) Congeners of etamycin produced by *Streptomyces griseoviridis*. *J. Antibiot.* **32**, 392-401.
- COLOMBO A. L., CRESPI-PERELLINO N. et MICALIZIO S. (1984) Relationships between growth AMP and tylosin production in two mutants of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 201-207.
- CORCORAN J. W. (1973) In : "Genetics of Industrial Microorganisms". VANEK Z. HOSTALEK Z. and CUDLIN J. (eds), Prague : Academia. Vol II, pp. 339-353.
- CORCORAN J. W. (1981) Biochemical mechanisms in the biosynthesis of the erythromycins. In : "Antibiotics, IV, Biosynthesis". Ed CORCORAN J. W. Springer Verlag, Berlin. pp. 132-175.

- CORTES J., LIRAS P., CASTRO J. M. et MARTIN J. F. (1986) Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of α -amino adipyl-cysteinyl- valine and deacandoxycephalosporin C synthase. J. Gen. Microbiol. **132**, 1805-1814.
- CRAMERI R. et DAVIES J. E. (1986) Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. J. Antibiot. **39**, 128-135.
- CRANDALL L. W. et HAMILL R. L. (1986) Antibiotics produced by *Streptomyces* : major structural classes. In : "The bacteria. A treatise on structure and fonction, Antibiotics-producing *Streptomyces*", Vol IX, volume eds by QUEENER S. W. and Day L. E. eds by SOKATCH J. R. and ORNSTON L. N. Ac Press, pp. 335-401.
- CULTER H. G. (1988) Natural products and their potential in agriculture. In : "Biologically active natural products-potential use in agriculture". CULTER, H G ed., American Chemical Society, Washington. pp. 1-22.
- DAVID L., LOUTHEILLER H., BAUCHART O., AUOIRON. S. et ASSELINEAU J. (1992) Effects of exogenous methyl oleate on the biosynthesis of nigericin, a polyether carboxylic antibiotic, by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. Biosci. Biotech. Biochem. **56**, 330-336.
- DEMAIN A. L. (1963) Biosynthesis of cephalosporin C and its relation to penicillin formation. Trans New York Acad Sci, Series II **25**, 731-742.
- DEMAIN A L. (1982) Catabolite regulation in industrial microbiology. In : "Overproduction of microbial products". KRUMPHANZL V., SIKYTA B., VANEK Z. eds., Academic Press, London. pp. 3-19.
- DEMAIN A. L., AHARONOWITZ Y. et MARTIN J. F. (1983) Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In : "Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics". VINING L. C. Ed, Addison Wesley, London. pp. 49-72.
- DENEUVILLE F. (1991) Génie fermentaire. 2^{ème} chapitre : Production de spiramycine par *S. ambofaciens*. pp. 233-249.
- DIETZ G. W. et HEPPEL A. (1971) 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate. J. Biol. Chem. **246**, 2881-2884.
- DOTZALF J. E., MANDZGER L. S. et FOGLESONG M. A. (1984) Incorporation of amino-acid derived carbon into tylactone by *Streptomyces fradiae* GS. Antimicrob. Agents Chemother. **25**, 216-220.
- DOULL J. L. et VINING L. C. (1990) Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) : suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**, 449-454.
- DREW S. W. et DEMAINE A. L. (1973) Methionine control of cephalosporin C formation. Ann. Rev. Microbiol. **31**, 743-754.
- DREW S. W., WINSTANLEY D. J. et DEMAINE A. L. (1976) Effect of norleucine on mycelial fragmentation in *Cephalosporium acremonium* . Appl. Environ. Microbiol. **31**, 153-145.
- DUTTON M. F. (1988). Enzymes of aflatoxine biosynthesis. Microbiol. Rev. **52**, 274-295.
- ENSIGN J. C. (1978) Formation, properties and germination of *Actinomycete* spores. Ann. Rev. Microbiol. **32**, 185-219.
- ESCALANTE L., LOPEZ H., MATEOS R., DEL G., LARA F. et SANCHEZ S. (1982) Transient repression of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. J. Microbiol. **128**, 2011-2023.
- FERNANDEZ P. B. (1987) The macrolide revival : thirty five years after erythromycin. Antimicrob. News Lett. **4**, 25-34.

- FLORENT J. (1983) Production industrielle d'un antibiotique. *Biofutur*. **17**, 31-34.
- FLORES M. E. et SANCHEZ S. (1985) Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**, 191-194.
- FLOSS H. G. (1987) Hybrid antibiotics-the contribution of the new gene combinations. *Tibtech*. **5**, 111-115.
- FOSTER J. W. (1949) Inoculation. In : "The chemical activities of fungi". GOTTLEIB D. ed., Academic Press, London. pp. 66-75.
- FRIEBEL T. E. et DEMAIN A. L. (1977) Oxygen-dependent inactivation of gramicidin S synthetase in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **130**, 1010-1016.
- FROST A. et SULLIVAN A. Inc. (ed) (1984) Fermentation market. pp. 81-125
- FROYSHOV O. et LALAND S. G. (1974) On the biosynthesis of bacitracin by soluble enzyme complex from *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* **46**, 235-242.
- FURAMAI T., TAKEDA K. et SUZUKI M. (1975) Studies on the biosynthesis of basic 16 membered macrolide antibiotic, platenomycins IV. *J. Antibiot.* **28**, 789-797.
- GALDEK A. et ZAKRZEWSKA J. (1984) Genome size of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 73-76.
- GERSCH D., SHURK A. et RÖMER W. (1979) Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Streptomyces hygroscopicus* and its reversal by cyclic AMP. *Arch. Microbiol.* **121**, 91-96.
- GRAFE U., REINHARDT G., SCHADE W., KREBS D., ERITT I. et FLECK W. F. (1982a) Isolation and structure of novel autoregulators from *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* **35**, 609-614.
- GRAFE U., SCHADE W., ERITT I. et FLECK W. F. (1982b) A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptococcus viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **34**, 1385-1395.
- GRAFE U., REINHARDT G., SCHADE W., ERITT I., FLECK W. F. et RADICS L. (1983). Interspecific inducers of cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis from *Streptomyces bikiniensis* and *S. cyaneofuscatus*. *Biotechnol. Lett.* **5**, 591-596.
- GRAY P. P. (1987) Tylosin. In : "Comprehensive Biotechnology", ed In chief MURRAY MOO-YOUNG, Vol 3, eds by BLANCK H. W., DREW S. and WANG DIC, pp. 83-93.
- GRAY P. P. et BHUWATHANAPUN S. (1980) Production of the macrolide antibiotic tylosin in batch and chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 1785-1804.
- GRAY P. P. et VU-TRONG K. (1987) Production of the macrolide et tylosin in cyclic fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 33-40.
- GRISWOLD B. C., HUMOLLER F. L. et MAC INTYRE A. R. (1951) Inorganic phosphate and phosphate ester in tissue extracts. *Anal. Chem.* **23**, 192-194.
- HAAVIK H. I. (1974) Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 321- 326.
- HANSON R. S. et PHILLIPS J. A. (1981) Chemical composition. In : "Manual of methods for general microbiology". American Society for Microbiology, eds by GERHARDT and coll. pp. 328-330.
- HEROLD M. et HOSTALEK Z. (1965) In : "Biogenesis of Antibiotic Substances" VANEK Z. and HOSTALEK Z (eds) Prague : Academia , pp. 93-101.

- HIRSCH C. F. et MAC CANN- MAC CORMICK P. A. (1985)** Biology of *Streptomyces* In : "Biology of industrial microorganism" Biotechnology series 1985, eds by DEMAINE A. L. and SOLOMON N. A. The Bengamin Cummings Publishing Company Inc, London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney, Tokyo. Advanced Book Program. pp. 291-314.
- HOPWOOD D. A. (1982)** Genetic manipulation in *Streptomyces*. Proceeding 4th Symp. genetics of industrial microorganisms. IKANDA Y. and BEPPU T. eds pp. 67-90.
- HOPWOOD D. A. et SHERMAN D. H. (1990)** Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Ann. Rev. Genet.* **24**, 37-66.
- HOPWOOD D. A. et SERMONTI G. (1962)** The genetics of *Streptomyces coelicolor*. *Advan. Genet.* **11**, 273-342.
- HOPWOOD D. A., MALPARTIDA F. et CHATER K. F. (1986)** Gene cloning to analyse the organisation and expression of antibiotic biosynthesis genes in *Streptomyces*. In : "Regulation of secondary metabolite formation". KLEINKAUF H., VON DOHREN H., DORNAUER H., NESEMANN G. eds., VCH, Weinheim. pp. 23-33.
- HOPWOOD D. A., MALPARTIDA F., KIESER H. M., IKEDA H., DUNCAN J., FUJI I., RUDD B. A. M., FLOSS H. G. et OMURA S. (1985)** Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering. *Nature.* **314**, 642-644.
- HOSTALEK Z. (1964)** Relationship between the carbohydrate metabolism of *Streptomyces aureofaciens* and the biosynthesis of chlortetracycline. I. The effect of interrupted aeration, inorganic phosphate and benzyl thiocyanate on chlortetracycline biosynthesis. *Folia. Microbiol.* **9**, 78-86.
- HSEIH D. P. H. et MATELE S. (1970)** The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **208**, 482-486.
- HU W. S., BRANA A. F. et DEMAINE A. L. (1984)** Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microbiol. Technol.* **6**, 155-160.
- HUBER F. M., PIEPER R. L. et MERTZ F. P. (1987)** Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 235-241.
- HUNAITI A. R. et KOLATTUKUDY E. P. (1982)** Isolation and characterization of an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 362-371.
- HUTTER R. (1986)** Overproduction of microbial metabolites. In : "Biotechnology." Vol. 4. PAPE H., REHM H. J., eds, VCH, Weinheim pp. 3-17.
- HUTTER R. A. et ECKHARDT T. (1988)** Genetic manipulation. In : "*Actinomycetes* in biotechnology". GOODFELLOW M., WILLIAMS S. T., MORDARSKI M. eds., Academic Press, London . pp. 89-184.
- HUTTER R. et HINTERMANN G. (1985)** Genetic instability in *Streptomyces* ". In : "Industrial aspects of biochemistry and genetics. ALADDINOGLU N. G., DEMAINE A. L., LANCINI G. eds, Plenum Press, New York. pp. 27-34.
- IKEDA H., SENO E. T., BRUTON C. J. et CHATER K. F. (1984)** Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 501-508.
- INGRAHAM J. L., MAALOE O. et NEIDHARDT F. C. (1983)** Regulation at the whole cell level. In : "Growth of the bacterial cell". INGRAHAM J. L., MAALOE O., NEIDHARDT F. C. eds., Sinauer Associates Inc., Sunderland. pp. 349-385.
- JAKUBCZAK E. et LECLERC H. (1980)** Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence : étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.* **38**, 297-304.

- JANGLOVA Z., SUCHY J. et VANEK Z. (1969) Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. VII. Intracellular adenosine-5'-triphosphate concentration in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia. Microbio.* **14**, 208-215.
- JENSEN S. E. et WESTLAKE D. W. S. (1989) Immobilization of bêta-lactam synthesizing enzymes. *J. Ind. Microbiol.* **30**, 113-119.
- JOHNSON M. J. (1952) Recent advances in penicillin fermentation. *Bull. WHO.* **6**, 99-121.
- KALAKOUTSKI L. V. et AGRE N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation in *Actinomycetes*. *Bacteriol. Rev.* **40**, 465-524.
- KAWAGUCHI T., ASAKI T., SATOH T., OUZUMI T. et BEPPU T. (1984) B-factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in a *Nocardia* sp. *J. Antibiot.* **37**, 1587-1595.
- KENDRICK K. E. et ENSIGN J. C. (1983) Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged cultures. *J. Bacteriol.* **155**, 357-366.
- KENNEL Y. M. et DEMAÏN A. L. (1978) Effect of carbon sources on β -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. *Exp. Mycol.* **2**, 234-238.
- KHAOUA S. (1990) Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.
- KHAOUA S., LEBRIHI A., LAAKEL M., SCHNEIDER F., GERMAIN P. et LEFEBVRE G. (1992) Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 763-767.
- KHOKHLOV A. S., ANISOVA L. N., TOVAROVA I. I., KLEINER E. Y., KOVALENKO I. V., KRASILNIKOVA O. I., KORNITSKAYAE Y. et PLINERS A. (1973) Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*, not producing this factor. *Z. Allg. Mikrobiol.* **13**, 647-655.
- KHOKHLOV A. S. et TOVAROVA I. I. (1979) Autoregulator from *Streptomyces griseus*. In : "Regulation of secondary product and plant hormone metabolism". LUKNER M., SCHREIBER K. eds, Pergamon Press, Oxford. pp. 133-145.
- KIRST H. A., WILD G. M., BALTZ R. H., HAMILL R. L., OTT J. L., COUNTER F. T et OSE E. E. (1982) Structure-activity studies among 16 membered antibiotics related to tylosin. *J. Antibiot.* **35**, 1675-1682.
- KITAO C., IKEDA H., HAMADA H. et 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.
- KLEINER E. M., PLINER S. A., SOIFER V. S., ONOPRIENKO V. V., BALASHOVA T. A., ROSYNOV B. V. et KHOKHLOV A. S. (1976) The structure of A-factor bioregulator from *Streptomyces griseus*. *Bioorg. Khim.* **2**, 1142-1147.
- KOEPSSEL R. et ENSIGN J. C. (1984) Microcycle sporulation of *Streptomyces viridochromogenes*. *Arch. Microbiol.* **140**, 9-14.
- KONDO S., YASUI K., NATSUME M., KATAYAMA M. et MARUMO S. (1988) Isolation, physico-chemical properties and biological activity of panamycin-607, an aerial mycelium inducing substance from *Streptomyces alboniger*. *J. Antibiot.* **41**, 1196-1234.
- KUSTER E. ET NEUMEIR W. (1981) Halotolerance in some Streptomycetes producing tetracyclines. *Zbl. Bakt. Suppl.* **11**, 315-319.
- KUZDZAL-SAVOIE S. et LEBON F. (1971) Extraction of butterfat from liquid or dried milk. *Tech. Lait.* **690**, 12-13.

- LAAKEL M.** (1992) Biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Régulation de la biosynthèse et caractérisation de l'acétate kinase et des systèmes fournisseurs du malonyl-coA. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.
- LAEMMLI W. K. et FAVRE M.** (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I : DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599.
- LAMSAÏF D.** (1992) Effets des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.
- LANCINI G. et GRANDI M.** (1981) Biosynthesis of ansamycins. In : "Antibiotics biosynthesis" Vol 4, Corcoran J. W., Ed, Springer-Verlag, Berlin, FRG. pp. 12-19.
- LARPENT J. P. et SANGLIER J. J.** (1989) Biotechnologie des antibiotiques. Ed. MASSON, Paris.
- LEBRIHI A., GERMAIN P. et LEFEBVRE G.** (1987) Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 44-51.
- LEBRIHI A., LEFEBVRE G. et GERMAIN P.** (1988) Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 44-51.
- LEBRIHI A., LAMSAÏF D., LEFEBVRE G. et GERMAIN P.** (1992) Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 382-387.
- LIEFKE E., KAISER D. et ONKEN U.** (1990) Growth and product formation of Actinomycetes cultivated at increased total pressure and oxygen partial pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 674-679.
- LILLEY G., CLARK A. E. et LAWRENCE G. C.** (1981) Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **31**, 127-134.
- LIRAS P., VILLANUEVA J. R. et MARTIN J. F.** (1977) Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candicidin formation in *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 269-277.
- LIRAS P., ASTURIAS J. A. et MARTIN J. F.** (1990) Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Tibtech.* **8**, 184-189.
- LOCCI R. et SHARPLES G. P.** (1984) Morphology. In : "The biology of Actinomycetes." GOODFELLOW M., MORDARSKI M., WILLIAMS S. T. eds, Academic Press, London. pp. 165-199.
- LOWRY O., ROSENBROUGH N., FARR A. et RANDAL L.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- LUBBE C., WOLFE S. et DEMAÏN A. L.** (1985) Repression and inhibition of cephalosporin synthetase in *Streptomyces clavuligerus* by inorganic phosphate. *Arch. Microbiol.* **140**, 317-326.
- MAC CANN P. A. et POGELL B. M.** (1979) Panamycin : a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J. Antibiot.* **32**, 673-678.
- MADRY N. et PAPE H.** (1982) Formation of secondary metabolism enzyme in the tylosin producer *Streptomyces* T59-235. *Arch. Microbiol.* **131**, 170-173.
- MADRY N., SPRINKMEYER D. et PAPE H.** (1979) Regulation of tylosine synthesis in *Streptomyces* : effect of glucose analogs and inorganic phosphate. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 365-370.
- MAJUMDAR M. K. et MAJUMDAR S. K.** (1970) Isolation and characterization of three phosphoamido-neomycins and their conversion into neomycin by *Streptomyces fradiae*. *Biochem. J.* **120**, 271-275.

- MAJUMDAR M. K. et MAJUMDAR S. K. (1971) Synthesis of neomycin by washed mycelium of *Streptomyces fradiae* and some physiological consideration. *Folia. Microbiol.* **16**, 285-292.
- MALIK V. S. (1980) Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem. Sc.* **2**, 68-72.
- MALIK V. S. (1982) Genetics and biochemistry of secondary metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.* **28**, 27-115.
- MALIK V. S. (1986) Genetics of secondary metabolism. In : "Biotechnology". Vol. 4. PAPE H., REHM H. J. eds., VCH, Weinheim. pp. 39-68.
- MARTIN J. F. (1977) Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Engineer.* **6**, 105-127.
- MARTIN J. F. (1979) Nonpolyene macrolide antibiotics. In : "Economic microbiology" Vol 3, Secondary products of metabolism, ed by ROSE A. H. Ac Press. pp. 239-291.
- MARTIN J. F. (1989) Regulation of secondary metabolism in *Actinomycetes*. SHAPIRO S., Ed, CRC Press, Boca Raton F. L.
- MARTIN J. F. et DEMAINE A. L. (1977) Effect of exogenous nucleotides on the candidin fermentation. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1334-1339.
- MARTIN J. F. et DEMAINE A. L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251.
- MARTIN J. F. et LIRAS P. (1989) Organisation and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**, 173-206.
- MARTIN J. F., DAZA A., ASTURIAS J. A. et LIRAS P. (1988) Transcriptional control of antibiotic biosynthesis at phosphate-regulated promoters and cloning of a gene involved in the control of the expression of multiple pathways in *Streptomyces*. In : "Biology of *Actinomycetes* ." Eds. Japan Scientific Societies Press. pp. 424-430.
- MASSEY L. K., SOKATCH J. R. et CONARD S. R. (1976) Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 42-54.
- MASUMA R., TANAKA Y. et OMURA S. (1983) Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. *J. Ferment. Technol.* **61**, 607-614.
- MASUMANE S., BATES G. S. et CORCORAN J. W. (1977) Macrolides Recent progress in chemistry and biochemistry. *Angew. Chem. Ind. Ed. Engl.* **16**, 585-607.
- MATTEO C. C., COONEY C. L. et DEMAINE A. L. (1976) Production of gramicidin S synthetases by *Bacillus brevis* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 415-422.
- MAUR A. et NEWMAN A. (1990) Vade-mecum des antibiotiques. 5^{ème} édition. pp. 811-818.
- MAYFIELD C. I., WILLIAMS S. T., RUDDICK S. M. et HATFIELD H. L. (1972) Studies of the ecology of *Actinomycetes* in soil. IV, Observation on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil. Biol. Biochem.* **4**, 79-89.
- MERTZ F. P. et DOOLIN L. E. (1973) The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin. *Can. J. Microbiol.* **19**, 263-270.
- MEYRATH J. et SUCHANEK G. (1972) Inoculation techniques-Effect due to quality and quantity of inoculum. *Methods. Microbiol.* **7B**, 159-209.
- MILLER A. L. et WALKER J. (1970) Accumulation of streptomycin-phosphate in culture of streptomycin producers grown on a high-phosphate medium. *J. Bacteriol.* **104**, 8-12.

- MILLER G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-429.
- MILLER L. K., LINGG A. J. et BULLA L. A. (1983) Bacterial, viral, and fungal insecticides. *Science*. **219**, 715-721.
- MIYAIRI N., MIYOSHI T., AOKI H., KOHSAKA M., IKUUSHIMA H., KUNUGITA K., SAKAI H. et IMANAKA H. (1970) Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B. *J. Antibiot.* **23**, 113-119.
- MUNDY C. et KUHN K. P. (1991) Modeling and parameter identification for batch fermentation with *Streptomyces tendae* under phosphate limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 306-311.
- NEUZIL J. et HOSTALEK Z. (1986) Enzymes of secondary metabolism and the biosynthesis of macrolide antibiotics. *Folia Microbiol.* **31**, 402-421.
- NINET L. et VERRIER J. (1960) Production of spiramycin. United States Patent Office, 2, 943, 023. June 28.
- NOVIKOVA L. M. et MAKAREVICH V. G. (1984) Interrelationship of dehydrogenase activity of mycelium of *Streptomyces aureofaciens* and its capacity for tetracycline biosynthesis. *Antibiotiki*. **29**, 735-740.
- O'HAGAN D., ROBINSON J. A. et TURNER A. L. (1983) Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin : origin of the oxygen atoms in tylactone. *Chem. Soc. Commun.* **19**, 1337-1340.
- OCHI K. (1986) Occurrence of the stringent response in *Streptomyces sp.* and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2621-2631.
- OCHI K. (1987) Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus* : significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *J. Bacteriol.* **169**, 3608-3616.
- OCHI K. (1988) Nucleotide pools and stringent response in regulation of *Streptomyces* differentiation. In : "Proceeding of seventh international symposium on biology of *Actinomycetes*". OKAMI Y., BEPPU T., OGAWARA H. eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 303-337.
- OCHI K. et OHSAWA S. (1984) Initiation of antibiotic production by the stringent response of *Bacillus subtilis*. *Marburg. J. Gen. Microbiol.* **130**, 2473-2482.
- OKANISHI M. et HOTTA K. (1980) Regulation of antibiotics production in microorganisms. In : "Molecular breeding and genetics of applied microorganisms". SAKAGUSHI K., OKANISHI M. eds., Academic Press, New York. pp. 9-28.
- OMURA S. (1976) The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol. Rev.* **40**, 681-697.
- OMURA S. (1986a) Philosophy of new drug discovery. *Microbiol. Rev.* **50**, 259-279.
- OMURA S. (1986b) Introduction. In : "The bacteria. A treatise on structure and fonction, Antibiotics-producing *Streptomyces*", Vol IX, volume eds by QUEENER SW and DAY L. E. eds by SOKATCH J. R. and ORNSTON L. N. Ac Press, XVII-XXI.
- OMURA S. et NAKAGAWA A. (1981) Biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics. In : "Antibiotics" Vol IV. Biosynthesis, ed by CORCORAN J. W. Springer Verlag L. C. pp. 179-206.
- OMURA S. et TAKESHIMA H. (1974) Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin. *J. Biochem.* **75**, 193-195.

- OMURA S. et TANAKA Y. (1986a) Macrolide antibiotics. In : REHM H. J., REED G(eds) Biotechnology, Vol 4. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft. pp. 359-591.
- OMURA S. et TANAKA Y. (1986b) Biosynthesis of tylosin and its regulation by ammonium and phosphate. In : "Regulation of secondary metabolite formation", eds by KLEINKAUF H., VON DÖHREN H., DORMAUER H. and NESEMANN G. pp. 305-332.
- OMURA S., NAKAGAWA A., TAKESHIMA H., MIYAZAWA J. et KITAO C. (1975) A ^{13}C nuclear magnetic study of 16-membered macrolide antibiotic tylosin. *Tetrahedron. Lett.* **50**, 4503-4506.
- OMURA S., TAKESHIMA H., NAKAGAWA A., KANEMOTO N. et LUKACS G. (1976) Studies in carboxylic acid metabolism in a macrolide-producing micro-organism using carbone-13 magnetic resonance. *Bioorg. Chem.* **5**, 451-454.
- OMURA S., TAKESHIMA H., NAKAGAWA A., MIYAZAWA J. et LUKACS G. (1977) Studies on the biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem.* **16**, 2860-2866
- OMURA S., KITAO C., MIYAZAWA J., IMAI H. et TAKESHIMA H. (1978) Bioconversion and biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics, tylosin using enzyme inhibitor cerulenin. *J. Antibiot.* **31**, 254-256.
- OMURA S., KITAO C., HAMADA H. et IKEDA H. (1979) 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., TANAKA Y., TAKAHASHI H. et IMAI Y. (1980a) Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J. Antibiot.* **33**, 1568-1569.
- OMURA S., TANAKA Y., KITAO C., TANAKA H. et IWAI Y. (1980b) Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**, 691-695.
- OMURA S., TAZAKI K., TANAKA Y., SAKAKIBAWA H., AIZAWA M. et LUKACS G. (1983a) Valine is a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone. *J. Antibiot.* **36**, 614-616.
- OMURA S., TANAKA T., HAMADA H. et MASUMA R. (1983b) Ammonium ion suppresses the biosynthesis of tylosin aglycone by interference with valine catabolism in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* **36**, 1792-1794.
- OMURA S., TAKI A., MATSUDA K. et TANAKA Y. (1984a) Ammonium ions suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in the mutant of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* **37**, 1362-1369.
- OMURA S., TANAKA Y., HAMADA H. et MASUMA R. (1984b). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* **37**, 494-502.
- OMURA S., TOMADO H., YAMAMOTO S., TSUKUI M. et TANAKA H. (1984c) Studies on two dioxygenases involved in the synthesis of tylosin in *Streptomyces fradiae*. *Bioch. Biophys. Acta.* **802**, 141-147.
- PAPE H. et BRILLINGER G. (1973) Stoffwechsel produkte von mikroorganism. 13. Mitt. Biosynthese von thymidin-diphospho-mycarose durch ein Zellfreies System aus *Streptomyces rimosus*. *Arch. Mikrobiol.* **88**, 25-35.
- PEROZ-COLLIGNON A. (1993) Biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens* : études cinétiques en discontinu et semi-continu de l'influence de précurseurs du platénolide en présence de glycérol. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.

PINNERET-SINDICO S. (1954) Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques. *S. ambofaciens*.n. sp. Caractères culturels. Ann. Inst. Past. **87**, 702-707.

PIRET J. M. et DEMAINE A. L. (1988) *Actinomycetes* in biotechnology : an overview. In : "Actinomycetes in biotechnology". GOODFELLOW M., WILLIAMS S. T., MORDARSKI M. eds., Academic Press, London. pp. 461-482.

PIRT S. J. et RIGHELATO R. C. (1967) Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum* in batch and chemostat cultures. Appl. Microbiol. **15**, 1234-1250.

POKORNY M., VITALE L., TURK V., RENKO M. et ZUVANIC J. (1979) *Streptomyces rimosus* extracellular protease : (1) Characterization and evaluation of various crude preparation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8**, 81-90.

PRADET A. (1967) Etude des adénosine-5'-mono, di et tri-phosphates dans les tissus végétaux. I. Dosage enzymatique. Physiol. Vég. **5**, 209-221.

PRYEDZ H. et FROHOLM L. O. (1964) The use of a recording Beckman DB spectrophotometer for the assay of ATP with luciferin-luciferase reagent. Acta. Chem. Scand. **18**, 58-63.

RACZYNSKA-BOJANOWSKA K., RUCZAJ Z., SAWNOR KORSZYNSKA D. et RAFALSKI A. (1973) Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **3**, 162-167.

REYNOLDS K. et ROBINSON J. A. (1985) Biosynthesis of monensin. The intra-molecular rearrangement of isobutyryl-CoA to n-butyryl-CoA. J. Chem. Soc. Chem. Commun. **21**, 1831-1832.

REYNOLDS K., O'HAGAN D., GANI D. et ROBINSON J. (1988) Butyrate metabolism in *Streptomyces*. Characterisation of an intramolecular vicinal interchange. J. Chem. Perkin. Trans I, pp. 3195-3207.

REZANKA T., REICHELOV A. et KOPECK Y. (1991) Isobutyrate as a precursor of n-butyrate in the biosynthesis of tylosine and fatty acids. FEMS Microbiol. Lett. **84**, 33-36.

RINEHART K. L. (1977) Mutasyntesis of new antibiotics. Pure and Appl. Chem. **49**, 1361-1384.

ROBBERS J. E., ROBERTSON L. W., HORNE MANN K. M., JINDRA A. et FLOSS H. G. (1972) Physiological studies on ergot : Further studies on the induction of alkaloid synthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate. J. Bacteriol. **112**, 791-796.

ROBERTS G. et LEADLAY P. F. (1984) Use of [³H] tetrahydrocerulenin to assay condensing enzyme activity in *Streptomyces erythreus*. Biochem. Soc. Transac. **12**, 642-643.

ROLLINS M. J., JENSEN S. E. et WESTLAKE D. W. S. (1988) Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. Ind. Microbiol. **3**, 357-364.

ROLLINS M. J., JENSEN S. E. et WESTLAKE D. W. S. (1989) Regulation of antibiotic production by iron and oxygen during defined medium fermentations of *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**, 309-316.

ROMERO J., LIRAS P. et MARTIN J. F. (1986) Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**, 892-897.

ROSSNER E., ZEECK A. et KONIG W. A. (1990) Elucidation of the structure of hormaomycin. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **29**, 64-65.

ROUVEIX B., FAURISSON F. et PANYON B. (1988) Macrolides. In : "Pharmacologie clinique. Bases de la thérapeutique", 2^{ème} édition, eds by GIROUD J. P. et coll. Expansion Scientifique Française. pp. 1446-1457.

- RUDAKOVA A. V. et MALKOV M. A. (1987) Characteristics of oleandomycin-producing organism inoculum at various levels of antibiotic biosynthesis. *Antibiot. Med. Biotechnol.* **32**, 434-437.
- SANKARAN L. et POGELL B. M. (1975) Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger* regulation and properties of O-demethylpuromycin O-methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 721-732.
- SATO K., NIHIRA T., SAKUDA S., YANAGIMOTO M. et YAMAD Y. (1989) Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces sp.* FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* **68**, 170-173.
- SATOH A., OGAWA H. et SATOMURA Y. (1976) Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis *Agric. Biol. Chem.* **40**, 191-196.
- SCHEIDEGGER A., KUENZI M. T., FIECHTER A. et NUESCH J. (1988) Effect of glucose and oxygen on β -lactam biosynthesis by *Cephalosporium acremonium*. *J. Biotechnol.* **7**, 131-140.
- SCHINDELMEISER J. et PAPE H. (1981) Relationship between macrotetrolide production and specific activity of some hydrolases in a high and low producing strain of *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 216-221.
- SCHWAB H. (1988) Strain improvement in industrial microorganism by recombinant DNA techniques. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **37**, 130-138.
- SCRIBNER H. E., TERRY T. et BRADLEY S. G. (1973) Production of a sporulation pigment by *Streptomyces venezuelae*. *Appl. Microbiol.* **25**, 873-879.
- SELWYN S. (1979) Pioneer work on the "penicillin phenomenon". *J. Antimicrobiol. Chemother.* **5**, 249-255.
- SENO E. J. et BALTZ R. H. (1981) Properties of S-adenosyl-L-methionine : macrocin O-mandhyltransferase in extracts of *Streptomyces fradiae* strains which produce normal or elevated levels of tylosin and in mutants blocked in specific O-methylations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 370-377.
- SERMONTI G. et LANFALONI L. (1982) Antibiotic genes -Their assemblage and localisation in *Streptomyces*. In : "Overproduction of microbial products". KRUMPHANZL V., SIKYTA B., VANEK Z. eds., Academic Press, London. pp. 485-497.
- SMITH G. M. et CALAM C. T. (1980) Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.* **2**, 261-266.
- SMITH J. E. (1986) Concepts of industrial antibiotic production. In : "Perspectives in biotechnology and applied microbiology". ALANI D. I. MOO-YOUNG M. eds., Elsevier Applied Sciences publications, London. pp. 105-142.
- STREHLER B. L. et TOOTTER J. R. (1952) Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. In "Firefly luminescence and bioenergetics". pp. 28-41.
- SUZUKI T., YAMANE T. et SHIMIZU S. (1987) Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat modal feeding of multi-substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 526-531.
- SWADA Y., KONOMI T., SOLOMON N. A. et DEMAINE A. L. (1980) Increase in activity of β -lactam synthetases after growth of *Cephalosporium acremonium* with methionine or norleucine. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 281-284.
- SZABO G., BEKESI I. et VITALIS S. (1967) Mode of action of factor C, a substance of regulatory function in cytodifferentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* **145**, 159-165.
- TAKESHIMA H., KITAO C. et 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. et OMURA S. (1986) Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. Antibiot. **39**, 813-821.
- TRILLI A., CROSSELEY M. V. et KONTAKOU M. (1987) Relation between growth and erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. Biotechnol. Lett. **9**, 765-770.
- UNTRAU S., LEBRIHI A., GERMAIN P. et LEFEBVRE G. (1992) Lysine catabolism in *Streptomyces ambofaciens* producer of macrolide antibiotic, spiramycin. Current Microbiol. **25**, 313-318.
- UNTRAU-TAGHIAN S. (1993) Etude de l'influence de différentes sources d'azote minérales et organiques et de la vitesse de croissance sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.
- VANCURA A., REZANKA T., MARSALEK J., VANCURA I., KRISTAN V. et BASAROVA G. (1987) Effect of ammonium ions on the composition of fatty acids in *Streptomyces fradiae* producer of tylosin. FEMS Microbiol. Lett. **48**, 357-360.
- VANCURA A., REZANKA T., MARSALEK J., MELZUCH K., BASAROVA G. et KRISTAN V. (1988) Metabolism of L-threonine and fatty acids and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. FEMS Microbiol. Lett. **49**, 411-415.
- VANDAMME E. J. (1984) Antibiotic search and production : an overview. In : "Biotechnology of industrial antibiotics". VANDAMME E. J. ed., Marcel Dekker Inc., New York. pp. 3-31.
- VANDAMME E. J., LEYMAN D., DE VISSCHER P., DE BUYSER D. et VANSTEENKISTE G. (1981) Effect of aeration and pH on gramicidin S production by *Bacillus brevis*. J. Chem. Tech. Biotechnol. **31**, 247-257.
- VIDEAU D. et JONCHERE H. (1957) Sur une modalité particulière d'action de la spiramycine *in vitro*. Ann. Inst. Pasteur. **92**, 202-211.
- VINING L. C. (1986) Secondary metabolism, In : "Biotechnology", Vol 4 (Microbial Products II) REHM H. J. and REED G. Eds, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, FRG. pp. 19-38.
- VINING L. C. et DOULL J. L. (1988) Catabolite repression of secondary metabolism in *Actinomycetes*. In : "Proceedings of seventh international symposium on biology of Actinomycetes". OKAMI Y., BEPPU T., OGAWARA H. eds., Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 406-411.
- VINING L. C., JENSEN S. E., WESTLAKE D. W. S., AHARONOWITZ Y. et WOLFE S. (1987) Cephamycin production and isopenicillin N synthetase activity in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **27**, 240-246.
- VU-TRONG K. et GRAY P. P. (1982) Continuous culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. Biotechnol. Bioeng. **24**, 1093-1103.
- VU-TRONG K. et GRAY P. P. (1984) Stimulation of enzymes involved in tylosin biosynthesis by cyclic feeding profiles in fed-batch cultures. Biotechnol. Lett. **6**, 435-440.
- VU-TRONG K. et GRAY P. P. (1986) Patterns of RNA synthesis in batch and cyclic fed-batch cultures of tylosin-producing *Streptomyces fradiae*. Biotechnol. Lett. **8**, 849-85.
- VU-TRONG K. et GRAY P. P. (1987) Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. Enz. Microbiol. Technol. **9**, 590-593.
- VU-TRONG K., BHUWAPATHANAPUN S. et 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. et GRAY P. P. (1981) Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae* : Phosphate control of tylosin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 209-212.

WALKER J. B. et SKORVAGA M. (1973) Phosphorylation of streptomycin and dihydrostreptomycin by *Streptomyces*. Enzymatic synthesis of different diphosphorylated derivatives. *J. Biol. Chem.* **248**, 2435-2439.

WALKER M. S. et WALKER J. B. (1971) Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidinodeoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino) phosphate. *J. Biol. Chem.* **246**, 7034-7039.

WEBER M. J. (1973) Hexose transport in normal and rous Sarcoma virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **248**, 2978-2983.

WEI-SHOU H., BRANA A. F. et DEMAÏN A. L. (1984) Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibition. *Enzyme Microbiol. Technol.* **6**, 155-160.

WEINBERG E. D. (1973) Secondary metabolism : control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.* **15**, 70-81.

WEINBERG E. D. (1978) Secondary metabolism : regulation by phosphate and trace elements. *Adv. Microbiol. Physiol.* **4**, 1-44.

WEINBERG E. D. (1982) Biosynthesis of microbial metabolites - Regulation by mineral elements and temperature. In : "Overproduction of microbial products". KRUMPHANZL V., SIKYTA. B., VANEK Z. eds., Academic Press, London. pp. 181-194.

WESTLEY J. W. (1981) Polyether antibiotics-biosynthesis. In : "Biosynthesis Antibiotics". Vol 4, CORCORAN J. W., Ed, Springer-Verlag, Berlin, FRG. pp. 41-52.

WHITAKER A. et LONG P. A. (1973) Fungal pelleting. *Process Biochem.* **8**, 27-31.

WOODWARD R. B. (1957) Struktur und Biogenese der Makrolide : eine neue Klasse von Naturstoffen. *Angew. Chem.* **69**, 50-58.

WRIGHT H. M. et HOPWOOD D. A. (1977) A chromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase in *Streptomyces acrimycini*. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 417-421.

YAMADA Y., SUGAMURA K., KONDO K., YANAGIMOTO M. et OKADA H. (1987) The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **40**, 496-504.

YANAGIMOTO M. et TERUI G. (1971a) Physiological studies on staphylomycin production. I. On product inhibition. *J. Ferment. Technol.* **49**, 604-610.

YANAGIMOTO M. et TERUI G. (1971b) Physiological studies on staphylomycin production. II. Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**, 611-618.

YANAGIMOTO M., MATSUMOTO K. et MORI K. (1988) IM2, a new inducer of blue pigment production in *Streptomyces sp* MAFF 10-06015. *J. Ferment. Technol.* **66**, 1-6.

YOUNG H. P., CHUNG T. W. et HAN M. H. (1980) Studies on microbial glucose isomerase : (4) Characteristics of immobilized whole-cell glucose isomerase from *Streptomyces sp*. *Enz. Microbio. Technol.* **2**, 227-233.

ZAHNER H. (1979) What are secondary metabolites ? *Folia. Microbiol.* **24**, 435-443.

ZAHNER H. (1987) Secondary microbial metabolism and biotechnology. In : "Biochemical Engineering". CHIMEL H., HAMMES W. P., BAILEY J. E. eds., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. pp. 36-42.

ZANCA D. M. et MARTIN J. F. (1983) Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. J. Antibiot . **36**, 700-708.

ZHANG J., BANKO G., WOLFE S. et DEMAINE A. L. (1987). Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. J. Ind. Microbiol. **2**, 251-255.

ZHANG J., WOLFE S. et DEMAINE A. L. (1989) Carbon source regulation of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. Current Microbiol. **18**, 361-367.



ANNEXE

SUIVI DE L'EVOLUTION
DE LA MORPHOLOGIE, AU
COURS D'UNE FERMENTATION , DE
STREPTOMYCES AMBOFACIENS
PAR ANALYSE QUANTITATIVE
D'IMAGES

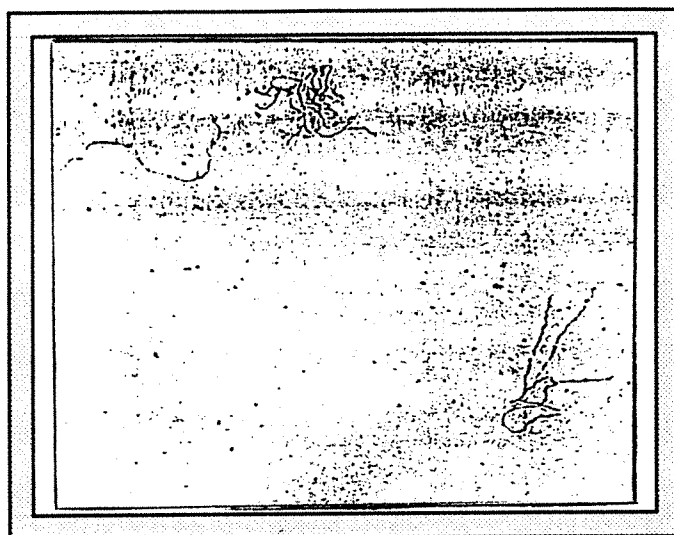
INTRODUCTION

Les microorganismes filamenteux bactériens ou fongiques ont la particularité de se présenter sous diverses morphologies : spores, filaments, filaments enchevêtrés, pelotes. En général ces microorganismes présentent un intérêt commercial par leur production de métabolites secondaires, notamment les antibiotiques. La production de céphalosporine C, par exemple, a été reliée à l'état morphologique de *Cephalosporium acremonium* (Matsumura *et al.*, 1980). En jouant sur la composition du milieu de culture, Byrne et Ward (1989) ont également corrélé la morphologie du *Rhizopus arrhizus* à la production d'un métabolite secondaire.

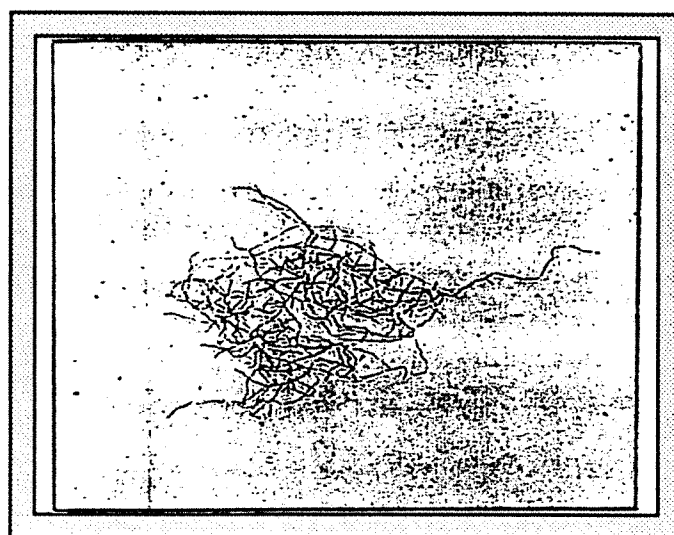
Les actinomycètes cultivés en milieu liquide présentent des formes différentes selon la souche mais aussi selon la taille de l'inoculum, le milieu et les conditions de culture (Whitaker, 1992). Si la corrélation entre morphologie et production de métabolites secondaires était bien établie, il serait intéressant de développer des outils permettant le suivi des morphologies en présence afin d'agir en retour sur les commandes du réacteur pour maintenir l'état morphologique optimal à la production de métabolites. Le suivi de la croissance des formes filamenteuses de microorganismes fongiques par analyse d'images a été réalisé par Packer et Thomas (1990) et si des mesures sur des pelotes (Cox et Thomas, 1992) ont été réalisées, la transition entre filaments et pelotes n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies (Reichl et Gilles, 1991).

Dans le présent travail, en utilisant les techniques quantitatives d'analyse d'images, les différentes formes morphologiques de *Streptomyces ambofaciens* apparaissant au cours d'une fermentation sont classées et quantifiées. Cette étude consiste en un suivi de ces morphologies distinctes en phases de croissance et de production de spiramycine. La population est divisée en trois classes : filaments individualisés, filaments enchevêtrés et pelotes (classification binaire)(Fig. 1). Les influences de la composition du milieu de culture et du mode de préculture (inoculation à partir d'une préculture de 48 h ou directement à partir de spores) sur la morphologie et la production de spiramycine ont été étudiées. La croissance et la production étant fortement dépendantes de la source d'azote, nous avons cherché à déterminer s'il y a une corrélation entre la morphologie, la source d'azote et la production de spiramycine.

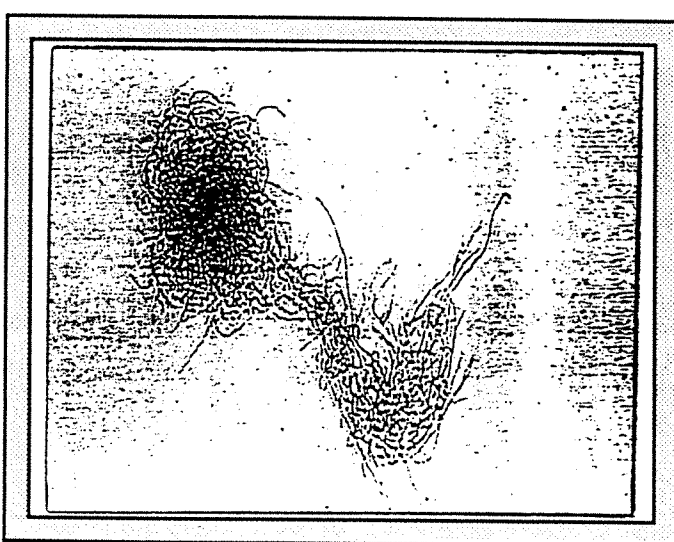
Travail réalisé en collaboration avec M^r Denis PICHON (Laboratoire des Sciences du Génie Chimique).



FILAMENT



ENCHEVETREMENT



PELOTE

Fig. 1. : Images représentatives des trois populations morphologiques déterminées selon la classification binaire.

METHODE D'ANALYSE D'IMAGES

1. Acquisition des images

Les images sont acquises directement par l'intermédiaire d'une caméra vidéo BoschTM (tube Chalnicon), montée sur microscope (Leitz), avec 256 niveaux de gris par le logiciel VisilogTM (Noesis). Les images numériques (au format rectangulaire 512 x 512 pixels) sont traitées par Visilog ou par des programmes développés au laboratoire (TASC) sur station couleur SUN 3/110 (équipée d'une carte d'acquisition MATROX VIP 1024).

2. Analyse des images

Les objectifs de notre étude sont de classer les objets en trois familles morphologiques distinctes : filaments, enchevêtrements et pelotes. La première étape consiste à déterminer le noyau des pelotes. Une ouverture en niveau de gris a pour effet d'intensifier la partie sombre de la pelote correspondant au noyau, plus sombre que la partie filamenteuse. Seuillage, érosion et ouverture donne l'image binaire du noyau (A). Les noyaux des différentes pelotes sont étiquetés par un label (image A lab).

La seconde étape consiste à récupérer la partie filamenteuse des objets par un chapeau haut de forme : l'image résultante B est seuillée sur l'image différence entre l'image fermée et l'image originale. L'image C est le résultat d'un OU logique entre A et B. L'image C est l'image binaire de tous les objets et quelques particules parasites. Une labellisation de C suivie d'une analyse des objets selon leur compacité permet d'effectuer un filtre sur ce paramètre. Le filtre a pour effet d'éliminer les particules parasites de formes sphériques ou ovoïdes. L'image labellisée résultante est dénommée D lab.

L'examen des images A lab et D lab permet le calcul de paramètres qui seront stockés respectivement dans des fichiers ASCII. Une procédure semi-automatique fonctionnant en application dédiée permet le traitement d'un grand nombre d'images.

Un programme de calculs relit les fichiers ASCII et réalise une classification des microorganismes filamenteux en considérant qu'une pelote possède un noyau, qu'un filament est un objet "non pelote" possédant au plus un trou et qu'un enchevêtrement est un "non pelote" possédant plusieurs trous.

Les filaments simples reçoivent alors un traitement spécial. L'image en niveau de gris comportant le filament à étudier est seuillée interactivement ; le filament désiré est alors isolé de l'image par l'utilisation d'un filtre morphologique sur l'aire des objets. L'image résultante est squelettisée, c'est-à-dire que l'on ne conserve qu'une silhouette monopixel du filament binarisé. Les ramifications, dont la taille est inférieure à un nombre défini de pixels, sont éliminées de l'image. Elles correspondent aux artéfacts créés lors du processus de squelettisation, et sont exclues de l'image car elles pourraient être traitées en tant que

ramifications. Le filament squelettisé est alors décomposé, après approximation polygonale, en différents segments dont les coordonnées sont conservées dans un fichier ASCII.

Après ce traitement d'images, un programme écrit en langage C exploite les fichiers créés, et permet le calcul de différents paramètres morphologiques :

- longueur totale du filament.
- longueur du filament principal : par définition, le filament principal est considéré comme étant le plus long chemin que l'on puisse parcourir dans le filament.
- nombre de ramifications - longueur moyenne d'une ramification.
- unité de croissance : définie par la longueur totale du filament divisée par le nombre d'extrémités - degré de ramification.

L'ensemble de la procédure, qui fonctionne en application dédiée, permet de travailler sur un grand nombre de filaments et d'en tirer des informations statistiques.

Les expériences qui vont être décrites dans cette partie ont été réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer. Dans ces conditions de culture, nous pouvons considérer que les forces de cisaillement infligées aux microorganismes sont réduites par rapport au mode de culture en réacteur agité et que l'agitation ne sera pas responsable de la destruction des formes complexes.

RESULTATS

1. Ensemencement par préculture

Les cultures dans deux différentes conditions de milieu sontensemencées avec une préculture de 48 h qui aura pour effet d'apporter des populations à morphologies complexes au début de la culture. Après la dilution de l'inoculum, les filaments qui coexistent avec des formes plus complexes vont produire à leur tour des formes complexes.

Pour cette étude le milieu synthétique de base contenant le glycérol à $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ comme source de carbone a été utilisé. Ce milieu permet ou pas la production de spiramycine selon la source d'azote (valine ou ions ammonium à 50 mM).

1. 1. Milieu contenant la valine comme source d'azote ("milieu producteur")

Les résultats des dosages des concentrations en substrats, en matière sèche et en spiramycine sont présentés dans la Fig. 2. Nous distinguons trois phases : une phase de croissance rapide jusqu'à 48 h, une phase stationnaire jusqu'à 120 h et enfin une phase de déclin. La production de spiramycine débute à 72 h et atteint un maximum à 96 h.

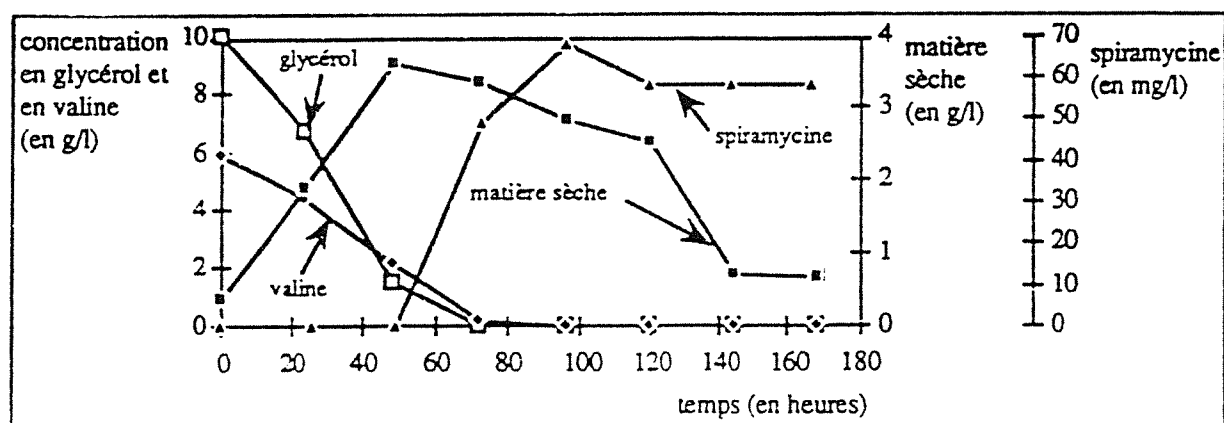


Fig. 2 : Cinétiques de croissance (matière sèche), de consommation du glycérol et de la valine et de production de spiramycine.

1. 1. 1. Contribution de chaque classe morphologique à la biomasse

Une validation statistique a été effectuée pour tous les résultats présentés dans cette étude (D. Pichon, 1994).

Afin de montrer la contribution de chaque classe morphologique à la biomasse, nous avons déterminé la fréquence moyenne en aire de chaque classe par rapport à la population totale. Les résultats sont présentés dans la Fig. 3.

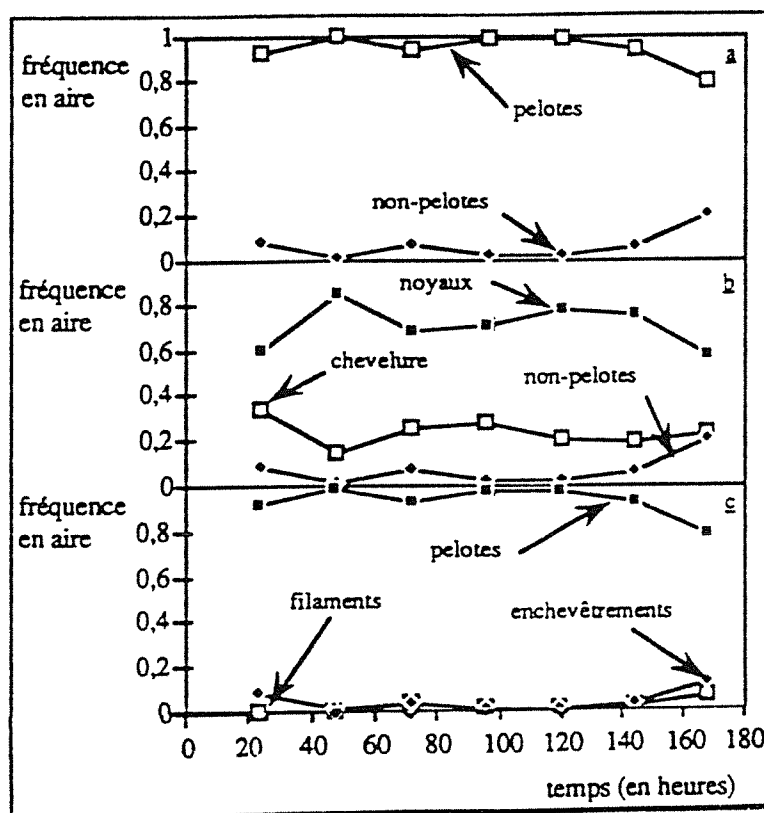


Fig. 3 : Evolution des fréquences en aire des différentes classes morphologiques au cours du temps.

a) fréquence en aire des pelotes et des non-pelotes

b) fréquence en aire des noyaux, chevelures et non-pelotes

c) fréquence en aire des pelotes, filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

Ces résultats montrent que la fraction d'aire occupée par les pelotes, par rapport à l'aire totale de la biomasse, est la plus importante. Le noyau constitue une masse compacte au centre de la pelote et il représente une part importante de son aire. Les non-pelotes ne représentent qu'une part mineure de l'aire occupée par la biomasse, étant donné leur forme plutôt longiligne. Toutefois, la fraction d'aire occupée par les non-pelotes augmente sensiblement en fin de culture.

1. 1. 2. Représentation de la fréquence en nombre de chaque classe

Nous suivons la contribution en nombre de chaque classe par rapport à la population totale au cours du temps (Fig. 4).

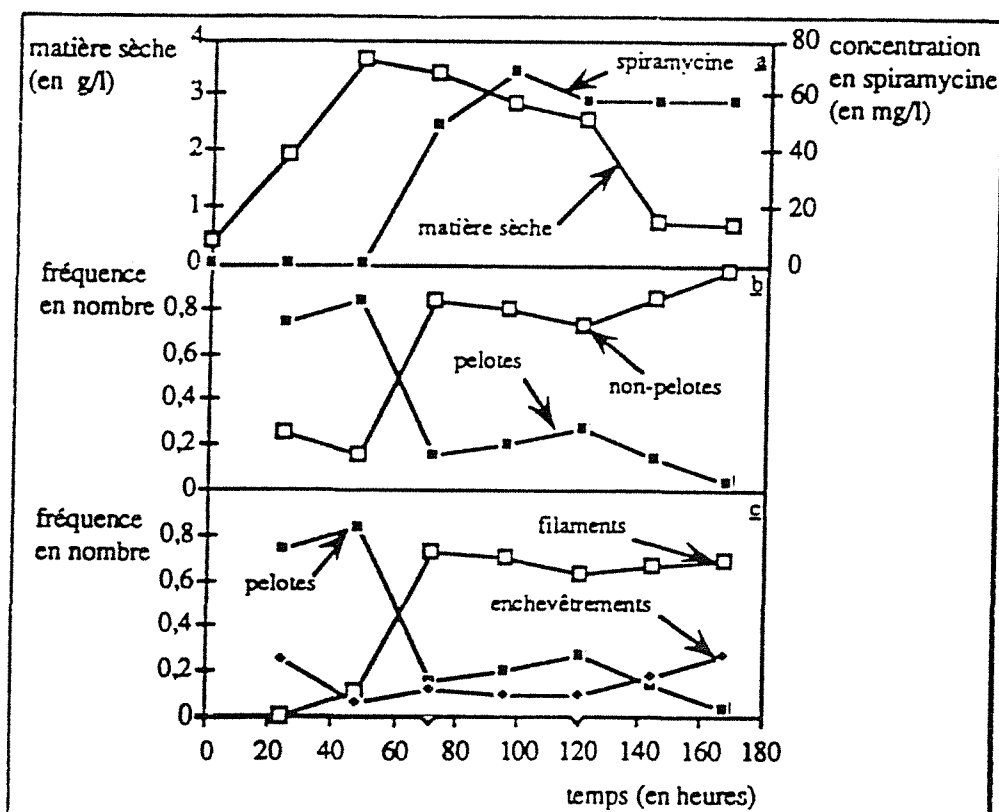


Fig. 4 : Evolution des fréquences en nombre des différentes classes morphologiques au cours du temps

a) évolution des concentrations en spiramycine et en matière sèche

b) fréquence en nombre de pelotes et de non-pelotes

c) fréquence en nombre de filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

Nous remarquons que la fréquence en nombre de pelotes diminue en fin de phase de croissance et cela de façon brutale pour laisser la place à des non pelotes qui vont représenter jusqu'à 80% des individus rencontrés. Cette augmentation de la fréquence en nombre de non-pelotes coïncide avec le début de la production de spiramycine. Nous pouvons affirmer que ce sont les filaments, obtenus par classification binaire qui apparaissent en nombre important au moment ou est produit l'antibiotique, alors que les autres formes plus enchevêtrés demeurent moins nombreuses.

1. 1. 3. Evolution de l'aire moyenne des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupée par le noyau (Fig. 5).

La classification des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupée par le noyau a été réalisée de façon à générer trois classes : pelotes dont le noyau occupe un pourcentage supérieur à 80%, pelotes dont l'aire du noyau occupe 80 à 40% et pelotes dont le noyau occupe moins de 40% de l'aire.

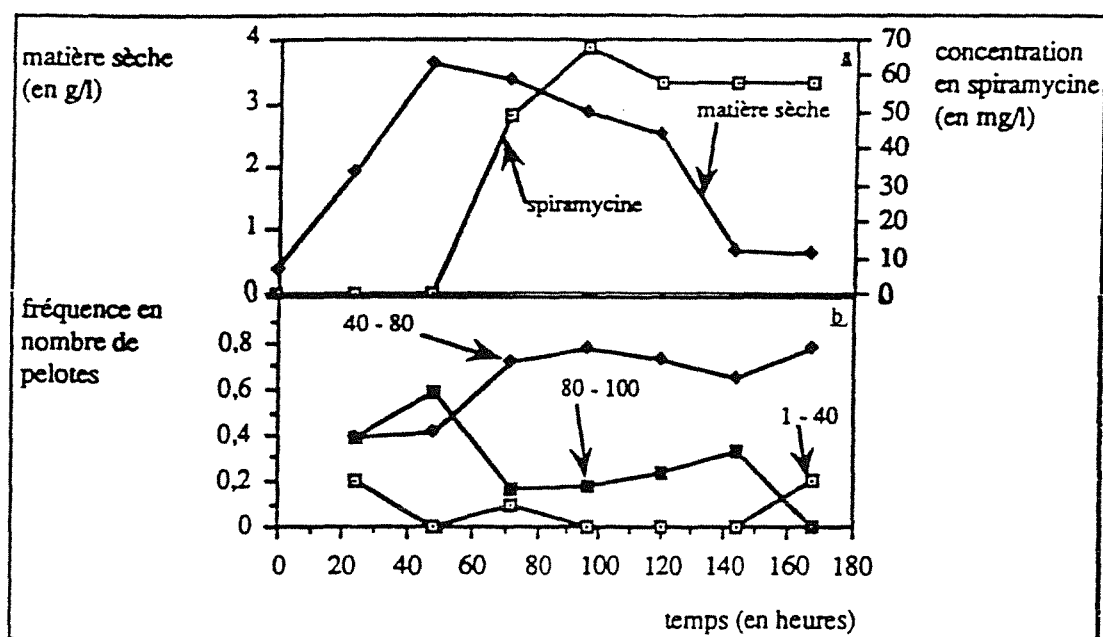


Fig . 5: Evolution des aires moyennes des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupé par le noyau au cours du temps

a) évolution des concentrations en matière sèche et en spiramycine

b) évolution des fréquences en nombre des trois classes de pelotes au cours du temps

La fréquence en nombre de pelotes dont le noyau occupe plus de 80% de l'aire diminue essentiellement au profit des pelotes dont le noyau occupe de 40 à 80% de l'aire et pour une faible part au profit des pelotes dont le noyau occupe moins de 40% de l'aire.

1. 1. 4. Classification des individus en fonction du degré d'enchevêtrement

La Fig. 6 présente l'évolution de la fréquence en nombre de trois classes d'individus en fonction de leur degré d'enchevêtrement. La fréquence en nombre d'individus classés comme très enchevêtrés demeure toujours très faible. La fréquence en nombre d'individus assez enchevêtrés diminue fortement entre 48 et 72 h, puis demeure stable jusqu'à la fin de la culture. En fin de phase de croissance les individus enchevêtrés sont prédominants, puis, en début de phase stationnaire, un phénomène brusque se produit, se traduisant par une inversion de cette domination. Les individus les moins enchevêtrés, les filaments, sont prédominants jusqu'à la fin de la culture. Ce changement brutal de représentation des populations se produit au moment où débute la production de l'antibiotique.

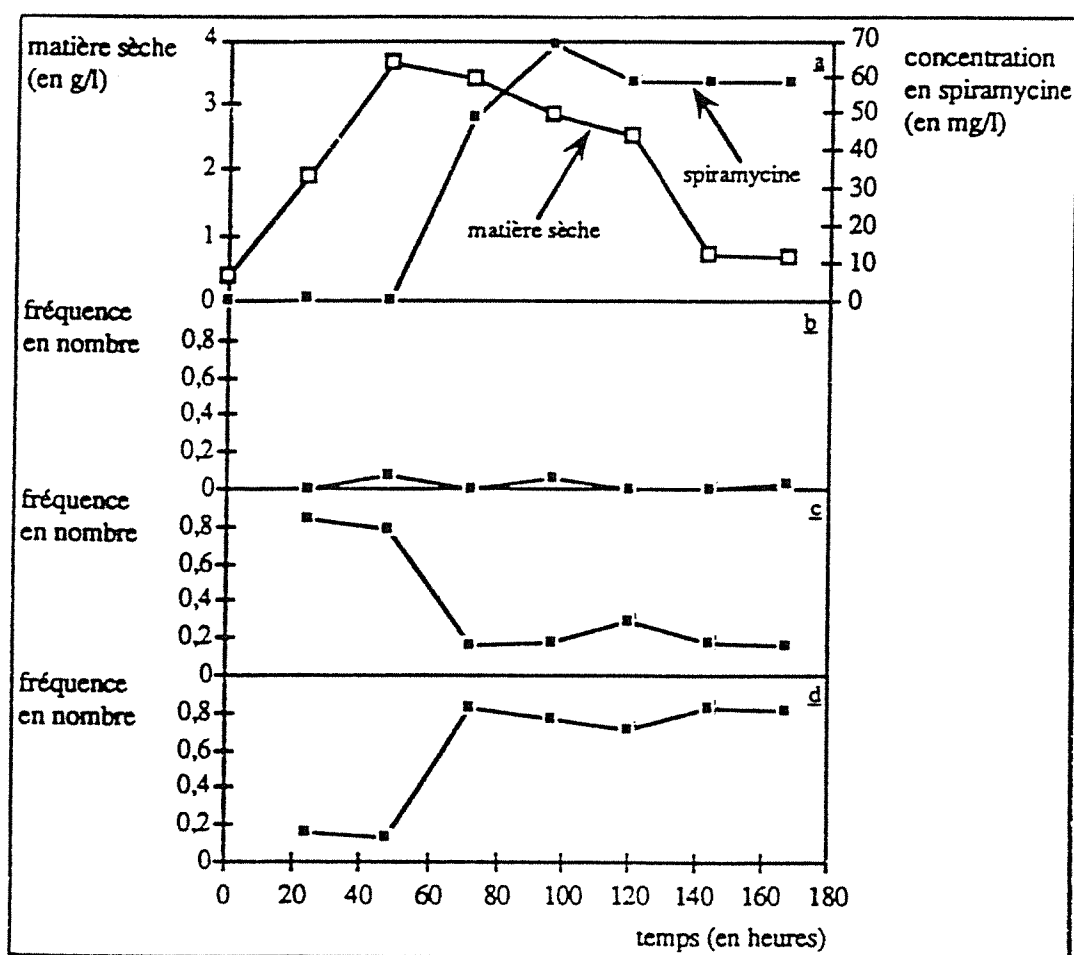


Fig. 6 : Evolution des fréquences en nombre de trois classes d'individus établies en fonction du degré d'enchevêtrements, au cours du temps

- a) évolution des concentrations en matière sèche et en spiramycine au cours du temps*
- b) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 28 et 58, très fortement enchevêtrés*
- c) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 58 et 89, assez enchevêtrés*
- d) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 89 et 116, peu à pas enchevêtrés*

1. 1. 5. Résumé

D'un point de vue général, la culture est caractérisée par trois phases : une phase de croissance, une phase stationnaire et une phase de déclin. La production de spiramycine apparaît durant la phase stationnaire.

L'évolution de la fréquence en aire des pelotes a montré qu'elles constituaient l'essentiel de la biomasse, même lorsqu'elles sont peu représentées. La représentation des individus en fréquence en nombre montre que la production de spiramycine apparaît à un moment de bouleversement morphologique important. Cette période de bouleversement morphologique se traduit par une perte de matière au niveau du noyau des pelotes, entraînant la libération de formes simples que sont les filaments.

Au cours de cette culture le degré d'enchevêtrement des individus diminue, notamment au cours de la phase stationnaire. L'évolution de la fréquence en nombre des individus peu et pas enchevêtrés augmente durant la phase de production de spiramycine.

Nous avons décrit les pelotes comme étant des individus constitués d'un noyau et d'une chevelure, mais cette description ne correspond à aucune réalité physiologique. Il ne semble pas exister de différence entre les filaments constituant la chevelure et ceux constituant le noyau. Un filament constituant la chevelure prend racine au niveau du noyau et lors de la phase de déclin les parties les plus fragilisées se trouvant au niveau du noyau se décrochent et entraînent les ramifications dans la périphérie de la pelote. La libération de filaments provenant de la chevelure n'est pas clairement mise en évidence même si l'on suppose qu'elle a lieu.

1. 2. Milieu contenant l'ammonium comme source d'azote ("milieu non producteur")

Les résultats des dosages des substrats et de mesure de la matière sèche sont présentés sur la Fig. 7. La croissance est plus rapide que sur milieu contenant la valine comme source d'azote. La biomasse maximale atteinte est équivalente dans les deux cas. Il n'y a pas de production de spiramycine sur milieu contenant les ions ammonium.

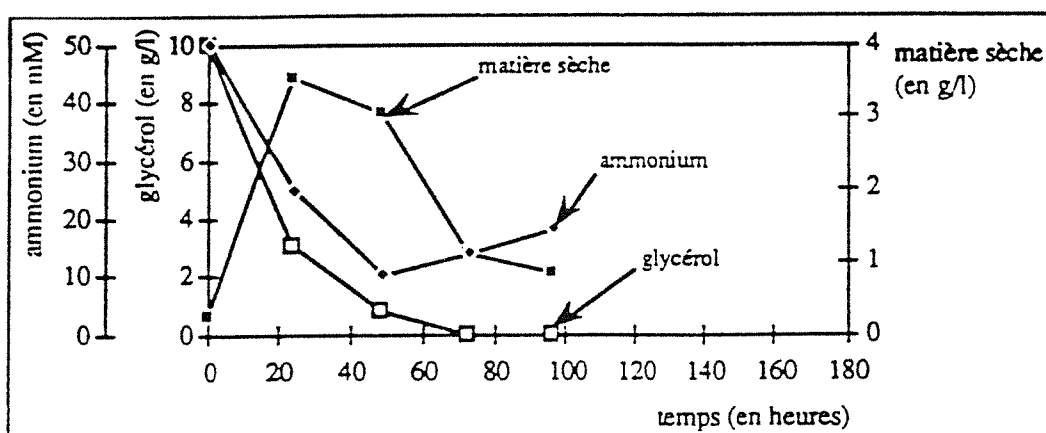


Fig. 7 : Cinétiques de croissance (matériau sèche) et de consommation du glycérol et de la valine.

L'analyse des images acquises lors de cette fermentation a permis d'obtenir les résultats illustrés sur les Fig. 8, 9, 10 et 11.

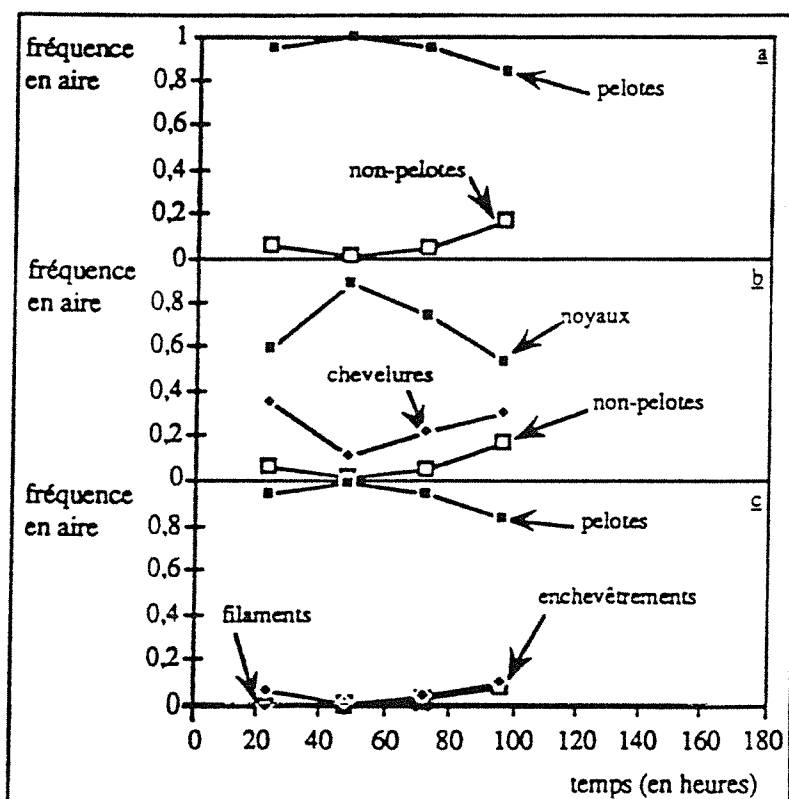


Fig. 8 : Evolution des fréquences en aire des différentes classes morphologiques au cours du temps.

a) fréquence en aire des pelotes et des non-pelotes

b) fréquence en aire des noyaux, chevelures et non-pelotes

c) fréquence en aire des pelotes, filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

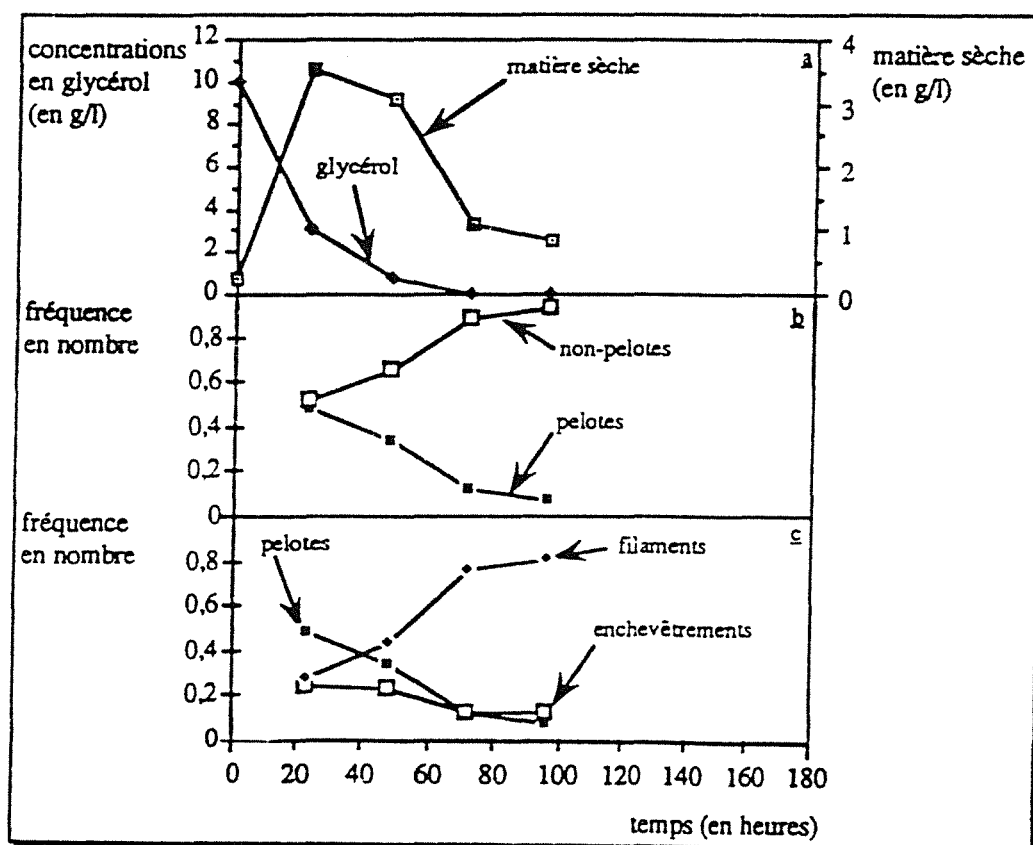


Fig. 9: Evolution des fréquences en nombre des différentes classes morphologiques au cours du temps

a) évolution des concentrations en glycérol et en matière sèche

b) fréquence en nombre de pelotes et de non-pelotes

c) fréquence en nombre de filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

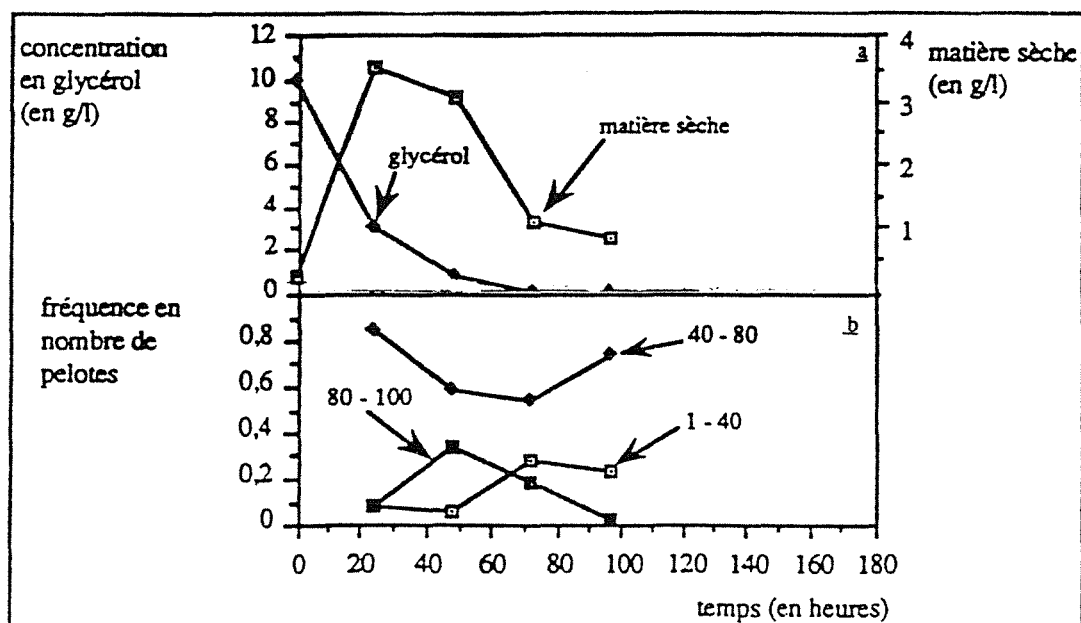


Fig. 10 : Evolution des aires moyennes des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupé par le noyau au cours du temps

a) évolution des concentrations en matière sèche et en glycérol

b) évolution des fréquences en nombre des trois classes de pelotes au cours du temps

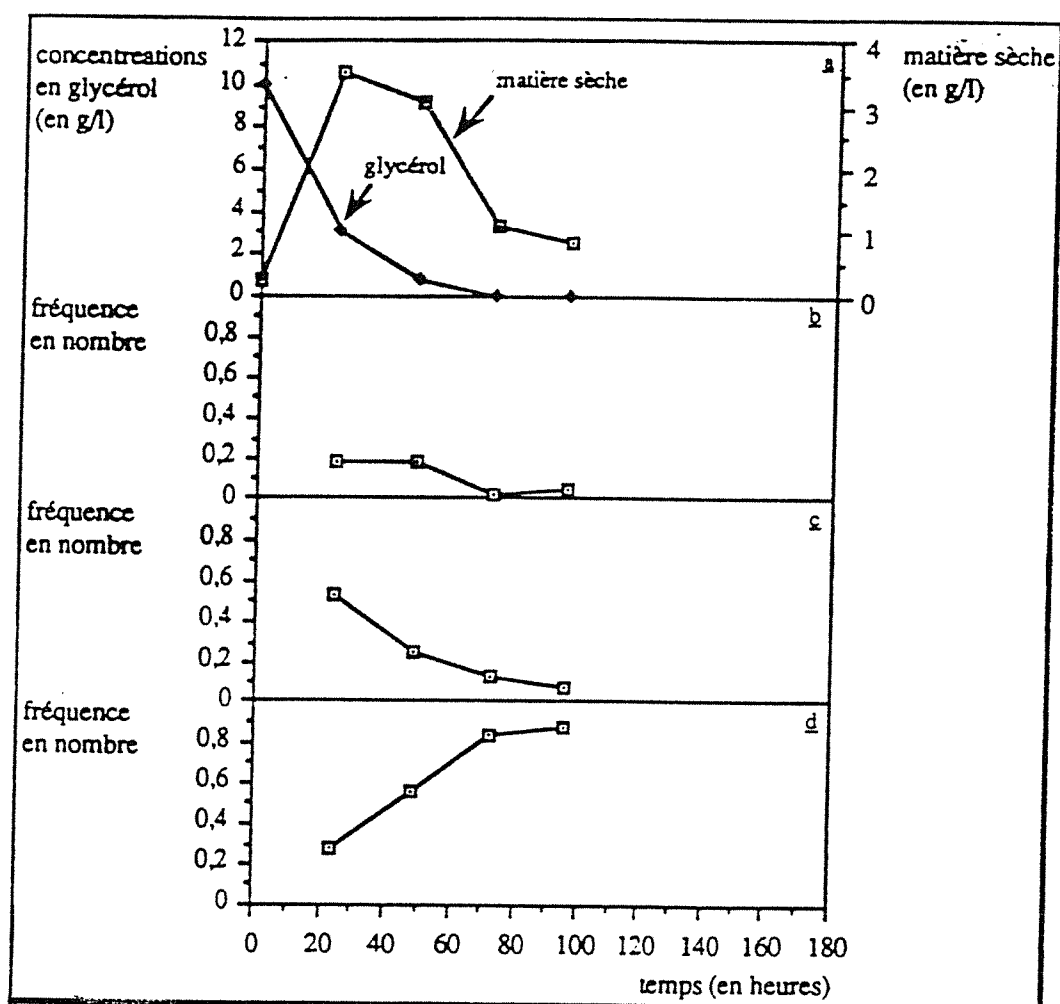


Fig. 11 : Evolution des fréquences en nombre de trois classes d'individus établies en fonction du degré d'enchevêtrements, au cours du temps

- a) évolution des concentrations en matière sèche et en glycérol au cours du temps*
- b) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 28 et 58, très fortement enchevêtrés*
- c) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 58 et 89, assez enchevêtrés*
- d) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 89 et 116, peu à pas enchevêtrés*

1. 3. Comparaison des évolutions morphologiques sur les deux milieux

La comparaison avec les résultats de la culture sur milieu contenant de la valine montre que les pelotes sont les individus qui occupent la plus grande part de la surface totale de la biomasse. Dans les conditions de culture avec la valine, la fréquence en aire des pelotes augmente durant la phase de croissance, alors qu'elle augmente durant la phase stationnaire sur le milieu contenant l'ammonium. Le noyau semble profiter de la croissance des pelotes puisque, dans les deux milieux, la fréquence en aire du noyau augmente quand la fréquence en aire des pelotes croît.

De façon générale, les profils d'évolution des fréquences en nombre de chaque classe d'individus dans les cultures avec ammonium ou valine se ressemblent, mais les modifications importantes ne se déroulent pas précisément dans les mêmes phases de culture des microorganismes (24 heures de décalage). C'est particulièrement le cas pour les filaments dont l'augmentation de la fréquence en nombre se produit pendant la phase de déclin, alors que cette augmentation se produit durant le début de la phase stationnaire dans la culture avec la valine. Cette évolution de la fréquence en nombre des filaments est moins brusque dans la culture avec ammonium qu'avec valine.

La fréquence en nombre des enchevêtrements est constante sur milieu avec ammonium tandis que lors de la culture avec valine, elle augmente durant la phase de déclin.

On ne constate pas de perturbation dans l'aire moyenne des pelotes dont le noyau occupe de 40 à 80% de l'aire, comme dans le cas de la culture avec la valine. La fréquence en nombre de pelotes, dont le noyau occupe plus de 80 à 100% de l'aire, diminue durant la phase de déclin au profit des pelotes dont le noyau occupe de 1 à 40% de l'aire. Le phénomène de destructuration des noyaux des pelotes que nous avons constaté lors de la culture avec la valine semble se confirmer ici.

Comme nous l'avions remarqué lors de la culture avec le milieu contenant de la valine, le profil d'évolution des individus peu et pas enchevêtrés ressemble à celui des filaments. Une analyse rapide permet de dire que le degré d'enchevêtrements des individus dans la culture avec ammonium diminue lorsque les microorganismes sont en phase de déclin. Lors de la culture avec la valine, ce phénomène se déroulait durant le début de la phase stationnaire. Il semble que les cinétiques d'apparition des classes morphologiques soient différentes selon la source d'azote.

Dans la culture avec la valine, la spiramycine est produite durant la phase stationnaire, phase durant laquelle se produit une modification morphologique importante, caractérisée par l'augmentation brutale de la fréquence en nombre de filaments. Nous ne pouvons cependant conclure que l'apparition des filaments soit un signal de la production de l'antibiotique, puisque cette apparition de filaments se produit également dans la culture avec l'ammonium. L'origine des filaments est, pour une grande part, issue du noyau des pelotes et, pour une autre part, de la chevelure mais ils peuvent provenir également des enchevêtrements.

La Fig. 12 schématise les cultures inoculées par une préculture avec les principales formes rencontrées au cours du temps. L'inoculation par préculture apporte des formes complexes à la culture. Il est par conséquent difficile de suivre l'évolution des formes, aussi est-il intéressant d'étudier une préculture.

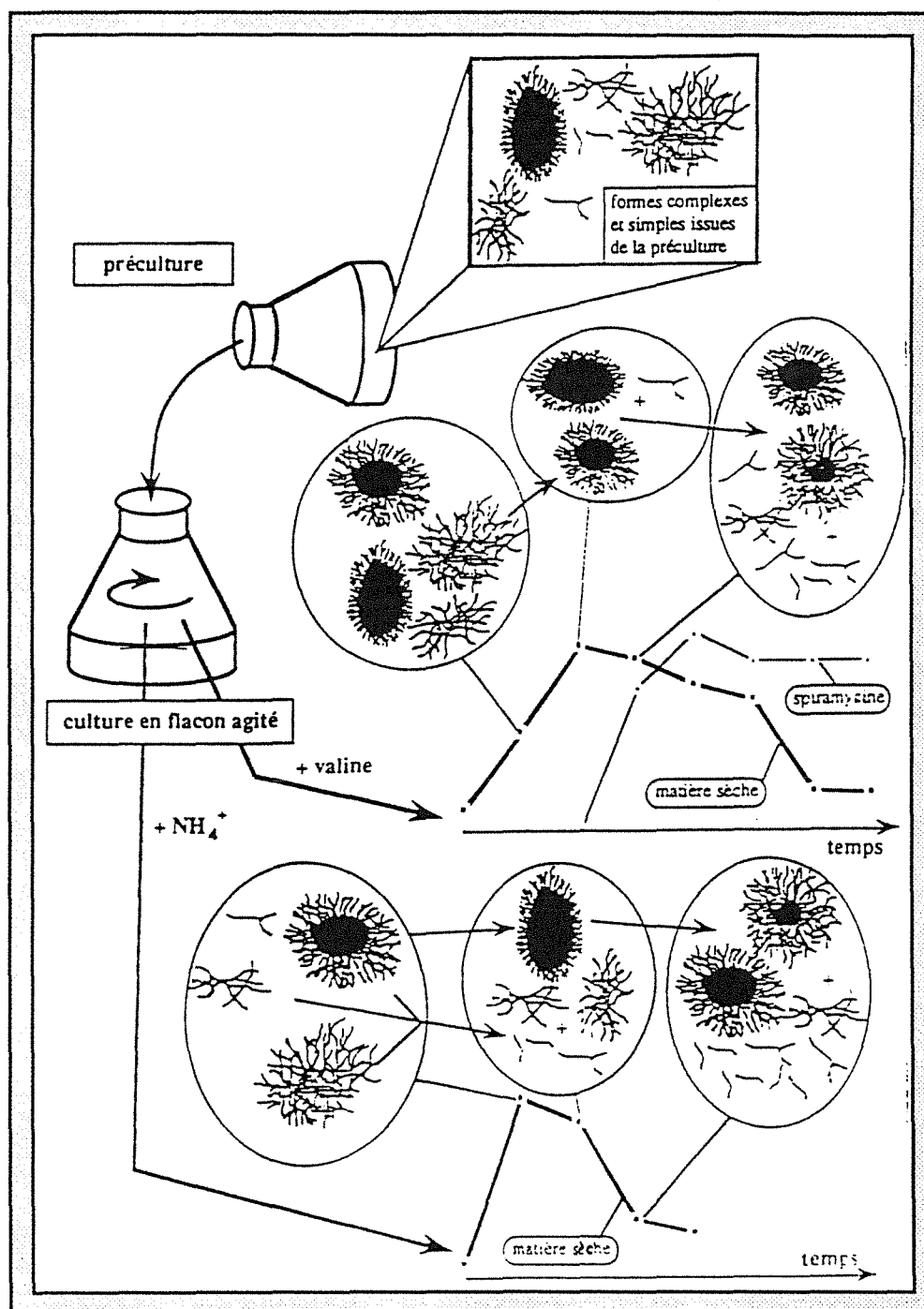


Fig. 12 : Schématisation de l' évolution des différentes formes rencontrées dans les cultures inoculées par préculture.

2. Ensemencement avec des spores

Dans cette culture nous avons suivi le développement des spores en filaments de plus en plus complexes jusqu'à la formation de pelotes. Il n'y a donc pas de formes complexes préexistantes, toutes les formes observées seront issues de la culture. Seul le milieu contenant de la valine sera testé.

Les résultats des cinétiques de croissance, de l'assimilation des substrats et de production de spiramycine sont présentés dans la Fig. 13.

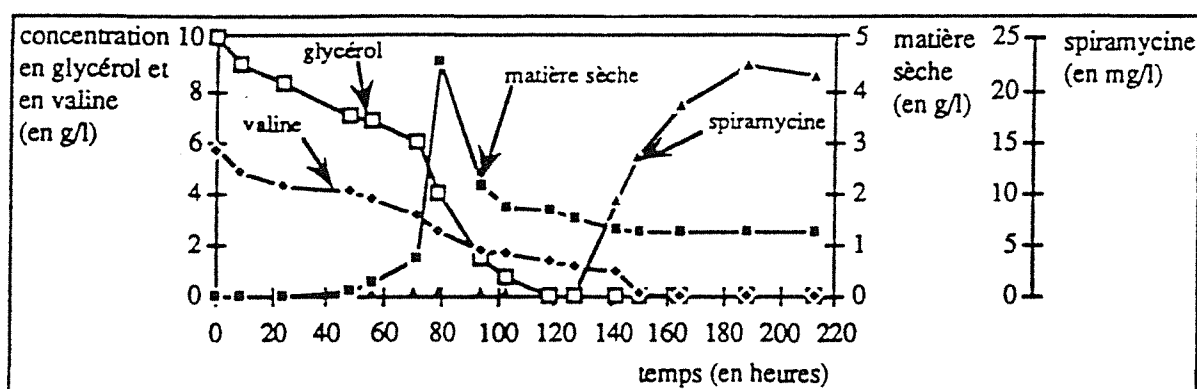


Fig. 13 : Cinétiques de croissance (matière sèche), de consommation du glycérol et de la valine et de production de spiramycine.

L'allure de développement de *S. ambofaciens* est différente selon que l'on inocule avec des spores ou une préculture. Lors de cette cultureensemencée avec des spores, la germination des spores est lente ce qui entraîne une longue phase de latence (56 h). Celle-ci est suivie d'une phase de croissance de 24 h. Ensuite survient une phase de déclin rapide de 24 h puis une stabilisation jusqu'à la fin de la culture. C'est en fin de culture, lorsque la biomasse est en phase stationnaire, que la production de spiramycine débute (120 h). La quantité de spiramycine produite est trois fois plus faible que dans la culture inoculée par préculture, la quantité de biomasse est bien moins importante que dans les cultures précédentes.

Les résultats obtenus après analyse quantitative d'images recueillies à partir de cette fermentation sont représentés sur les Fig. 14, 15, 16 et 17.

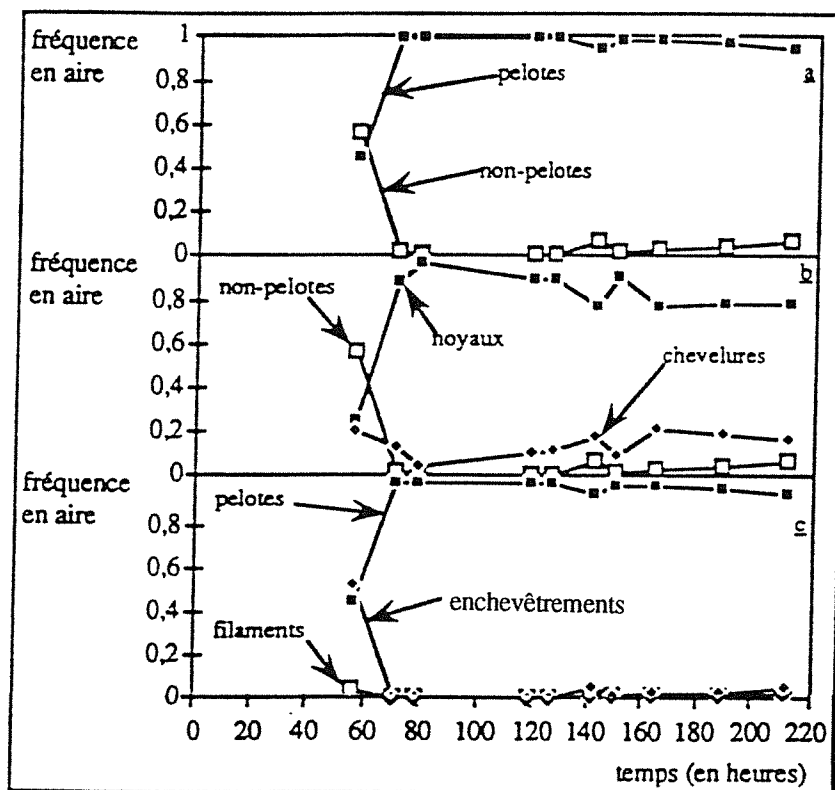


Fig. 14 : Evolution des fréquences en aire des différentes classes morphologiques au cours du temps.

a) fréquence en aire des pelotes et des non-pelotes

b) fréquence en aire des noyaux, chevelures et non-pelotes

c) fréquence en aire des pelotes, filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

En résumé, lors de cette fermentation, durant la phase de croissance, la fréquence en nombre de non-pelotes décroît au profit de celle des pelotes. Durant cette phase de croissance, la fraction d'aire occupée par les noyaux, par rapport à la population totale, augmente considérablement. Ceci signifie qu'une pelote en phase de croissance développe peu de chevelure, ou que les filaments en croissance dans la pelote s'enchevêtrent, rendant la structure plus compacte qu'une chevelure, pour donner le noyau.

Lors de la phase stationnaire, la fréquence en nombre de pelotes diminue au profit de celle des non-pelotes et notamment des enchevêtrements. La fréquence des filaments demeure quasiment constante sauf en fin de culture lorsque la concentration maximale de spiramycine est atteinte. La phase de production de la spiramycine apparaît pendant une phase de modification morphologique importante.

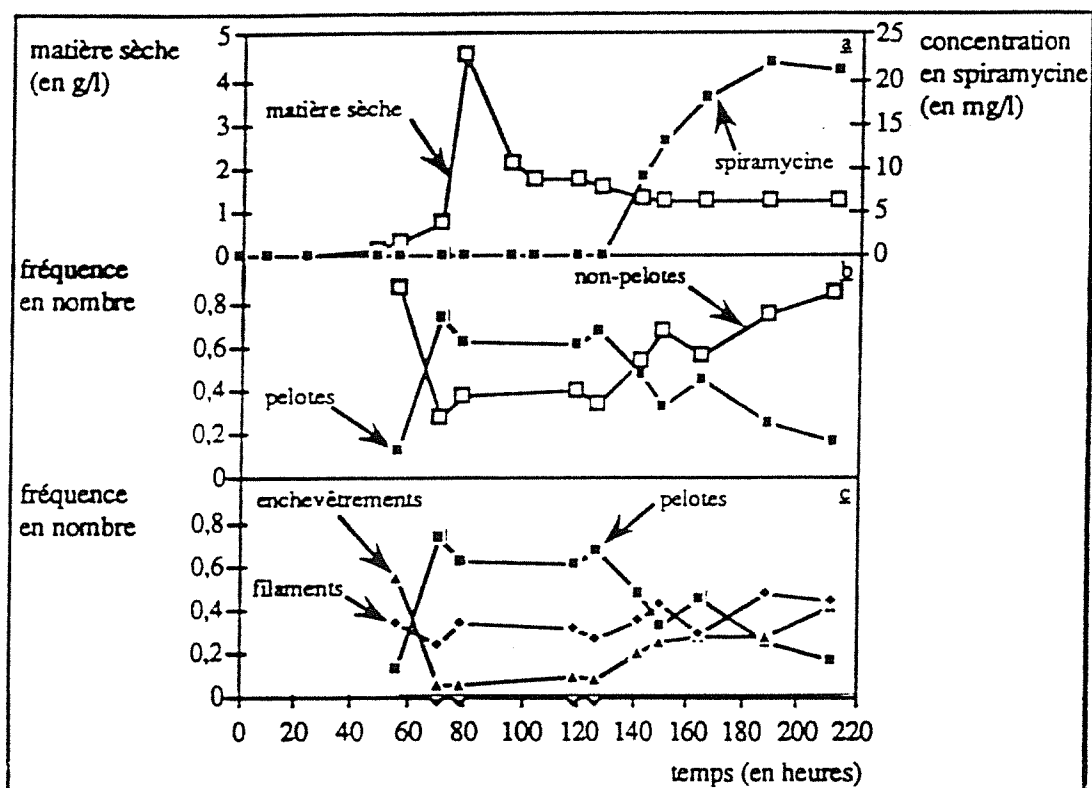


Fig. 15 : Evolution des fréquences en nombre des différentes classes morphologiques au cours du temps

a) évolution des concentrations en spiramycine et en matière sèche

b) fréquence en nombre de pelotes et de non-pelotes

c) fréquence en nombre de filaments et enchevêtrements selon la classification binaire

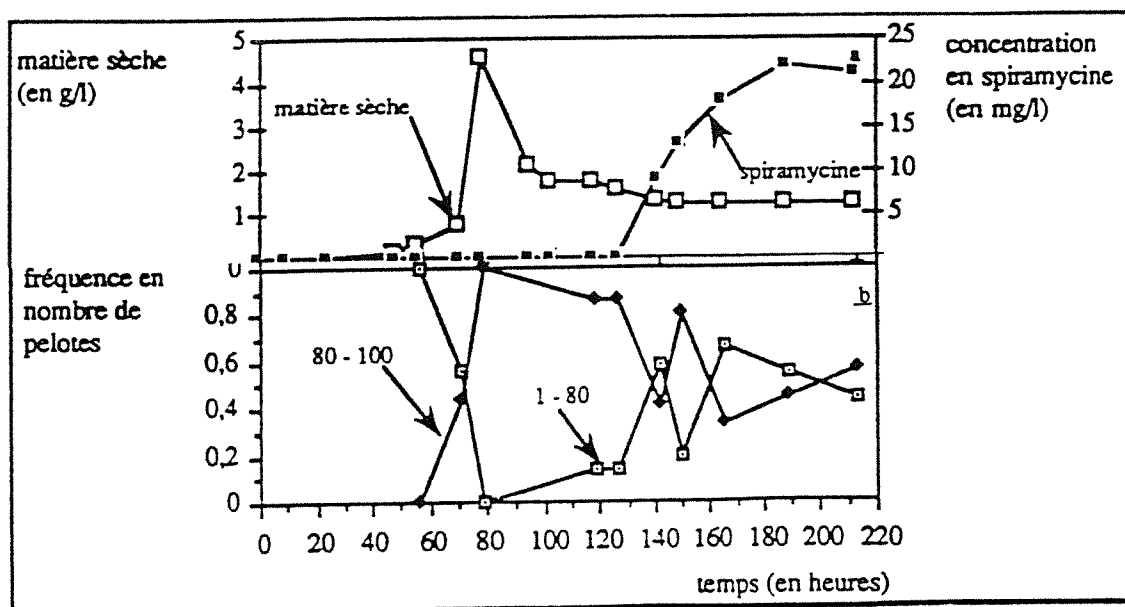


Fig. 16 : Evolution des aires moyennes des pelotes en fonction du pourcentage d'aire occupé par le noyau au cours du temps

a) évolution des concentrations en matière sèche et en spiramycine

b) évolution des fréquences en nombre de deux classes de pelotes au cours du temps

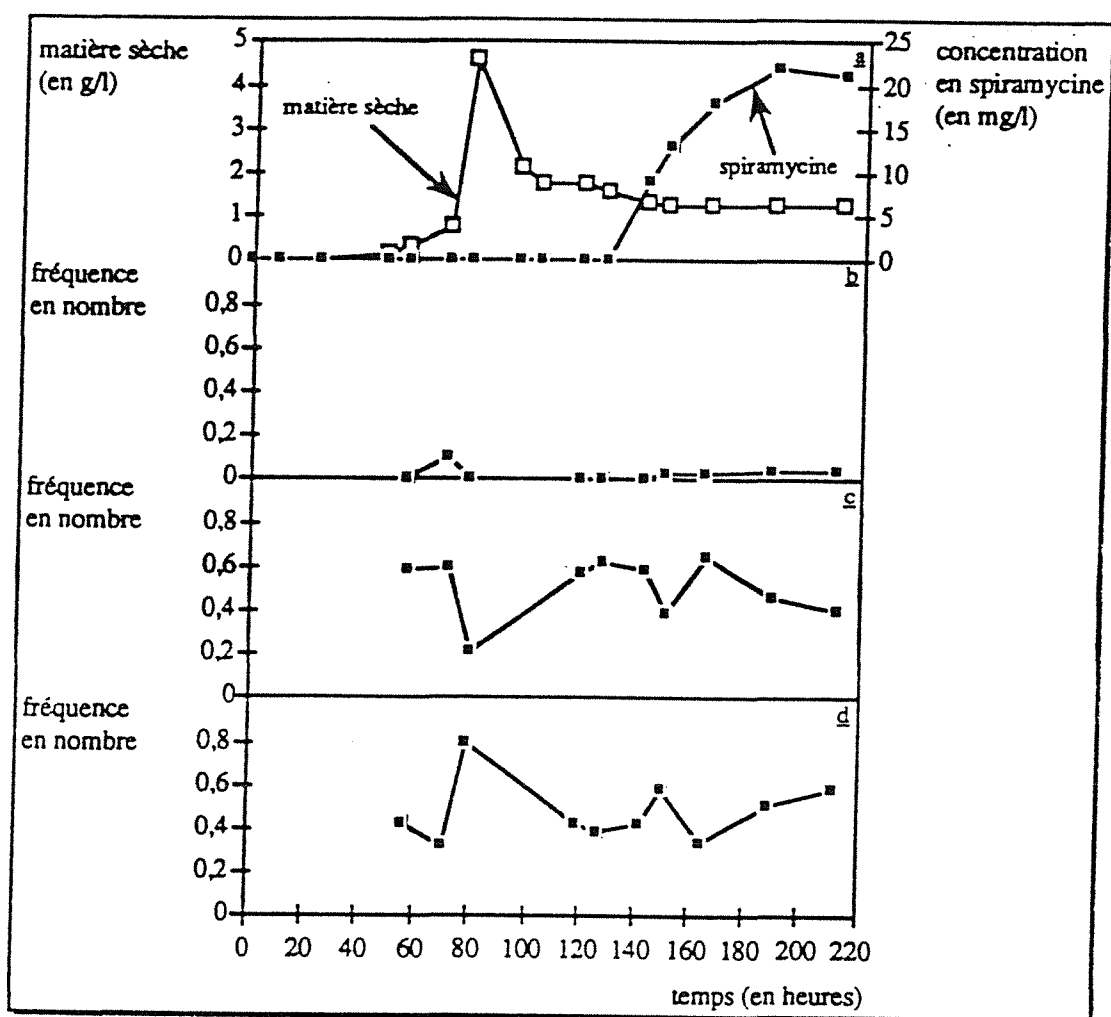


Fig. 17: Evolution des fréquences en nombre de trois classes d'individus établies en fonction du degré d'enchevêtrements, au cours du temps

- a) évolution des concentrations en matière sèche et en spiramycine au cours du temps
- b) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 28 et 58, très fortement enchevêtrés
- c) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 58 et 89, assez enchevêtrés
- d) individus de degré d'enchevêtrement compris entre 89 et 116, peu à pas enchevêtrés

La Fig. 18 illustre les différentes formes rencontrées au cours de cette culture. Nous représentons la germination des spores mais c'est un phénomène que nous n'avons pu quantifier car le grossissement auquel nous observons l'évolution morphologique ne nous le permet pas.

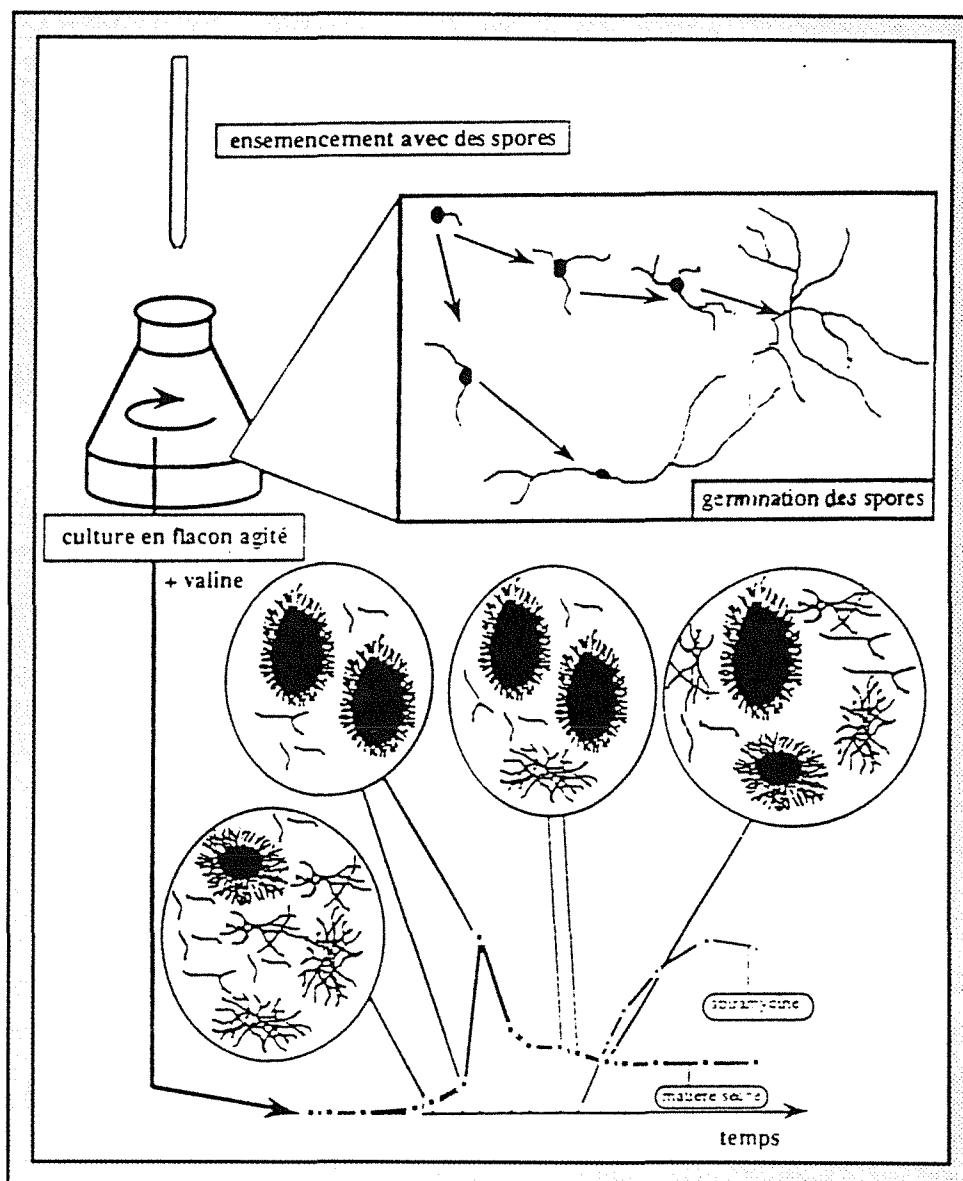


Fig. 18 : Schématisation du développement morphologique des principales étapes de la culture ensemencées avec des spores.

DISCUSSION

Le suivi de l'évolution morphologique lors d'une culture ensemencée par des spores et productrice d'antibiotique montre que les filaments se transforment en pelotes. La croissance des pelotes se traduit par une augmentation du pourcentage d'aire occupée par le noyau dans la pelote. La production de spiramycine est détectée en fin de culture. A ce moment, le pourcentage d'aire occupée par les noyaux dans les pelotes diminue et la fréquence en nombre de filaments et d'enchevêtrements augmente. La destructuration du noyau des pelotes semble libérer des formes simples au moment de la production de spiramycine.

Lors de cultures inoculées par une préculture, la comparaison de l'influence de la composition du milieu de culture sur l'évolution morphologique des microorganismes a permis de mettre en évidence une différence dans les cinétiques de croissance engendrant des évolutions morphologiques différentes.

En présence de valine, que le milieu soit ensemencé à partir de spores ou d'une préculture, la culture subit des modifications morphologiques importantes, se traduisant par la libération de formes simples, au moment de la production de l'antibiotique. Ces modifications morphologiques pourraient être le reflet de modifications physiologiques entraînant la production de spiramycine. L'apparition de filaments ou de formes peu enchevêtrées en quantité importante pourrait constituer un signal annonçant la production de spiramycine.

Les quantités de filaments relâchés et de spiramycine produite, dans la culture inoculée à partir des spores, sont plus faibles que dans la culture ensemencée avec une préculture. Ceci est explicable par une moindre production de biomasse dans le milieu ensemencé avec des spores.

Lors de la culture contenant de l'ammonium comme source d'azote, il existe déjà des filaments en début de culture et l'on constate une augmentation de la fréquence en nombre de ces derniers lors de la phase de destructuration des pelotes, durant la phase de déclin de la biomasse.

Cette étude ne nous a pas permis de conclure que la production de spiramycine était due à l'augmentation ou à l'apparition de filaments puisque l'augmentation de la fréquence en nombre de filaments, dans la culture contenant de l'ammonium, n'est pas suivie de production de spiramycine.

Afin de pouvoir répondre à la question posée, à savoir : y a-t-il une corrélation entre la morphologie du microorganisme et la production de l'antibiotique ?, il serait intéressant de comparer l'évolution morphologique au cours du temps entre une souche productrice et différents mutants non producteurs.

REFERENCES

- BYRNE G. S. et WARD O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. Biotechnol. Bioeng. **33**, 912-914.
- COX P. W. et THOMAS C. R. (1992) Classification et measurements of fungal pellets by automated image analysis. Biotechnol. Bioeng. **39**, 945-952
- MATSUMURA M., IMANAKA T., YOSHIDA T. et TAGUCHI H. (1980) Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosporium acremonium*. J. Ferment. Technol. **58**, 197-204.
- PACKER H. L. et THOMAS C.R. (1990) Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic analysis. Biotechnol. Bioeng. **35**, 870-881.
- PICHON D. (1994) Analyse d'images en biotechnologie, quantification de la morphologie de microorganismes filamenteux au cours de fermentation et suivi de la croissance de cellules animales sur microporteurs au cours de cultures. Thèse de doctorat de l'INPL-Nancy.
- REICHL U. et GILLES E. D. (1991) Investigations of pellet forming microorganisms by means of an image processing system. In : "Biochemical Engineering." STUTTGART M. REUSS H., CHMIEL E. D. et KANCKMUSS H. J., Eds. pp. 336-339.
- WHITAKER A. (1992) Actinomycetes in submerged culture. App. Biochem. Biotechnol. **32**, 23-35.

COMMUNICATIONS

A. Lounès A. Collignon, A. Lebrihi G. Lefebvre and P. Germain. Effect of valine on spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens* . Sixth European Congress on Biotechnology. Firenze, Italie June 1993.

A. Lounès A. Lebrihi G. Lefebvre and P. Germain. Carbon catabolite regulation of spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. European Actinomycetes Group Meeting organised by the Mycology Section of the French Society of Microbiology (5th conference) Institut Pasteur Paris, France avril 1993.

S. Untrau, A. Lounès, A. Collignon, A. Lebrihi, G. Lefebvre et P. Germain. Effet de l'ammonium, d'acides aminés et d'acides gras sur la production de la spiramycine. 3^e Congrès de la Société Française de Microbiologie Lyon, France avril 1992.

A. Pichon, A. Lounès, H. Vivier, A. Lebrihi, J. F. Drouin, M. N. Pons, F. Monestier. Suivi de l'évolution de la morphologie lors de la croissance de bactéries filamenteuses par analyse d'images. Journée d'Etude Analyse d'images dans les procédés biotechnologiques et agroalimentaires organisée par le groupe Français de génie des procédés Massy, France décembre 1992.

A. Lebrihi, S. Untrau, A. Lounès, A. Collignon, M. Laakel, D. Lamsaif G. Lefebvre et P. Germain. Biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Régulation par la source d'azote. 3^e Congrès de la Société Française de Microbiologie Lyon, France avril 1992.

D. Pichon, H. Vivier, M. N. Pons, A. Lounès, A. Lebrihi. Characterization and growth monitoring of filamentous microorganisms by image analysis. Proceedings of Stereologic european Congress, Prague september 1993.

D. Pichon, A. Marc, H. Vivier, A. Lebrihi, A. Lounès, B. Daridon, C Dargot, J.M. Engasser. Capteur de morphologie pour procédés de fermentation utilisant l'analyse quantitative d'images. Colloque : Aliment 2000, France septembre 1993.

G. Alderson, D.A. Ritchie, C. Cappellano, R.H. Cool, N.M. Ivanova, A.S.Huddleston, C.S. Flaxman, V. Kristufek and A. Lounès (1993) Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. Res. Microbiol. **144**, 665-672.

Physiology and genetics of antibiotic production and resistance

G. Alderson ^{(1) (*)}, D.A. Ritchie ^{(2) (*)}, C. Cappellano ⁽³⁾, R.H. Cool ⁽⁴⁾, N.M. Ivanova ⁽⁵⁾,
A.S. Huddleston ⁽⁶⁾, C.S. Flaxman ⁽⁶⁾, V. Kristufek ⁽⁷⁾ and A. Lounes ⁽⁸⁾

⁽¹⁾ Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, West Yorkshire, BD7 1DP (UK),

⁽²⁾ Department of Genetics and Microbiology, University of Liverpool, Liverpool, L69 3BX (UK),

⁽³⁾ Dipartimento di Biologia Cellulare e della Sviluppo, Università di Palermo,
Via Archirafi 22, 90123 Palermo (Italy),

⁽⁴⁾ Department of Biochemistry, Gorlaens Laboratories, Leiden University, PO Box 9502,
2300 RA Leiden (The Netherlands),

⁽⁵⁾ Research Institute of Antibiotics, Razgrad (Bulgaria),

⁽⁶⁾ Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL (UK),

⁽⁷⁾ Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na sadkach 7,
37005 Ceske Budejovice (Czech Republic), and

⁽⁸⁾ E.N.S.A.I.A., Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire de Microbiologie Industrielle
et Alimentaire, 2 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre les Nancy (France)

SUMMARY

Actinomycetes have the genetic capability to synthesize many different biologically active secondary metabolites and of these compounds, antibiotics predominate in therapeutic and commercial importance. Intensive research often centres on the use of molecular techniques to investigate the physiology and genetics of antibiotic biosynthesis with a view to improving production. The isolation of clones of *Streptomyces hygroscopicus*, the producer of geldanamycin, which synthesizes geldanamycin in *S. lividans*, is reported. Molecular approaches using genes for elongation factors (*tuf*) were used in attempts to increase the fermentation yield of kirromycin, whilst probes for *aphD* and *sph*, genes for streptomycin phosphotransferases, were used to gather information on streptomycin genes in soil. Actinomycete populations in soil and earthworms may help in developing a strategy for discovering additional antimicrobials in soil. The relationship of proline metabolism to the secondary metabolite undecylprodigiosin and the carbon regulation of spiramycin biosynthesis in *S. ambofaciens* is also reported.

Molecular genetic analysis of genes encoding the biosynthesis of ansamycin polyketide antibiotics

Ansamycin antibiotics are produced by various actinomycetes and some plants and share a common structure characterized by a polyketide chain linked to two non-adjacent positions on an aromatic nucleus

(Lancini, 1983). The aromatic nucleus is either naphthalenic (rifamycins, tolypomycins, streptovaricins) or benzenic (geldanamycin, herbimycins, macbecins). Generally, naphthalenic ansamycins are antibacterial agents (some are also antifungal), whereas the benzenic compounds are antieukaryotic (including several anti-tumour agents).

(*) Chairpersons and authors of the present summary of session, in collaboration with presenting participants at the "European Actinomycetes Group" meeting, April 1993, Paris, France.

Precursor studies with rifamycin, geldanamycin and ansamycin have revealed a common biosynthetic pathway originating with precursors of shikimate biosynthesis. An early precursor, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, is converted by addition of CoA to C-N which forms the aromatic nucleus. The polyketide chain is linked to the aromatic nucleus by the successive addition of propionate and acetate units catalysed by polyketide synthase activity. The number, type, sequence and subsequent modification of these units provide some of the structural and functional diversity of ansamycin antibiotics.

Nothing is known of the organization of ansamycin biosynthetic genes and no specific functions have been identified. In order to elucidate such information on biosynthesis, a gene library was constructed from *Streptomyces hygroscopicus* 3602, the producer of geldanamycin, from size-fractionated (≈ 20 kb) total DNA fragments cloned in pIJ61. The gene library was used to transform *S. lividans* TK24 and transformants were assayed for antibiosis against a strain of *Bacillus subtilis*. Of 800 transformant colonies tested, three produced antibiosis when transferred to plates seeded with a geldanamycin-sensitive *B. subtilis* strain. These clones, pIA101, pIA102 and pIA103, each contained inserts of 15 kb which probably represent overlapping sequences. Fermentation broth extracts of the three clones were separated by TLC (thin-layer chromatography) and the chromatoplates overlaid with *B. subtilis*. Two killing zones at R_f 0.31 and 0.69 corresponded to those for purified geldanamycin and were absent from untransformed *S. lividans*.

Two restriction fragments from pIA102, one of 3.5 kb and the other of 4.5 kb, were subcloned into the integration-defective temperate phage vector Φ C31 KC515 and the phage used to infect *S. hygroscopicus* 3602. Lysogens were isolated in both cases, indicating that prophages had been formed by homologous recombination between the DNA insert and the homologous region of the *S. hygroscopicus* chromosome. *S. hygroscopicus* 3602 lysogens containing the 3.5 kb insert produced geldanamycin, but those containing the 4.5 kb insert were defective in geldanamycin production. The 4.5 kb insert lysogens were of two classes which probably reflect insertion in the two possible orientations. One produced only the R_f 0.69 antibiotic zone on TLC, whereas the second class produced none of the geldanamycin antibiotic zones. The loss of geldanamycin production with these lysogens indicated that the 4.5 kb fragment of pIA102 was part of the geldanamycin biosynthetic gene cluster and that gene disruption resulted in loss of function. This was confirmed by showing that non-lysogenic derivatives of the *S. hygroscopicus* 3602 lysogens had regained the ability to synthesize geldanamycin.

DNA from clones pIA101, pIA102 and pIA103 hybridized to a probe from the erythromycin polyketide synthase region (*eryORFA*) but not to probes from the actinorhodin polyketide synthase (*actI* and *actIII*) (Cortes *et al.*, 1990; Hopwood and Sherman, 1990), suggesting that geldanamycin polyketide synthase is more closely related to the erythromycin type I enzymes. Mass spectrometry of the R_f 0.69 TLC band purified from extracts of the three pIA clones produced very similar fingerprints to that of the equivalent band from purified geldanamycin.

These clones probably contain sequences from the geldanamycin biosynthetic pathway and include polyketide synthase sequences. However, the sizes of the clones (≈ 15 kb) suggested that they do not contain all the biosynthetic genes and that the *S. lividans* TK24 host may be providing some geldanamycin precursor structures.

Streptomyces cinnamoneus tuf gene conferring natural resistance to kirromycin

S. cinnamoneus produce kirrothricin, a member of the kirromycin class of antibiotics (Thein-Scranner *et al.*, 1982) that interfere with protein biosynthesis in prokaryotes by the formation of a complex with elongation factor Tu (EF-Tu), thereby blocking peptide chain elongation on the ribosome (Parmeggiani and Swart, 1985).

Kirromycin failed to inhibit protein synthesis when assayed in a heterologous cell-free system using *Escherichia coli* ribosomes and *S. cinnamoneus* S-100. This confirmed the report from Glockner and Wolf (1984) and indicated that the *S. cinnamoneus* EF-Tu is intrinsically resistant to this antibiotic. However, this EF-Tu is very sensitive to another inhibitor of protein synthesis, GE2270, which also interferes with the EF-Tu function (Anborgh and Parmeggiani, 1991).

The *S. cinnamoneus tuf* gene was identified by Southern hybridizations with the *E. coli* and *S. coelicolor tuf* genes and cloned on a fragment of 3.6 kb. The nucleotide sequence of the *S. cinnamoneus tuf* gene showed around 60 % and 80 % homology to the sequence of *E. coli* and *S. ramocissimus* (*Sr. tufI*) respectively, and around 75 % and 95 % similarity from the deduced amino acid sequences. Comparative studies with different EF-Tu sequences allowed the identification of amino acid Thr 378 as probably being responsible for the antibiotic resistance (this corresponds to Ala 375 in the *E. coli* EF-Tu sequence). The substitution Ala 375-Thr is known to confer resistance to kirromycin on *E. coli* (Fischer *et al.*, 1977).

Isolation of the genes involved in kirromycin biosynthesis and kirromycin resistance in *Streptomyces* species

Improvement of the production by *S. ramocissimus* of the antibiotic kirromycin using molecular genetic means was attempted in order to improve commercial use of the antibiotic which had previously been hampered by low fermentation yields.

Isolation of the genes encoding EF-Tu indicated that *S. ramocissimus* contained three *tuf* genes (Woudt *et al.*, in preparation) and sequence analysis suggested that all three gene products were elongation factors. The *tuf1* product (EF-Tu1), which is present in large amounts in the cell, was made resistant to kirromycin *via* substitution of Ala 378 by Thr or Val. Cells with a resistant EF-Tu1 were able to grow at higher kirromycin concentrations compared to their wild-type (European Patent Application EP 0466251). However, kirromycin production was not increased in the mutated cells, suggesting that the kirromycin sensitivity of EF-Tu1 was not the single limiting factor in the production of the antibiotic. Functional characterization of the products of *tuf2* and *tuf3* genes is underway.

Further steps in the search for improved product yield included attempts to isolate the biosynthetic gene cluster using different strains producing kirromycin-type antibiotics. Shotgun cloning has given negative results, probably because the selected host strain, *S. lividans* TK24, expressed levels of kirromycin resistance which were variable and could equal that of producer strains. Preliminary characterization has shown that the more sensitive *S. griseofuscus* will provide a better host strain.

A second strategy involved using Southern hybridization with probes from the *S. coelicolor* actinorhodin gene cluster in an attempt to isolate the biosynthetic genes for the polyketide moiety of kirromycin. At least five kirromycin-producing strains contained DNA fragments that hybridized to the *actIII* gene, which encodes a keto-reductase component of the actinorhodin polyketide synthase. This suggests that a homologous gene with polyketide synthase activity is involved in the biosynthesis of kirromycin-type antibiotics. Some of these DNA fragments have been cloned into pBR329.

Isolation of *Streptomyces tenebrarius* mutants with improved production of tobramycin

S. tenebrarius produces a complex of aminocyclitols during submerged cultivation of which tobramycin is the most important for medical use. Natural variants of *S. tenebrarius* produced increased titres of the antibiotic complex in fermentation

broths, but did not change the ratio between the major components (2, 4 and 5'-apramycin, carbamoylkanamycin B and carbamoyltobramycin). *S. tenebrarius* was mutagenized to attempt to isolate mutants with increased production of tobramycin and to isolate strains with other useful features.

Ultraviolet light (UV) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) were used to treat the parent strain of *S. tenebrarius* IA 1575 (Hopwood *et al.*, 1985). Products from mutant colonies were investigated initially by the microbiological screening procedure of Todozov and Ivanova (1989) using *B. subtilis* ATCC 6633, followed by HPLC (high-performance liquid chromatography) to obtain more precise sample activity (Manova *et al.*, 1988). The criterion for optimal mutagenic treatment was the maximum frequency of appearance of morphological variants. After the fifth round of UV irradiation, a monoproducing strain of factor 5' (*S. tenebrarius* 5519) was isolated that synthesized three times more carbamoyltobramycin than the parent strain. There were no significant differences between the morphological types arising after UV or NTG (nitrosoguanidine) mutagenesis, but the homogeneity of the population after the first mutagenic treatment of the parent strain was 69 % and 38 %, respectively. During subsequent mutagenic treatments, no new morphological types were identified; however, treatment with NTG led to increased apramycin production in half of the survivors. After the second step of NTG mutagenesis, a strain of *S. tenebrarius* 5220 was isolated that produced only apramycin. Other high level producers of aminocyclitols were also isolated after mutagenesis, *e.g.* *S. tenebrarius* 2444, which had parent type morphology, produced all factors of the complex, but expressed carbamoyltobramycin biosynthesis at a high level.

The monoproducing strains were investigated for stability, and further improvements in productivity were attempted. Reversion of phenotype was rare and the most frequent event was the loss of productivity and an increased number of asporogenic colonies. All non-active colonies had the same morphology, suggesting a block of synthesis of 2-deoxystreptamine, rather than in other steps of the biosynthetic pathway. Complementation tests of productive and blocked mutants were negative, suggesting the possibility of deletions in the monoproducing isolates. The resistance of both the parent strain and the productive mutants against the major factors of the nebramycin complex was very high. The productive mutants retained resistance to all factors of the complex that they could not synthesize, whereas asporogenic non-productive mutants were very sensitive to factors 2 and 5'. This fact supported the idea that increased productivity was not a consequence of increased resistance.

Distribution and expression of antibiotic production and resistance genes in streptomycete populations

Little is known of the production of secondary metabolites in soil, but it has been demonstrated in sterile unamended soil and in non-sterile unamended soil. The soil of the Cerrado region of Brazil is extremely acidic and requires liming for successful agricultural use, particularly for the growth of leguminous crops. After liming, there is a bloom of indigenous actinomycetes which may cause antibiotic resistance which, in turn, could affect the inoculants of *Bradyrhizobium japonicum* which become outcompeted by naturalized *Bradyrhizobium* strains. The latter are resistant to a broad spectrum of antibiotics, including streptomycin which has been investigated in this study using the streptomycin phosphotransferase genes *sph* and *aphD* which have been isolated from *S. glaucescens* and *S. griseus*, respectively. Previous studies have shown that streptomycin resistance is rare in soil actinomycetes and can be indicative of bioactivity (Phillips and Wellington, 1992). Bibb *et al.* (1985) found that biosynthetic and specific resistance-conferring genes were frequently clustered and seemed to be coordinately regulated. The genes *aph* and *sphD* are both phosphotransferases of the 6' type with 75 % nucleotide sequence homology in the coding region (Distler *et al.*, 1987) and the *aphD*- and *sph*-containing streptomycin gene clusters present in *S. griseus* and *S. glaucescens* are specific to streptomycin producers (Hotta and Ishikawa, 1988). The *aphD* and *sph* gene sequences were used to probe streptomycin-resistant streptomycetes from the Brazilian population to investigate the distribution and possible transfer of these genes.

DNA was extracted from the streptomycetes and total community DNA was extracted from the unlimed and limed Brazilian soils by the bead beating method. Primers were designed to amplify the entire *aphD* and *sph* genes.

Whole gene probes for *sph* and *aphD* were manufactured by incorporating digoxigenin-11-dUTP:dTTP (3.5:6.5) into PCR reaction mixes with *S. griseus* ATCC 12475 or *S. glaucescens* DSM 40716 and either *aphD* or *sph* primers, respectively. Electrophoresis, followed by Southern blotting, was carried out on chromosomal digests from the isolates, total soil DNA and PCR products and the blots were hybridized using the methods described for the Boehringer Mannheim non-radioactive DNA labelling kit. Relevant type strains and natural isolates from unlimed and limed Cerrado soils were investigated for their resistance to streptomycin, thiostrepton, neomycin, erythromycin and oxytetracycline at concentrations up to 50 µg/ml and results were interpreted by cluster analysis. In the resulting dendrograms, multi-resistant strains were clustered at the bottom and multi-sensitive strains were clustered at

the top, with known streptomycin producers found together in the middle. Chromosomal DNA digests prepared from isolates selected from each region of the dendrograms were probed using *aphD* of *sph* probes and Southern blotting. Twenty of the 60 isolates that gave positive results were selected for further analysis and the PCR products probed with whole gene probes. From 13 natural Brazilian isolates, 4 were found to show > 86 % homology to *aphD* and 8 were homologous to *sph*. There was also evidence for the presence of *aphD* in the Brazilian soil. Products obtained by PCR will be sequenced to investigate gene sequence divergence and the primers have been designed to probe for streptomycin production genes to determine whether the strains also contain the streptomycin biosynthetic cluster — an indication of their ability to produce streptomycin. Currently methods are being developed to monitor the production of antibiotics *in situ* using a *lux* bacteriophage to continue the study of the ecology of antibiotic expression in the rhizosphere.

Regulation of undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Previous studies have revealed interactions between the control of proline metabolism and the control of the proline-dependent secondary metabolite undecylprodigiosin (red) in *S. coelicolor* A3(2) (Hood *et al.*, 1992). Proline transport, catabolism and biosynthesis are all constitutive in this strain. Mutants causing a loss of proline catabolism and transport (*put*) overproduced red. Analysis of different aspects of the regulation of red and the effect of mutants that alter proline metabolism were analysed to investigate whether red can act as a sink for excess proline generated in cells unable to catabolize proline.

The fact that red biosynthesis was disrupted in a *put* mutant background was exploited by constructing Φc31 lysogens that fuse the promoter of a *red* gene to a promoter-less *xyIE* gene whilst losing the ability to synthesize red. Red gene promoter activity was assessed in *put*⁻ and *put*⁺ backgrounds by quantifying the product of the *xyIE* gene, catechol oxygenase, which is easily assayable.

In addition, regulatory genes of the *red* gene cluster were analysed. The product of *redD* is an activator of the gene cluster that has previously been identified and sequenced (Narva and Feitelson, 1990). Another regulatory locus, *pwb* has been shown to affect red production (Guthrie and Chater, 1990, *pers. comm.*). This mutation overrides the block in red production caused by the pleiotrophic sporulation and secondary metabolism mutations affecting the *bldA* gene. The *pwb* mutation specifically reactivates red and not the other secondary metabolites formed by *S. coelicolor* A3(2) in a *bldA* background and

causes red overproduction in a wild-type background. Sequence analysis of this *pwb* region of the red cluster is underway.

Antibiotic activity of actinomycetes inhabiting earthworm guts and surrounding soil

Little has been published on antibiotic activity of actinomycetes inhabiting earthworm guts. Ravasz *et al.* (1986) reported that 44 of 260 isolates were active against Gram-positive bacteria; inhibition of Gram-negative bacteria was minimal with only two strains exhibiting activity. The bioactivity of actinomycete isolates from earthworm guts and those of surrounding meadows in South Bohemia, Czech Republic were compared over time. The soil was entric cambisol (humus form mull, pH 5.5, C 2.74 %) and the gut actinomycete microflora of the two earthworm species, *Lumbricus rubellus* and *Octolasion rotundum* were chosen for study. Sampling, isolation, selection of strains and determination of bioactivity were as described in Kristufek *et al.* (1990, in press). Soil samples and earthworms were collected during August 1987, April 1989, October 1989 and August 1990.

Forty three percent (442) of the 1,018 actinomycetes isolated from the soil and earthworm gut content during four sampling periods displayed antimicrobial activity. In confirmation of the results of Ravasz *et al.* (1986), the inhibitory activity was directed against Gram-positive bacteria. Activity against Gram-negative bacteria was minimal with only 6 % of the isolates proving active. Bioactivity was higher in the autumn of 1989 compared with the summer, but the antifungal activity of bioactive actinomycetes isolated from earthworm guts was higher in August 1987. Differences in feeding biology of the two earthworm species and the dry soil conditions in August 1987 could account for the presence of quite different gut actinomycete communities (Kristufek *et al.*, 1990). During autumn, when earthworms are more active, little difference was found between the actinomycete community in the earthworm gut and in surrounding soil when compared with the dry summer (Kristufek *et al.*, in press). These results will be used to develop a strategy for discovering bioactive agents from the intestinal actinomycete microbiota of different earthworm species and surrounding soil.

Effect of glycerol on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*, producer of 16-membered macrolide

The production of spiramycin, a 16-membered macrolide antibiotic in *S. ambofaciens*, is influenced

by the nitrogen source used in the fermentation medium (Lebrihi *et al.*, 1992; Untrau *et al.*, 1992) but carbon regulation has not previously been studied. To determine whether spiramycin biosynthesis was affected by carbon catabolite regulation, the effect of carbon sources such as dextrans, glucose, glycerol was examined using *S. ambofaciens* RP 181110, a producer of spiramycin, and *B. subtilis* ATCC 6633 as the test organism in the agar plate diffusion assay for spiramycin. Spiramycin production was weaker with glycerol — around 82 and 65 % less than that obtained with dextrans and glucose, respectively. There was an inverse relationship between growth rate and spiramycin production on different carbon sources. When the initial concentration of glycerol was increased, growth rate increased and spiramycin production decreased. This negative effect was shown to be due to carbon source concentration rather than to an increase in specific growth rate. Additional glycerol inhibited spiramycin biosynthesis if added prior to the initiation of antibiotic biosynthesis, but after 72-h incubation, the effect of glycerol addition was considerably reduced.

Experiments involving a resting cell system (RCS) in which spiramycin biosynthesis occurs without growth were used to elucidate the effect of glycerol and to determine its enzymatic target. The influence of glycerol on acetyl-CoA carboxylase (ACC) biosynthesis, an enzyme responsible for feeding the polyketide synthetase system with substrates, was also investigated. The RCS cells were prepared by the method of Wei-Shou *et al.* (1984) and ACC assays were as described by Laakel (1992). In the RCS, regardless of the age of the cells (4 h or 72 h), the addition of glycerol in the presence or absence of streptomycin suppressed spiramycin production, suggesting that glycerol was either repressing or inhibiting the enzyme system leading to spiramycin biosynthesis. The ACC pattern showed two peaks of specific activity, one during growth and the second at stationary phase and a glycerol pulse stimulated these specific activities by 12.5 and 20 %, respectively. However, stimulation of ACC may not increase spiramycin production because an increase in growth rate caused by the glycerol pulse could divert the lower fatty acids pools towards growth and they would not be available for spiramycin biosynthesis.

References

- Anborgh, P.H. & Parmeggiani, A. (1991), New antibiotic that acts on the GTP-bound form of elongation factor Tu. *EMBO J.*, 10, 779-784.
- Bibb, M.J., Ward, J.M. & Cohen, S.N. (1985), Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.*, 199, 26-36.

- Cortes, J., Haydock, S.F., Roberts, G.A., Bevitt, D.J. & Leadlay, P.F. (1990), An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* (Lond.), 348, 176-178.
- Distler, J., Braun, C., Ebert, A. & Piepersberg, W. (1987), Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol. Gen. Genet.*, 208, 204-210.
- Fischer, E., Wolf, H., Hantke, K. & Parmeggiani, A. (1977), Elongation factor Tu resistant to kirromycin in an *Escherichia coli* mutant altered in both *tuf* genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.), 74, 4341-4345.
- Glockner, C. & Wolf, H. (1984), Mechanism of natural resistance to kirromycin-type antibiotics in actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, 121-124.
- Guthrie, E.P. & Chater, K.F. (1990), The level of a transcript required for production of a *Streptomyces coelicolor* antibiotic is conditionally dependent on a tRNA gene. *J. Bacteriol.*, 172, 6189-6193.
- Hanson, R.S. & Phillips, J.A. (1981), Chemical composition, in "Manual of methods for General Bacteriology" (P. Oerhart) (pp. 328-364). American Society for General Bacteriology, Washington, D.C.
- Hood, D.W., Heidstra, R., Swoboda, U.K. & Hodgson, D.A. (1992), Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism — a review. *Gene*, 115, 5-12.
- Hopwood, D.A. & Sherman, D.H. (1990), Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Ann. Rev. Genet.*, 24, 37-66.
- Hopwood, D.A., Bibb, N.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lidyate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. & Schrepf, H. (1985), Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. John Innes Inst. Found., Norwich, UK.
- Hotta, K. & Ishikawa, J. (1988), Strain- and species-specific distribution of the streptomycin gene cluster and *kan*-related sequences in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.*, 41, 1116-1123.
- Kristufek, V., Pizl, V. & Szabo, I.M. (1990), Composition of the intestinal streptomycete community of earthworms (Lumbricidae), in "Microbiology in Poecilotheims" (R. Lesel) (pp. 137-140). Elsevier Sciences Publ. B.V., Amsterdam.
- Laakel, M. (1992), Biosynthese de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*: regulation de la biosynthèse et caractérisation de l'acétate kinase et des systèmes fournisseurs du malonyl-CoA. Thèse INPL (ENSAIA), Nancy.
- Lancini, G. (1983), Ansamycins, in "Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics" (L.C. Vining) (pp. 231-254). Addison-Wesley, Reading, M.A.
- Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. & Germain, P. (1992), Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 382-387.
- Manova, S., Dimitrova, A. & Tzoneva, D. (1988), Determination of tobramycin, apramycin and kanamycin in fermentation broth using HPLC analysis. Abstracts of VII-th Nat. Conf. on Antibiotics, Razgrad, 7.
- Narva, K.E. & Feitelson, J.S. (1990), Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.*, 172, 326-333.
- Parmeggiani, A. & Swart, G.W.M. (1985), Mechanism of action of kirromycin-like antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39, 557-577.
- Phillips, L. & Wellington, E.M.H. (1992), The distribution of DNA sequences homologous to antibiotic production and resistance genes within type strains and wild isolates of *Streptomyces* species. *J. Antibiot.*, 45, 1481-1491.
- Ravasz, K., Zicsi, A., Contreras, E., Szell, V. & Szabo, I.M. (1986), Über die Darmaktinoinceten-Geinschaften einiger Regenwurm. *Opusc. Zool. Budapest*, 22, 85-102.
- Thein-Schranner, I., Zahner, H., Hans-Ullrich Hoppe, Hummel, I. & Zeeck, A. (1982), Metabolic products of microorganisms. 209*. Kirrothricin, a new member of the kirromycins. *J. Antibiot.*, 35, 948-956.
- Todorov, T.C. & Ivanova, M.M. (1989), Bacteriological method for determination of apramycin and carbamoyltobramycin in antibiotic complex produced by *S. tenebrarius*. *Bulg. Pat.*, 89887.
- Untrau, S., Lebrihi, A., Germain, P. & Lefebvre, G. (1992), Lysine catabolism in *Streptomyces ambofaciens* producer of macrolide antibiotic, spiramycin. *Curr. Microbiol.*, 25, 313-318.
- Wei-Shou, H., Brana, A.F. & Demain, A.L. (1984), Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 6, 155-160.

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

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DIVIES Charles, Professeur, ENSBABA, Campus de
Montluçon, Dijon.**

Monsieur LEBEAULT J.Michel, Professeur, UTC, Compiègne.

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



Mademoiselle LOUNÈS Anissa

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

**"Régulation de la biosynthèse de la spiramycine chez Streptomyces
ambofaciens par les sources azotées, carbonées et les ions phosphate.
Contrôle du catabolisme de la valine".**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

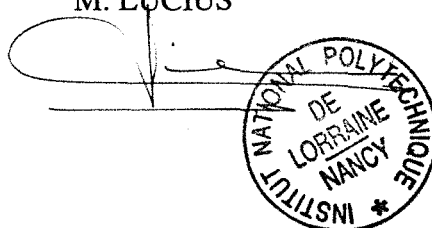
Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES ET INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, **20 Mai 1994**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS



Thèse réalisée par

REPRO CENTER

*Centre Commercial de Brabois
Rue du Morvan*

54500 VANDOEUVRE

© 83.44.05.69

Résumé : Ce travail contribue à l'étude de la régulation de la biosynthèse de la spiramycine, macrolide à 16 membres, chez *Streptomyces ambofaciens* par les sources azotées, carbonées et les phosphates. La valine favorise la production de spiramycine en fournissant des précurseurs de l'aglycone. En excès de valine, les ions ammonium libérés lors de son catabolisme font chuter la production. Ils inhibent et/ou répriment partiellement la valine déshydrogénase (VDH) et la cétoisovalérate déshydrogénase (CIVDH) ; deux enzymes du catabolisme de la valine. En présence de valine, les sources carbonées facilement assimilables (le glycérol) ont un effet inhibiteur sur la production de spiramycine. Le glycérol interférerait avec le catabolisme de la valine par inhibition et/ou répression des systèmes d'activation ou d'assimilation de l'isobutyrate. Une corrélation entre une teneur intracellulaire élevée en ATP, un excès de glycérol ou de phosphates et une suppression de la production de spiramycine a été observée. L'implication des métabolites phosphorylés en tant que médiateur commun aux deux effets négatifs phosphate et carbone a été suggérée. Les phosphates provoquent une réduction des biosynthèses de la VDH et des phosphatases alcalines. Grâce à des cultures semi-continues avec une alimentation carbone/azote contrôlée, la vitesse spécifique de production de spiramycine a été améliorée de douze fois. Suite à la mise en évidence d'une phase critique durant laquelle les différents substrats exercent leurs effets négatifs, une étude de la régulation de l'expression des protéines par les sources carbonée, azotée et les phosphates a été ébauchée par électrophorèse. Par une étude quantitative d'images nous avons cherché à établir une relation entre la morphologie de *S. ambofaciens* et la production de spiramycine.

Mots clés : *Streptomyces ambofaciens*, spiramycine, régulation, catabolisme de la valine, ions ammonium, glycérol, ions phosphate, semi-continu

Abstract : Regulation of spiramycin biosynthesis, a 16-membered macrolide produced by *Streptomyces ambofaciens* while growing on chemically defined medium, was found to be controlled by nitrogen, carbon and phosphate sources. Valine favoured spiramycin production by supplying good precursors (acetate, isobutyrate). In contrast, when it was used in excess it had a negative effect. Ammonium ions originated from its catabolism proved to be the cause. They exerted a partial inhibition and/or repression on two enzymes of valine catabolism : valine dehydrogenase (VDH) and cetoisovalerate dehydrogenase (CIVDH). In the presence of valine, carbon sources easily metabolized (glycerol), showed an inhibitor effect on spiramycin production. Glycerol interfered with valine catabolism by inhibiting and /or repressing the system of activation or assimilation of isobutyrate. A correlation between elevated intracellular concentration of ATP, an excess of glycerol or phosphate and suppression of spiramycin was observed. Implication of phosphorylated metabolites as a common mediator of phosphate and carbone effects was suggested. Excess of phosphate reduced VDH and alkaline phosphatase biosynthesis. By using fed-batch cultures with controlled carbon/azote feeding, the specific rate of spiramycin production was improved by twelve fold. Since the different substrats exerted their effect principally before the beginning of spiramycin production, a study of the regulation of protein expression was started by electrophoresis. Morphological evolution of *S. ambofaciens* with correlation of spiramycin production was followed by quantitative image analysis.

Key words : *Streptomyces ambofaciens*, spiramycin, regulation, valine catabolism, ammonium ions, glycerol, phosphate ions, fed-batch
