UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

1360071518 9

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

THESE

présentée à l'INPL par

Stéphane GUILLOUET
Ingénieur de l'Université de Marseille

pour obtenir le grade de

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

Sujet

Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* sous stress osmotique.

Soutenue publiquement le 16 février 1996 devant la commission d'examen :

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Membres du jury :

Président :	Mme **A. MARC :** Directeur de Recherche CNRS
Rapporteurs :	MM **P. GERVAIS :** Professeur ENSBANA
	G. LEBLON : Professeur Université Paris Sud XI
Examinateurs :	MM **J.M. ENGASSER :** Professeur ENSAIA (Directeur de thèse)
	G. LEFEBVRE : Professeur ENSAIA
	E. MAILLY : Ingénieur de Recherche ORSAN

"Mais l'homme parce qu'il n'a qu'une seule vie, n'a aucune possibilité de vérifier l'hypothèse par l'expérience de sorte qu'il ne saura jamais s'il a eu tort ou raison d'obéir à son sentiment."

Milan Kundera

(L'insoutenable légèreté de l'être)

A mes parents,
et à tous ceux qui ont contribué
au bon déroulement de ce travail
ils se reconnaîtront...

Aux 2.10^{15} corynebactéries
sacrifiées au cours de cette étude
au nom de la science !

AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur Daniel Tondeur, Directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de Nancy , et Madame Annie Marc, responsable du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires , de m'avoir accueilli dans leurs locaux.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Jean-Marc Engasser, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir suivi et encadré ce travail ainsi que pour les conseils qu'il m'a apportés.

Je remercie vivement Monsieur Emmanuel Mailly Ingénieur de Recherche à ORSAN, d'avoir également assuré le suivi scientifique de cette étude.

Je tiens aussi à remercier les chercheurs du centre de recherche de la société ORSAN ayant accompagné ce travail depuis la naissance du projet, jusqu'à son aboutissement : Mademoiselle Florence Duperray, Monsieur Vincent Morgant, Mademoiselle Dominique Petroff, Madame Puri Relano et Monsieur Franck Wojcik. Je les remercie pour leurs conseils judicieux et pour les différentes aides qu'ils ont su m'apporter.

J'exprime particulièrement ma reconnaissance à Serge Ankri, mon homologue à l'Institut de Génétique et Microbiologie, pour sa collaboration et nos discussions fructueuses.

Je remercie Messieurs Patrick Gervais, Professeur à l'ENSBANA de Dijon, et Gérard Leblon, Professeur à l'université de Paris XI, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Gérard Lefebvre, Professeur à l'ENSAIA, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Enfin, je tiens à remercier :
- les agités du premier étage : Luis, Anne et François (la filière mexicaine), Hela, Jamal, Hervé (pour les oies sauvages), Damien (le dernier, et exilé en cellules) pour une époque flamboyante
- la Coryneteam : Florence (the killeuse), Nicolas (pépère) et Stéphane (Birdy) pour les discussions en tout genre...
- ceux qui ont contribué à ce travail : Christine, Virginie, Elisabeth et Stéphane
- Fabrice Blanchard, Evelyne Ronat et Bernard Pariset pour leur aide technique
- tous les amis du laboratoire : Ali, Aurélio, Chantal, Chouki, Christelle, Danielle, Fabrice, Jean-Yves, Mumu, Wawa, Zahi et les autres thésards du GPBA
- Marylène pour son soutien et sa patience

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
d.p.m.	Désintégration par minute
GBq	Giga Becquerel
glc	Glucose
glu	Acide glutamique
MH	Matière humide
mM ou M	millimole (ou mole) par litre d'eau
mole/kg	Mole par kilogramme d'eau
MS	Matière sèche
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Osm	Osmole par kilogramme d'eau
$osmol.kg^{-1}$	Osmole par kilogramme d'eau
pro	Proline
$R_{x/s}$	Rendement de croissance sur glucose
tré	Tréhalose
VNO	Volume non osmotique
VVM	Volume d'air par volume de liquide et par minute

Lettres grecques

$\Delta\Pi$	Pression de turgescence
μ	Vitesse spécifique de croissance
μ_{max}	Vitesse spécifique maximale de croissance
νGlc	Vitesse spécifique de consommation de glucose
Π_{max}	Vitesse spécifique maximale d'accumulation de métabolites
$\Pi_{Tréhalose}$	Vitesse spécifique d'accumulation de tréhalose
$\Pi_{Proline}$	Vitesse spécifique d'accumulation de proline
Π_{intra}	Pression osmotique intracellulaire
Φ	Coefficient osmotique

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : *Synthèse bibliographique* 5

CHAPITRE II : *Matériel et méthodes* 47

CHAPITRE III : *Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture discontinue* 87

CHAPITRE IV : *Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture continue* 137

CHAPITRE V : *Etude de souches mutées dans la voie de biosynthèse de l'acide glutamique et de la proline : répercussions sur la réponse osmotique* 165

CHAPITRE VI : *Détermination de la pression de turgescence et étude de la réponse osmotique à partir de bilans osmotiques* 177

DISCUSSION - PERSPECTIVES 201

ANNEXES 212

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 221

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

❄ ❄ I ❄ ❄

Figure n°I.1 : Effet de l'osmolarité du milieu de culture sur la croissance de Clostridium pasteurianum. 8

Figure n°I.2 : Réponse volumique d'une cellule à un choc hyperosmotique 11

Figure n°I.3 : Récepteurs potentiels des changements physico-chimiques lors d'un choc osmotique.. 12

Figure n°I.4 : Variations du volume de B. subtilis soumis à des chocs hyperosmotiques croissants. 14

Figure n°I.5 : Vue schématique de la chambre de visualisation. 18

Figure n°I.6 : Evolution du volume de *S. cerevisiae* en réponse à un choc osmotique 18

Figure n°I.7 : Evolution du volume d'eau cytoplasmique d'E. coli avec l'osmolarité du milieu de culture et le taux de croissance 19

Figure n°I.8 : Effet de l'osmolarité externe sur la concentration intracellulaire en potassium d'E. coli 21

Figure n°I.9 : Localisation possible des systèmes de transport du potassium. 21

Figure n°I.10 : Comparaison des effets de différentes concentrations en NaCl et KCl sur l'activité spécifique in vitro de la glycéraldéhyde-3-P deshydrogénase de Halobacteroides acetoethylicuset Butyribacterium methylotrophicum 24

Figure n°I.11 : Voies possibles de biosynthèse de l'acide glutamique et des ses dérivés. 29

Figure n°I.12 : Voie principale de biosynthèse de la proline chez E. coli. 32

Figure n°I.13 : Voies alternatives de synthèse de la proline : 33

Figure n°I.14 : Concentration intracellulaire en tréhalose chez E. coli cultivée en milieu synthétique à différentes concentrations en NaCl. 36

Figure n°I.15 : Variations des concentrations cellulaires en potassium, glutamate et tréhalose après un ajout de NaCl chez E. coli. 36

Figure n°I.16 : Régulation de la biosynthèse de l'acide glutamique chez Brevibacterium flavum. 42

Figure n°I.17 : Voies de biosynthèse des solutés compatibles rencontrés chez les Corynebactéries. 44

Figure n°I.18 : Teneur intracellulaire en ectoïne et potassium chez B. linens cultivée à différentes concentrations en NaCl. 45

Figure n°I.19 : Teneur intracellulaire en acide pipécolique chez B. ammoniagenes cultivée à différentes concentrations en NaCl. 45

Figure n°I.20 : Evolution du pool intracellulaire en métabolites chez Brevibacterium linens cultivée en milieu synthétique contenant 1,5 M NaCl en présence de bétaïne ou de proline 46

❄ ❄ II ❄ ❄

Figure n°II.1 : Relation entre la densité optique d'une suspension de Corynebacterium glutamicum et sa concentration en biomasse sèche. 53

Figure n°II.2 : Principe de dérivatisation des acides aminés primaires et secondaires 54

Figure n°II.3 : Aminogramme type 56

Figure n°II.4 : Chromatogrammes types des acides organiques et sucres 58

Figure n°II.5 : Courbes typiques de congélation de l'eau et de solutions aqueuses 63

Figure n°II.6 : Protocoles d'extraction des métabolites intracellulaires 65

Figure n°II.7 : Système de prélèvement et de blocage rapide des échantillons 67

Figure n°II.8 : Influence du rapport (Biomasse prélevée / Volume de resuspension) sur l'extraction des métabolites organiques. 70

Figure n°II.9 : Effet du temps de centrifugation sur l'extraction des métabolites intracellulaires. 72

Figure n°II.10 : Effet du temps de blocage des échantillons sur l'extraction des métabolites cellulaires. 73

Figure n°II.11 : Protocole de la technique de mesure du contenu en eau des cellules 75

Figure n°II.12 : Evolution de la masse du culot humide et de la masse de liquide interstitiel en fonction de la masse sèche cellulaire chez Corynebacterium glutamicum 78

Figure n° II.13 : Schéma de principe du Coulter counter 78

Figure n°II.14 : Détermination de la pression osmotique intracelllulaire 81

❄ ❄ **III** ❄ ❄

- Publication -

Figure 1 : Effect of NaCl and Ficoll on the refractive index of bmcg medium 90

Figure 2 : Effect of the RI on the Optical Density of C. glutamicum suspension 90

Figure 3 : Kinetics of absorbance changes in a C. glutamicum suspension submitted to an osmotic upshift 91

Figure 4 : Kinetics of cell volume changes of C. glutamicum upon an osmotic upshift from 0.4 to 1.5, 2, 2.55 and 3.3 osmol/kg by addition of NaCl 92

- Publication -

Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the growth and glucose consumption of C. glutamicum. The fermentation was started at 0.4 osmol.kg-1 and NaCl added to rise the osmolality to 1.5 osmol.kg-1 96

Fig. 2 : Growth of C. glutamicum at increasing osmolality obtained by adding NaCl 97

Fig. 3 : Effect of medium osmolality on the maximum growth rate and the glucose to biomass growth yield of C. glutamicum grown on a defined medium 97

Fig. 4 : Effect of a saline upshock on the intracellular potassium and sodium content for C. glutamicum grown on a defined medium. 98

Fig. 5 : Effect of a saline upshock on the intracellular proline, glutamate and trehalose content for C. glutamicum grown on a defined medium. 99

Fig. 6 : Effect of medium osmolality on the maximum intracellular content of proline, glutamate and trehalose of C. glutamicum grown on a defined medium. 100

Figure III.1 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le taux maximum de croissance et le rendement de croissance sur glucose de Corynebacterium glutamicum cultivée en milieu BMCG. 105

Figure n°III.2 : Effet d'un choc osmotique sur le contenu cellulaire en acide glutamique , proline et tréhalose de C. glutamicum ATCC 17965. La fermentation a débuté à 0,4 osmol.kg-1 puis du NaCl a été ajouté au milieu de manière à élever l'osmolalité à 2, 2,2 , 2,7 et 3 osmol.kg-1. 106

Figure n°III.3 : Effet de l'osmolalité du milieu sur le contenu cellulaire maximal en acide glutamique, proline et tréhalose 107

Figure n°III.4 : Effet de l'osmolalité du milieu sur les vitesses spécifiques maximale d'accumulation de proline et d'acide glutamique 109

- Publication -

Fig. 1 : Effect of an osmotic upshock carried by NaCl, KCl , galactose, glycerol or sorbitol addition on the intracellular glutamic acid, proline and trehalose content of C. glutamicum. 117

Fig. 2 : Effect of the external glycerol concentration on the intracellular glutamic acid, proline and trehalose content of C. glutamicum 118

Figure n°III.5 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites sur une culture de C. glutamicum ATCC 14752 à 0,4 osmol.kg-1 et à 1,5 osmol.kg-1 122

Figure n°III.6 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le taux maximum de croissance et le rendement de croissance sur glucose chez C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 123

Figure n°III.7 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le contenu cellulaire maximal en proline, acide glutamique et tréhalose chez C. glutamicum ATCC17965 et 14752 125

Figure n°III.8 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de proline et d'accumulation de métabolites chez C. glutamicum ATCC 14752 cultivée en présence de 1,2 g/l de proline 127

Figure n°III.9 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de proline et d'accumulation de métabolites chez C. glutamicum ATCC 14752 cultivée en présence de 2,5 g/l de proline 128

Figure n°III.10 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de bétaïne et d'accumulation de métabolites chez C. glutamicum ATCC 17965 cultivée en présence de 14 g/l de bétaïne. 133

Figure n°III.11 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de bétaïne et d'accumulation de métabolites chez C. glutamicum ATCC 14752 cultivée en présence de 14 g/l de bétaïne. 134

❄ ❄ IV ❄ ❄

- Publication -

Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of C. glutamicum 142

Fig. 2 : Effect of growth rate on the steady-state glutamate, proline and trehalose content of C. glutamicum grown in continuous culture at different osmolalities : 0.4 osmol.kg-1, 0.85 osmol.kg-1, 1.5 osmol.kg-1, 2.4 osmol.kg-1. 144

Fig. 3 : Effect of growth rate on the glucose-specific consumption rate of C. glutamicum grown in glucose-limited continuous culture at different osmolalities : 145

- Publication -

Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of C. glutamicum grown in an ammonia-limited continuous culture at a dilution rate of 0.25 h-1. 152

Fig. 2 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of C. glutamicum grown in a potassium-limited continuous culture at a dilution rate of 0.1 h-1. 153

Fig. 3 : Effect of a pulse of potassium on the intracellular solute content of C. glutamicum grown in a potassium-limited continuous culture at a medium osmolality of 1.2 osmol.kg-1 and at a dilution rate of 0.1 h-1. 154

Fig . 4 : Effect of nutrient limitation on the steady-state intracellular content of C. glutamicum grown in continuous culture at osmolalities of 0.4 and 1.2 osmol.kg-1 and a dilution rate of 0.1 h-1: 156

Fig . 5 : Effect of the nutrient limitation on the steady-state intracellular ionic content of C. glutamicum grown in continuous cultures at an osmolality of 0.4 and 1.2 osmol.kg-1 and a dilution rate of 0.1 h-1: 157

Fig . 6 : Comparison between the steady-state intracellular content of C. glutamicum grown in continuous culture under different nutrient limitation at an osmolality of 1.2 osmol.kg-1 and a dilution rate of 0.1 h-1 159

Figure n°IV.1 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de proline et de tréhalose à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 sous limitation glucose et à différentes osmolalités : 0,4, 0,85, 1,5 et 2,4 osmol.kg-1. 160

Figure n°IV.2 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de tréhalose à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 à 1,2 osmol.kg-1 sous limitation: glucose, potassium et ammonium 161

Figure n°IV.3 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de proline et de tréhalose à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 à 0,4 et 1,2 osmol.kg-1 sous limitation potassium et ammonium 162

❄ ❄ **V** ❄ ❄

Figure n°V.1 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant gdhA à 0,4 osmol.kg-1 et à 1,5 osmol.kg-1 167

Figure n°V.2 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant proA à 0,4 osmol.kg-1 et à 1,5 osmol.kg-1 171

Figure n°V.3 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant proC à 0,4 osmol.kg-1 et à 1,5 osmol.kg-1 174

Figure n°V.4 : Voies de biosynthèses de la proline et de la lysine 175

❄ ❄ **VI** ❄ ❄

Figure n°VI.1 : Evolution du volume cellulaire de C. glutamicum ATCC 17965, cultivée à 0,4 osmol.kg-1 et soumise à des chocs osmotiques croissants, en fonction de l'inverse de l'osmolarité externe.. 179

Figure n°VI.2 : Evolution de la pression osmotique intracellulaire et de la pression de turgescence de C. glutamicum ATCC 17965, en phase de croissance, en fonction de l'osmolarité du milieu de culture. 181

Figure n°VI.3 : Evolution de la vitesse spécifique de croissance et de la pression de turgescence au cours d'une culture de C. glutamicum ATCC 17965 soumise à un choc osmotique par addition de sorbitol 182

Figure n°VI.4 : Evolution de la pression de turgescence de C. glutamicum ATCC 17965 pendant la phase exponentielle de croissance en fonction de la vitesse spécifique de croissance moyenne. 183

Figure n°VI.5 : Evolution de la pression de turgescence de C. glutamicum ATCC 14752 , des mutants3gdhA et proA en croissance en fonction de la vitesse spécifique de croissance moyenne. 185

Figure n°VI.6 : Evolution de la pression de turgescence en fonction du taux de croissance d'une culture continue de C. glutamicum ATCC 17965 sous limitation glucose à 0,4 et 1,4 osmol.kg-1. 184

Figure n°VI.7 : Bilan osmotique de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivée à 0,4 osmol.kg-1. 192

Figure n°VI.8 : Bilans osmotiques de C. glutamicum ATCC 17965 cultivée à différentes pressions osmotiques. Osmolyte dépresseur : NaCl. 193

Figure VI.9 : Evolution de la pression osmotique intracellulaire mesurée et calculée au cours d'une culture de C. glutamicum ATCC 17965 à 0,4 puis 2 osmol.kg-1, après addition de NaCl 195

Figure n°VI.10 : Bilan osmotique de C. glutamicum ATCC 17965 cultivée à 1,5 osmol.kg-1 après ajout de différents osmolytes dépresseurs. 195

Figure n°VI.11 : Bilans osmotiques de C. glutamicum et des souches recombinées cultivées à 0,4 osmol.kg-1 197

Figure n°VI.12 : Bilans osmotiques de C. glutamicum et des souches recombinées cultivées à 1,5 osmol.kg-1. 198

Tableaux :

❄ ❄ **I** ❄ ❄

Tableau n°I.1 : Niveaux de tolérance en NaCl de quelques microorganismes. 7

Tableau n°I.2 : Valeurs de turgescence et de volume non-osmotique chez quelques microorganismes 16

Tableau I.3 : Liste des solutés compatibles et osmoprotecteurs bactériens 26

❄ ❄ **II** ❄ ❄

Tableau n°II.1 : Caractéristiques de l'espèce bactérienne Corynebacterium glutamicum 47

Tableau n°II.2 : Description des souches recombinées 48

Tableau n° II.3 : Quantités de glutamate et tréhalose récupérées au cours des protocoles d'extraction différant par le mode de récupération et d'extraction. 69

Tableau n°II.4 : Quantités de glutamate et de tréhalose relarguées lors de 2 extractions successives 71

Tableau n°II.5 : Quantités d'acide glutamique, de proline et de tréhalose extraits par la technique de congélation/décongélation. 73

❄ ❄ **III** ❄ ❄

Tableau n°III.1 : Mesures des activités spécifiques enzymatiques au cours d'une culture discontinue de C. glutamicum ATCC 17965 soumise à un choc osmotique de 0,4 à 2,7 osmol.kg-1 109

- Publication -

Table 1 : Effect of the nature of the osmolyte used to the osmotic upshock on the maximum growth rate and the glucose-to-biomass growth yield of Corynebacterium glutamicum grown on a defined medium. 115

Tableau n°III.2 : Récapitulation des paramètres de croissance et des contenus cellulaires en métabolites de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 124

Tableau n°III.3 : Valeurs de μmax de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivées en absence et en présence de bétaïne à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 131

❄ ❄ **IV** ❄ ❄

- Publication -

Table 1 : Effect of the growth rate on the steady-state intracellular content of C. glutamicum grown in ammonia-limited continuous culture at osmolalities of 0.4 and 1.2 osmol.kg-1. 151

❄ ❄ **V** ❄ ❄

Tableau n°V.1 : Activités spécifiques mésurées chez C. glutamicum ATCC 14752 et gdhA. 166

Tableau n°V.2 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites deC.glutamicum ATCC 14752 et gdhA cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 168

Tableau n°V.3 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites deC. glutamicum ATCC 14752 et proA cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 172

Tableau n°V.4 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites deC. glutamicum ATCC 14752 et proC cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 173

❄ ❄ **VI** ❄ ❄

Tableau n°VI.1 : Valeurs de pression osmotique intracellulaire (Πintra), pression de turgescence (ΔΠ) et du volume non-osmotique chez C. glutamicum ATCC 17965 cultivée à 0,4 osmol.kg-1. 179

Tableau n°VI.2 : Valeurs de pression de turgescence (ΔΠ) et du volume non-osmotique (VNO) pendant la phase exponentielle de croissance de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivées à 0,4 osmol.kg-1. 180

Tableau n°VI.3 : Valeurs de pression de turgescence pendant la phase exponentielle de croissance de différentes souches de C. glutamicum cultivées en milieu BMCG à 0,4 et 1,5 osmol.kg-1. 181

Tableau n°VI.4 : Contenu en eau de Corynebacterium glutamicum ATCC 17965. 186

Tableau n°VI.5 : Teneur en eau de Corynebacterium glutamicum ATCC 17965 en phase exponentielle de croissance à différentes pressions osmotiques générées par des osmolytes divers. 187

Tableau n°VI.6 : Valeurs moyennes des concentrations molales intracellulaires en métabolites chez Corynebacterium glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg-1. 189

Tableau VI.7 : Concentrations intracellulaires moyennes en métabolites chez C. glutamicum ATCC 17965 cultivée en milieu BMCG-glucose à 0,4 osmol.kg-1. 190

Tableau VI.8 : Valeurs de coefficient osmotique intracellulaire calculées chez C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg-1. 191

INTRODUCTION

Introduction

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme d'étude réalisé par un Groupement de Recherche entre la société ORSAN et le CNRS. L'objectif de ce programme est d'acquérir une meilleure maîtrise des processus contrôlant la physiologie et le métabolisme de *Corynebacterium glutamicum*. Ces travaux devraient permettre d'orienter l'amélioration génétique des souches et d'optimiser les conditions de culture pour la production d'acide glutamique.

L'acide glutamique est l'acide aminé le plus produit dans le monde, à l'heure actuelle sa production annuelle dépasse les 800 000 tonnes. Cet acide aminé est utilisé dans de nombreuses industries (pharmaceutique, chimique, cosmétique), mais son utilisation principale est l'alimentation humaine. Il est employé comme exhausteur de goût dans de nombreux aliments déshydratés (soupes, bouillons...) qui ont perdu de leur saveur lors de leur fabrication. Il est particulièrement utilisé en Asie comme assaisonnement au même titre que le sel de table en Europe, le marché asiatique est, de ce fait, le plus important en volume.

Le glutamate est produit par fermentation. Les principaux producteurs mondiaux sont asiatiques. Une seule entreprise européenne est présente sur ce marché, la société ORSAN, dont la part sur le marché mondial est d'environ 8-10 %.

La fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* est l'une des "fermentations" les plus délicates à maîtriser. Pour une souche donnée, la concentration finale en acide glutamique dépend fortement de la composition du milieu de culture et des conditions de pilotage du procédé. Une des particularités du procédé ORSAN est l'ajout de surfactants au cours de la culture permettant de provoquer une transition rapide du métabolisme bactérien d'une phase de croissance vers une phase de production intense de glutamate. Par ailleurs, la fermentation se déroule dans des conditions de forte pression osmotique du fait de la valeur osmotique importante de la mélasse et de l'accumulation continue d'acide glutamique. Il existe au cours de ce procédé une production annexe de métabolites tels que d'autres acides aminés (alanine, proline) et de sucre (tréhalose). Ces composés sont cités dans la littérature comme ayant un rôle dans les phénomènes de régulation osmotique chez certaines bactéries telles que *Escherichia coli*.

La production de glutamate dépend de la quantité et de la nature des surfactants, mais aussi de l'état physiologique de la cellule au moment de l'ajout des surfactants (Mondain-Monval, 1988). Il a été ainsi montré que la pression osmotique du milieu est un des facteurs importants pouvant influencer le taux de croissance de la bactérie, la productivité en glutamate et la production des métabolites annexes. Il est donc nécessaire d'acquérir des connaissances sur l'effet d'une osmolarité élevée sur la physiologie de la bactérie en phase de croissance avant l'ajout des surfactants. Dans un premier temps, Wojcik (1992) a observé chez *Corynebacterium glutamicum* une accumulation de proline et de tréhalose en réponse à un choc osmotique. Suite à ces travaux, un approfondissement de l'étude physiologique s'est avéré nécessaire.
L'objectif général de ce travail est donc l'étude du comportement cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* lors de la première phase de croissance dans des conditions de stress osmotique.
Dans le cadre du Groupement de Recherche, une étude est réalisée parallèlement sur les gènes impliqués dans la réponse osmotique et notamment les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la proline (Institut de Génétique et de Microbiologie, Orsay). Nous étudierons également le comportement des souches génétiquement modifiées ainsi obtenues vis à vis d'un choc osmotique.

La régulation osmotique chez les microorganismes a été très étudiée chez les entérobactéries, et notamment chez *Escherichia coli*, mais peu chez les corynebactéries. Ainsi, sur les 76 publications traitant de l'osmorégulation bactérienne recencées au cours de ce travail seulement 9 concernent les corynebactéries *Brevibacterium* (7) et *Corynebacterium* (3). L'osmorégulation est un sujet complexe à étudier, en effet un grand nombre de réponses peuvent avoir lieu à différents niveaux (extracellulaire, intracellulaire et moléculaire) et concerner plusieurs composés de la cellule (eau, ions, métabolites, macromolécules....). Ces réponses ont pour objectif de rétablir une pression de turgescence positive (différence entre la pression osmotique interne et externe) généralement admise comme nécessaire à la croissance bactérienne (Csonka et Hanson, 1990).

Au cours de cette étude, dont la démarche est schématisée dans la Figure n°1, nous tenterons de répondre aux question suivantes :

- Quelle est la réponse de *Corynebacterium glutamicum* à un choc hyperosmotique et comment varie-t-elle en fonction des conditions de culture et de croissance (milieu limité ou non, nature de la limitation, nature de l'osmolyte dépresseur) ?

- Quelle est l'interprétation métabolique des phénomènes observés ?

- Quel est le rôle de la pression de turgescence ?

- Quels sont les similitudes et les différences de la réponse osmotique entre *C. glutamicum* et les autres bactéries ?

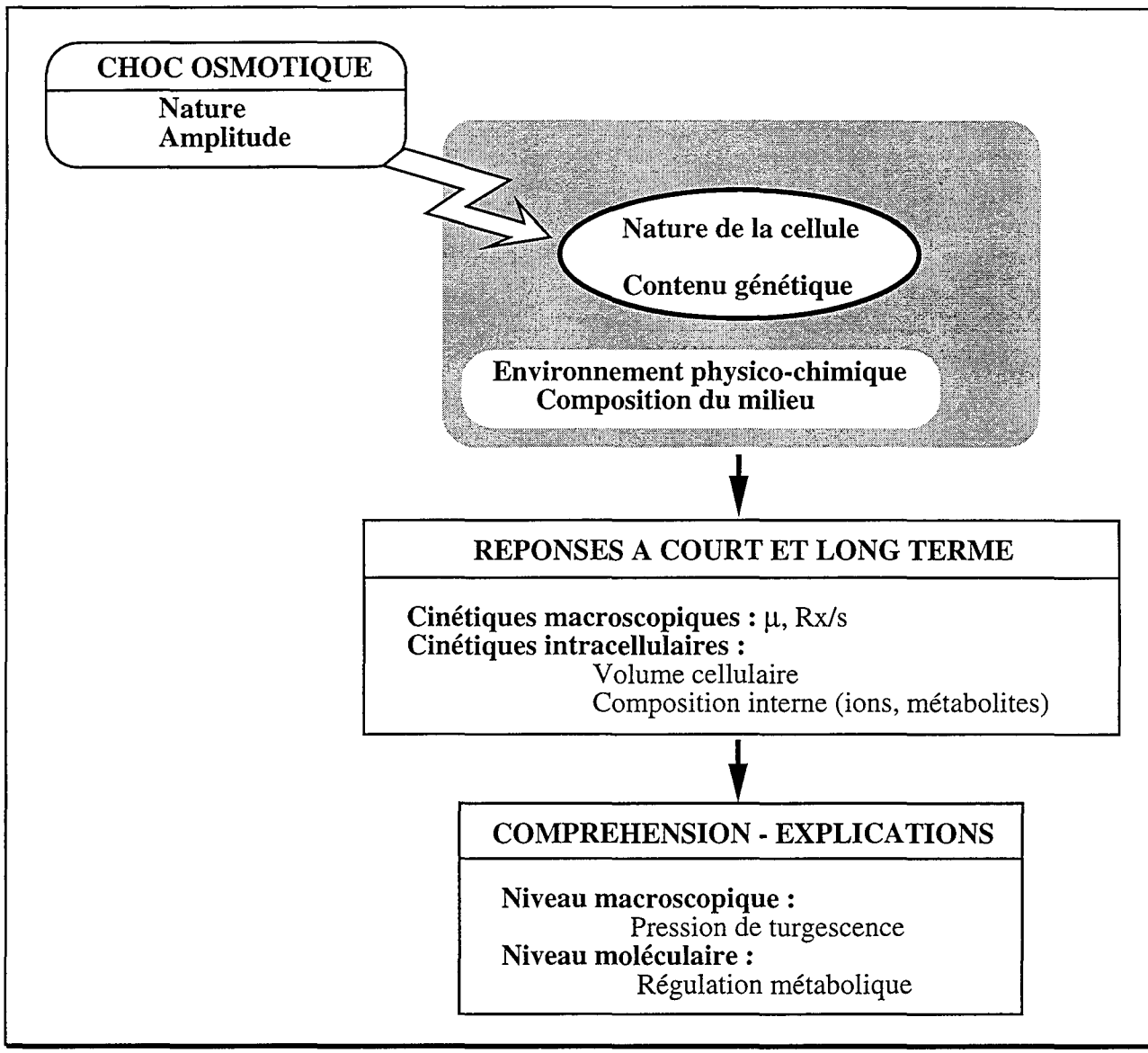


Figure n°1 : Démarche suivie au cours de ce travail.

Avant de débuter l'étude proprement dite, il s'est avéré nécessaire de mettre au point un certain nombre de techniques permettant de quantifier, au niveau intracellulaire, les différents intervenants de la réponse osmotique. Ce travail est présenté dans le chapitre Matériel et Méthodes.

La première partie de notre travail est consacrée à l'étude de la réponse osmotique de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 lors de cultures discontinues en milieu

synthétique. L'évolution de la teneur intracellulaire en différents composés (ions, acides aminés, sucres) sera notamment suivie au cours de ces cultures.

Dans la deuxième partie, une étude en culture continue sera effectuée avec la souche ATCC 17965 soumise à une addition de NaCl. Cette étude nous permettra d'étudier l'influence des conditions de culture, de croissance et de composition du milieu de culture sur la réponse osmotique.

La troisième partie est consacrée à l'étude du comportement de souches génétiquement modifiées face à un choc osmotique. Les souches étudiées ont été mutées à l'Institut de Génétique et Microbiologie (Orsay) sur la voie de biosynthèse de l'acide glutamique et de la proline. Nous déterminerons les répercussions de ces mutations sur la réponse osmotique de *C. glutamicum* ATCC 14752.

La dernière partie aborde l'étude de la pression osmotique intracellulaire. Dans un premier temps, des mesures de l'osmolalité interne des bactéries seront réalisées sur les différentes souches en culture discontinue et continue. Ces valeurs expérimentales pourront être comparées à celles calculées à partir des concentrations intracellulaires en métabolites. Cette partie nous permettra de vérifier si aucun intervenant important de la réponse osmotique n'aura été oublié.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Aspects généraux de l'osmorégulation 5

I.1. Généralités 5

I.1.1. Importance de la pression osmotique dans les systèmes biologiques 5

I.1.2. Influence de la pression osmotique sur la croissance microbienne 6

I.2. Réponses cellulaires à un choc osmotique : osmorégulation 8

I.2.1. Définitions 8

I.2.2. Examen des signaux déclenchant la réponse osmotique 12

I.2.3. Pression de turgescence 13

I.2.3.1. Techniques de mesure de la pression de turgescence 13

I.2.3.2. Niveaux de pression de turgescence chez les microorganismes 15

I.2.4. Phase passive de l'osmorégulation : étude de la variation du volume cellulaire 17

I.2.5. Phase active de l'osmorégulation 20

I.2.5.1. Rôle osmotique des ions 20

a. Potassium 20

b. Sodium 23

c. Contre-ion 25

I.2.5.2. Rôle osmotique des solutés compatibles 25

a. Acides aminés 28

α Acide glutamique 28

β Glutamine 31

γ Proline 32

b. Tréhalose 34

c Autres solutés compatibles 37

I.2.5.3. Rôle des osmoprotecteurs 37

a. Proline 37

b Bétaïnes 38

II. Osmorégulation chez les corynebactéries 41

II.1. Etendue des connaissances actuelles 41

II.2. Métabolites intervenant dans l'osmorégulation 41

II.2.1. Ions 41

II.2.2. Solutés compatibles 42
II.2.2.1. Acides aminés 42
a. Acide glutamique 42
b. Glutamine 43
c. Proline 43
II.2.2.2. Tréhalose 44
II.2.2.3. Autres solutés compatibles 44
II.2.3. Osmoprotecteurs 45
II.2.3.1. Proline 45
II.2.3.2. Bétaïnes 46

Synthèse bibliographique

Dans cette synthèse bibliographique, les différents aspects de la réponse cellulaire à un choc osmotique seront développés uniquement chez les microorganismes (bactéries principalement et levures). Nous ne parlerons pas notamment de l'osmorégulation chez les champignons et les plantes laquelle a été traitée par Hellebust (1976).

Dans une première partie, les aspects généraux de l'osmorégulation chez les microorganismes seront décrits, dans une seconde partie une synthèse des connaissances actuelles sur les corynebactéries dans ce domaine sera présentée.

Enfin des rappels sur la pression osmotique (définitions, bases thermodynamiques) ont été mis en Annexe I.

I. Aspects généraux de l'osmorégulation

I.1. Généralités

I.1.1. Importance de la pression osmotique dans les systèmes biologiques

La pression osmotique est l'un des paramètres physiques qui détermine la capacité pour un organisme à survivre ou à proliférer dans un habitat donné.

Les pressions osmotiques rencontrées dans les habitats naturels varient en fonction de la salinité du milieu. Elles peuvent atteindre des valeurs très élevées dans des environnements extrêmes tels que les marais salants ou les lacs salés où la concentration en NaCl, sel le plus souvent dominant, peut atteindre la saturation.

L'étude de l'osmorégulation a d'importantes applications principalement dans le domaine de la microbiologie alimentaire mais aussi dans celui de la microbiologie des sols (interactions plantes-microorganismes) et la microbiologie médicale (osmorégulation de souches virulentes) (Csonka et Hanson, 1991). L'intérêt des études dans le domaine de l'alimentaire est lié le plus souvent aux problèmes de conservation des aliments et de leur dégradation par les microorganismes (Troller, 1980), à la fermentation des aliments (Gervais *et al.*, 1988) et à l'exploitation des mécanismes d'osmorégulation microbienne pour la production industrielle de métabolites (Bégué *et al.*, 1990).

I.1.2. Influence de la pression osmotique sur la croissance microbienne

De nombreux auteurs ont décrit les relations liant l'osmolarité du milieu de culture et la croissance microbienne.

Pour chaque microorganisme donné, il existe une pression osmotique caractéristique au-dessus de laquelle il n'y a plus de croissance microbienne. Les valeurs de ces osmolarités limites de croissance sont reportées pour un certain nombre d'espèces dans le tableau n°I.1. Ces données permettent de discriminer les espèces microbiennes et de les classer selon leur tolérance osmotique. Mais ce classement ne peut être réalisé qu'à titre indicatif, il existe en effet des variabilités inter- et intraspécifiques.

Parmi les micro-organismes, il existe des espèces particulièrement tolérantes à la pression osmotique du milieu. Elles peuvent résister à des valeurs élevées de pression osmotique ; ce sont les espèces osmotolérantes ou xérotolérantes.

D'autres espèces ne peuvent pousser qu'à partir de pression osmotique relativement élevée (2 osmol.kg^{-1}). Ce sont les espèces dites xérophiles.

La pression osmotique minimale à laquelle un microorganisme peut se développer est supérieure à zéro puisque cette valeur correspond à l'eau pure. L'ajout du moindre nutriment élève cette valeur.

L'osmolalité maximale théorique à laquelle pourrait se développer tout microorganisme est d'environ 33 osmol.kg^{-1} (a_W = 0,55) puisque l'ADN se désordonne à cette pression osmotique (Brown, 1990).

Microorganisme	Tolérance au NaCl (M)	Osmolalité (osmol.kg^{-1})	Sensibilité
Bactéries Gram $^-$			Espèces sensibles
Pseudomonas	0 à 0,7	0 à 1,3	
Enterobactéries	0 à 1,4	0 à 2,7	
Bactéries marines	0,2 à >1,4	0,4 à >2,7	
Bactéries Gram $^+$			Sensibilité modérée
Clostridium botulinum	0 à 2	0 à 3,9	
Bacillus subtilis	0 à 3	0 à 6,3	
Lactobacillus plantarum	0 à 1,6	0 à 3,1	
Levures			
Saccharomyces	0 à 3	0 à 6,3	
Bactéries halophiles modérées			Espèces xérotolérantes
Halomonas elongata	0,05 à 3,4	0,1 à 7,3	
Clostridium lortetii	1 à 2	1,9 à 3,9	
Vibrio costicola	0,2 à 4	0,4 à 8,9	
Staphylococcus aureus	0 à 3	0 à 6,3	
Moisissures			
Penicillium	0 à 6	0 à 15	
Aspergillus	0 à 6	0 à 15	
Actinomycetes halophiles			Espèces xérophiles
Actinospora halophila	2 à saturation	3,9 à >>	
Halobactéries			
Groupes I et II	2 à saturation	3,9 à >>	
Groupes III et IV	1 à 5	1,9 à 11,9	

Tableau n°I.1 : Niveaux de tolérance en NaCl de quelques microorganismes. *Données tirées de Berner (1994), Brown (1990) et Troller (1987)*

De nombreuses publications montrent que la croissance microbienne est liée à l'osmolarité du milieu. Les courbes reliant la pression osmotique du milieu de culture et la vitesse spécifique maximale de croissance ont une allure caractéristique présentée figure n°I.1.

Il existe pour chaque espèce une pression osmotique optimale de croissance différente de zéro. Cet optimum a été observé chez les bactéries (Scott, 1957 ; Walter *et al.*, 1987 ; Bassit *et al.*, 1993 ; Nunes *et al.*, 1995), les champignons filamenteux (Gervais *et al.*, 1988), les levures (Anand et Brown, 1968 ; Gustafsson et Larsson, 1990) et les cellules animales (Øyaas *et al.*, 1994) et végétales en culture.

L'allure des courbes de croissance en fonction de l'osmolarité du milieu de culture peut varier en fonction de l'osmolyte dépresseur utilisé (*cf* Figure n°I.1). Ainsi *Clostridium pasteurianum* ne pousse plus au dessus de 1,6 osmol.kg^{-1} lorsque l'osmolyte utilisé est le KCl ou le xylitol alors qu'il peut se développer jusqu'à 3,5 osmol.kg^{-1} avec du glycérol comme osmolyte dépresseur. Les solutés "imperméants" (KCl, Xylitol) affectent plus la croissance bactérienne que les solutés "perméants" (glycérol) (Walter *et al.*, 1987).

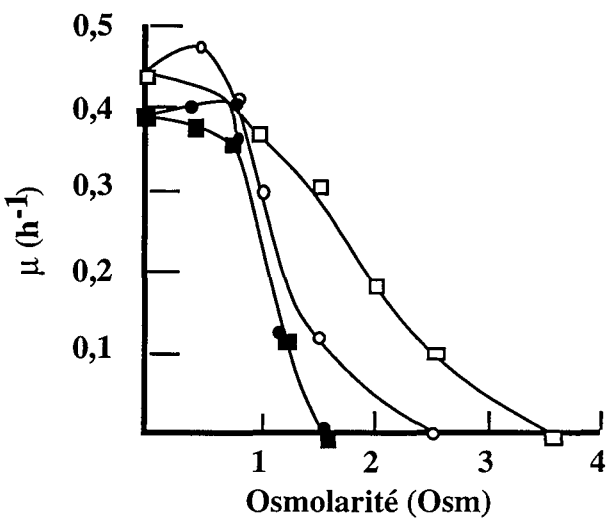


Figure n°I.1 : Effet de l'osmolarité du milieu de culture sur la croissance de *Clostridium pasteurianum*. Les solutés dépresseurs utilisés sont le xylitol (■), le glycérol (□), le KCl (●) et l'acétamide (○). *(D'après Walter et al., 1987)*

D'après les auteurs, il semble que les effets inhibiteurs prédominants soient dus à l'établissement d'une différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane plutôt que par l'augmentation de l'osmolarité en soi.

I.2. Réponses cellulaires à un choc osmotique : osmorégulation

I.2.1. Définitions

Toute cellule en croissance dans un milieu de culture donné se trouve dans un "état d'équilibre osmotique". Il est généralement admis par de nombreux auteurs qu'elle tend à maintenir dans son cytoplasme une pression osmotique supérieure à celle du milieu de culture. Cette différence positive entre osmolarité intra- et extracellulaire est appelée **pression de turgescence**. Une modification de la pression osmotique du milieu exocellulaire modifie donc cet

état d'équilibre. On parlera ici de choc osmotique pour une variation de grande amplitude dans un temps très court de la pression osmotique extracellulaire.

Deux types de choc osmotique sont distingués :

- ❑ **choc hypoosmotique** : la variation de pression osmotique du milieu de culture est réalisée vers des valeurs plus faibles (dilution du milieu).

- ❑ **choc hyperosmotique** : la pression osmotique du milieu exocellulaire est augmentée par l'ajout d'osmolytes.

Les chocs hypoosmotiques amènent la cellule dans des milieux peu contraignants puisque la croissance est possible. Ils n'ont pour cela qu'un faible intérêt. Nous ne parlerons donc ici principalement que des chocs hyperosmotiques.

L'ensemble des événements physiologiques successifs à une variation de la pression osmotique du milieu de culture est regroupé sous le terme d'**osmorégulation**. La définition de ce terme varie quelque peu selon les auteurs. Ainsi Brown (1990) a fait un bref rappel de l'évolution de cette notion au cours de ces 20 dernières années. Il remarque que la définition qui est donnée de l'osmorégulation dépend fortement du paramètre considéré comme élément régulé.

Hellebust (1976) définit l'osmorégulation comme "*l'ensemble des mécanismes par lequel les plantes régulent la pression osmotique dans leurs cellules. Cela implique la régulation de la pression de turgescence chez les cellules avec paroi, la régulation du volume cellulaire chez les cellules nues.*"

Brown et Edgley (1980) reprennent cette définition comme étant "*la maintenance d'une pression de turgescence et d'un volume cellulaire à peu près constant face à un changement du potentiel hydrique*".

Mais Bisson et Bartholomew (1984) précisent que s'il faut utiliser le terme d'osmorégulation avec précision, il faudrait parler de régulation d'une propriété "osmotique" ou colligative d'une solution; c'est-à-dire régulation de l'activité de l'eau, du potentiel hydrique ou de la pression osmotique du milieu intracellulaire.

La réponse d'une cellule à une variation de la pression osmotique exocellulaire a été décrite par Zimmermann (1978). La réponse cellulaire à la suite d'un choc hyperosmotique peut se décomposer en 2 ou 3 phases (*cf* Figure n°I.2).

❑ **une phase passive** purement thermodynamique : les membranes cellulaires étant complètement perméables à l'eau, lorsque l'équilibre osmotique de chaque coté de la membrane cellulaire est perturbé par l'ajout d'un osmolyte dans le milieu exocellulaire, un efflux d'eau de la cellule est observé. Ce mouvement d'eau est passif et simplement régi par la loi de l'osmose.

Cette sortie d'eau entraîne souvent une variation du volume cellulaire. Cette phase est très rapide et dure quelques secondes.

❑ **une phase active** : au cours de cette phase, la cellule tend à restaurer son volume initial. Elle va accumuler un certain nombre restreint de solutés dans le cytoplasme afin de rétablir une pression de turgescence. Cette accumulation de solutés peut se faire par synthèse *de novo* ou simplement par transport si ils sont présents dans le milieu de culture. Csonka et Hanson (1991) distinguent ces composés en deux catégories :

○ les molécules accumulées par synthèse *de novo* sont appelées **solutés compatibles** du fait de leur compatibilité à maintenir les protéines cellulaires dans un état fonctionnel (Brown et Simpson, 1972)

○ les molécules accumulées par transport sont appelées **composés osmoprotecteurs**

Cette accumulation de solutés entraîne un flux d'eau vers l'intérieur de la cellule et permet donc de restaurer le volume cellulaire initial. Cette phase active, consommatrice d'énergie, a une durée plus longue que la première.

A la fin de cette dernière phase, du fait des nouvelles conditions intracellulaires, l'ensemble des réactions métaboliques peuvent reprendre. Une reprise de la croissance des cellules est observée. Les cellules doivent néanmoins maintenir une osmorégulation permanente. Blomberg *et al.* (1988) introduit alors une troisième phase d'**osmorégulation homéostatique** qui correspond au maintien de la pression de turgescence.

Il faut noter qu'il est souvent difficile de distinguer le moment de transition entre ces trois phases.

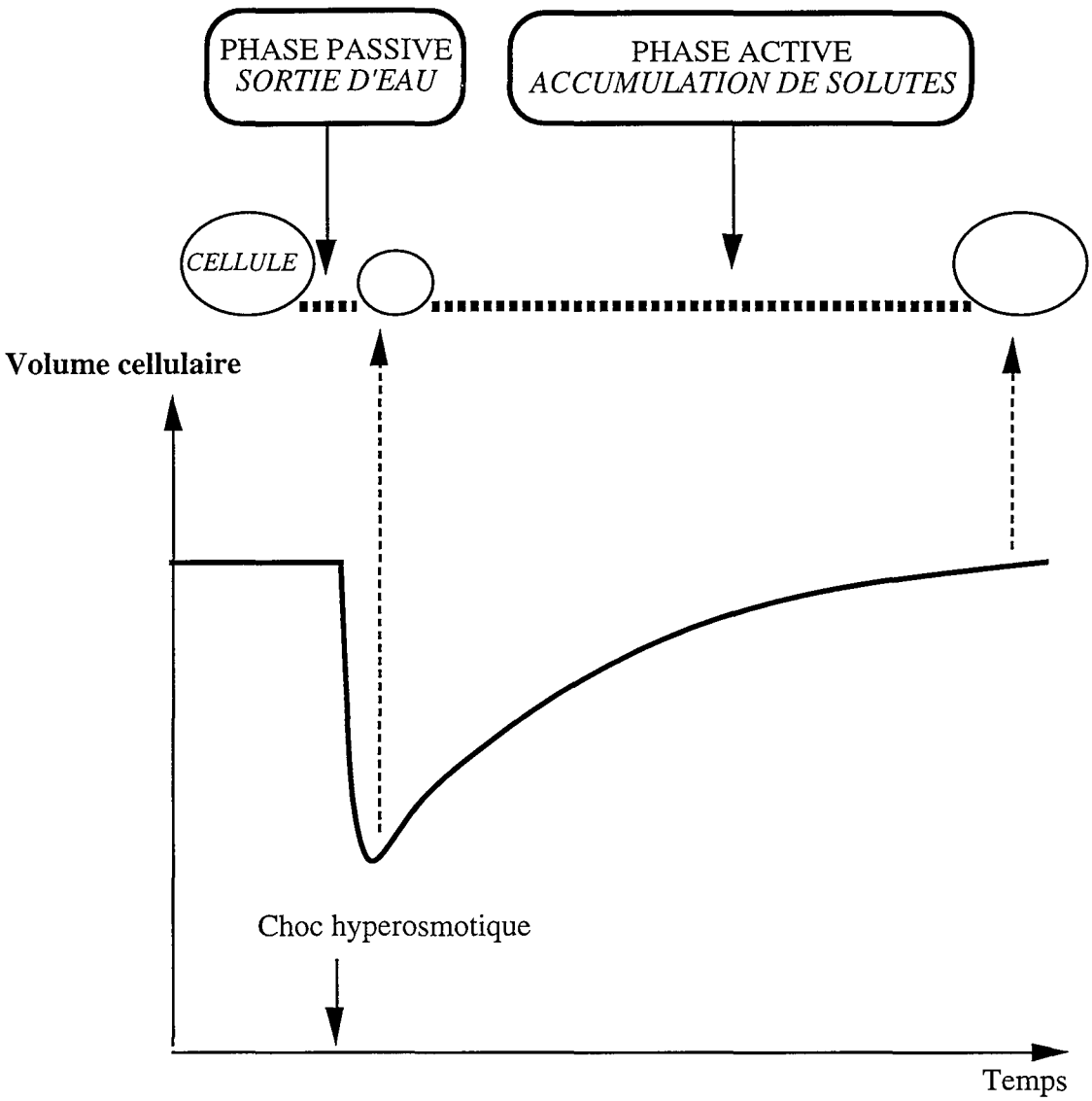


Figure n°I.2 : Réponse volumique d'une cellule à un choc hyperosmotique. *(D'après Berner, 1994)*

Avant de décrire ces différentes phases de l'osmorégulation, il est intéressant d'examiner les signaux qui peuvent déclencher cette réponse osmotique.

I.2.2. Examen des signaux déclenchant la réponse osmotique

La régulation d'une réponse biologique dépend le plus souvent de la reconnaissance d'une molécule-signal par un récepteur spécifique. L'osmorégulation diffère de ce modèle car l'information fournie par l'environnement n'est pas une molécule mais un paramètre physico-chimique. Le signal exact déclenchant la réponse osmotique n'est pas connu et différentes hypothèses ont été suggérées. Ainsi Csonka et Hanson (1991) ont proposé et discuté l'existence de récepteurs sensibles (*cf* Figure n°I.3) :

- ❑ à la pression hydrostatique intracellulaire : barorécepteur
- ❑ à la pression de la membrane plasmique contre le peptido-glycane : sonde à pression (de turgescence)
- ❑ à l'étirement latéral du peptido-glycane : récepteur de tension membranaire
- ❑ à l'accroissement de la surface de la membrane interne : récepteur de tension
- ❑ à l'activité de l'eau (a_W) : chemorécepteur
- ❑ à des concentrations internes ou externes en solutés : chemorécepteur

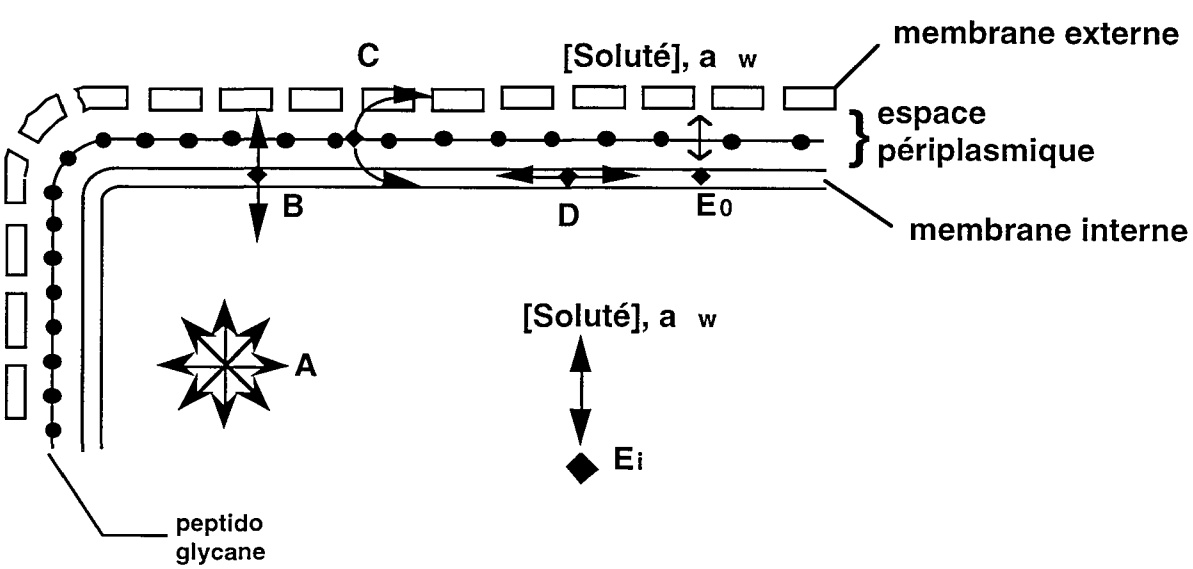


Figure n°I.3 : Récepteurs potentiels des changements physico-chimiques se produisant lors d'un choc osmotique. Récepteurs sensibles à la pression hydrostatique (**A**), à la pression contre le peptido-glycane (**B**), à l'étirement du peptido-glycane (**C**), aux variations de la surface membranaire (**D**), à des concentrations de solutés ou à l'activité de l'eau (**Eo** et **Ei**). (D'après Csonka et Hanson, 1991).

I.2.3. Pression de turgescence

La pression de turgescence est la différence de pression osmotique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. Toute cellule en croissance tend à maintenir une pression de turgescence positive. Cette pression de turgescence est généralement considérée comme la force motrice de la croissance (Reed, 1984a). Son étude est donc particulièrement intéressante pour une bonne compréhension de l'osmorégulation, puisqu'elle semble être le paramètre régulé (Brown, 1990). Néanmoins en raison des difficultés de mesure, peu de valeurs de pression de turgescence sont données dans la littérature.

I.2.3.1. Techniques de mesure de la pression de turgescence

Une mesure directe de la pression de turgescence est possible sur des cellules de grande taille telles que des algues géantes unicellulaires grâce une sonde de pression (Zimmermann, 1978). Mais ce type de sonde ne peut pas être utilisé sur des cellules ayant un diamètre inférieur à 20 µm.

Une autre technique de mesure de la pression de turgescence est applicable sur un nombre restreint de microorganismes qui ont la particularité de posséder des vacuoles de gaz dans leur cytoplasme (Walsby, 1986). Il existe environ 150 micro-organismes concernés dont 60 sont des cyanobactéries. La pression de turgescence est obtenue en calculant la différence de pression requise pour éclater 50% des vacuoles de gaz dans une suspension de cellules dans leur condition de culture et de cellules dont la turgescence a été annulée par ajout dans le milieu de grandes quantités de solutés non pénétrants.

La mesure du volume de cellules soumises à des chocs hyperosmotiques croissants, fournit aussi une estimation de la pression de turgescence des cellules *via* la relation de Boyle Van't Hoff (Nobel, 1968). Cette méthode a l'intérêt d'être utilisable sur toute bactérie. Les différentes techniques trouvées dans la littérature diffèrent par la méthode de mesure du volume cellulaire sélectionnée : détermination de la teneur en eau des cellules (Marquis et Carstensen, 1973 ; Cayley *et al.*, 1991), mesure de la turbidité (Whatmore et Reed, 1990a ; Patchett *et al.*, 1992), utilisation du Coulter counter (Whatmore et Reed, 1990a), mesure par analyse d'image (Cure, 1990).

Un même aliquote de cellules est placée dans des milieux d'osmolarité croissante et le volume des cellules est déterminé pour chaque échantillon. Les volumes cellulaires sont ensuite

reportés sur un graphe en fonction de l'inverse de l'osmolarité de l'échantillon correspondant (*cf* Figure n°I.4).

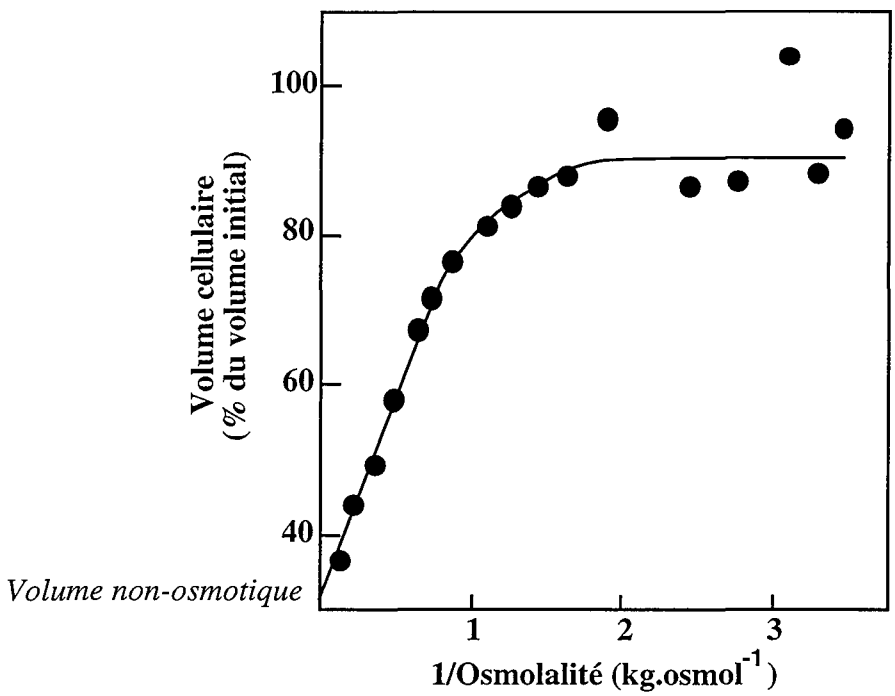


Figure n°I.4 : Variations du volume cellulaire de *Bacillus subtilis* soumis à des chocs hyperosmotiques croissants. *Volume cellulaire obtenu par mesure de la turbidité. (D'après Whatmore et Reed, 1990a).*

Dans la partie droite de la figure, le volume cellulaire n'évolue pas ou peu avec l'augmentation de la pression osmotique du milieu du fait de la présence d'une pression de turgescence positive. Puis à partir d'une certaine valeur de pression osmotique, il est observé une rupture de pente. Le volume cellulaire décroît alors linéairement avec l'augmentation de l'osmolarité du milieu. La cellule se comporte alors comme un osmomètre parfait, c'est-à-dire que la pression de turgescence est annulée. La pression osmotique pour laquelle est observée la rupture de pente fournit une estimation de la valeur de la pression osmotique intracellulaire. La pression de turgescence initiale de la cellule est alors obtenue par la relation suivante basée sur un bilan matière:

$$\Delta\Pi = \frac{\Pi_0 \times V_0}{V_i} - \Pi_i$$

Π_0 : pression osmotique du milieu pour laquelle $\Delta\Pi$ est annulée
V_0 : volume cellulaire correspondant à $\Delta\Pi = 0$
Π_i : pression osmotique initiale du milieu
V_i : volume cellulaire initial

De plus, cette technique permet de déterminer le volume non-osmotique de la cellule. Ce dernier correspond au volume occupé par les composés solides ou insolubles de la cellule. Il est donné par la valeur du volume à l'intersection de la droite à l'origine (*cf* Figure n°I.4).

I.2.3.2. Niveaux de pression de turgescence chez les microorganismes

Des valeurs de pression de turgescence trouvées dans la littérature ont été recensées et regroupées dans le tableau n°I.2.

Chez les bactéries, Csonka (1989) postule que les bactéries à Gram positif possède une pression de turgescence supérieure (0,6 à 0,8 osmol.kg^{-1}) à celle des bactéries à Gram négatif (0,03 à 0,2 osmol.kg^{-1}). La comparaison semble toutefois difficile à maintenir puisque la valeur de turgescence dépend aussi de la composition et de l'osmolalité du milieu de culture ainsi que de la phase de croissance du microorganisme (Whatmore et Reed, 1990a).

Cayley *et al.* (1991) ont poussé plus loin l'analyse de la réponse du volume à des chocs hyperosmotiques successifs chez *Escherichia coli*. Dans la partie linéaire du graphe (*cf* Figure n°I.4), la cellule ne possède plus de pression de turgescence, la relation entre le volume cellulaire et la pression osmotique extracellulaire peut s'écrire :

$$V_{cyto} = V_b + \frac{\Phi_{ii} \cdot (\sum n_j)_{cyto}}{\Pi_{ex}}$$

V_b : volume non-osmotique
Φ_{ij} :coefficient osmotique intracellulaire
$(\sum n_j)_{cyto}$: quantité totale des solutés intracellulaires
Π_{ex} : pression osmotique extracellulaire

A partir du graphe et de la détermination de $(\sum n_j)_{cyto}$, les auteurs ont calculé les valeurs du coefficient osmotique intracellulaire sur des cellules cultivées à des osmolarités de 0,1 et 0,28 osmol.kg^{-1} de l'ordre de 0,54 et de 0,71 respectivement, montrant ainsi le comportement non-idéal du cytoplasme.

Microorganisme	$\Delta\Pi$ (Osm)	VNO (%)	Principe (a) et technique (b)	Références
Microalgue unicellulaire				
❑ *Chlorella emersonii*				
sur milieu normal : 0,03 Osm	0,26 ± 0,06	34 - 52	**Hyp** ; *Eau*	Munns et al. (1983)
sur milieu à 0,66 Osm	0,03 ± 0,03	26 - 54		
Levures				
❑ *S. cerevisiae*	1,1 ± 0,3	59 - 75	**Hyp** ; *AI*	Cure (1991)
Bactéries				
❑ *Streptococcus faecalis*	1 ± 0,1	35 - 55	**Hyp** ; *Eau*	Marquis *et al.* (1973)
Micrococcus lysodeikticus	0,52	nd		
❑ *Escherichia coli*	0,055	30	**Hyp** ; *T*	Koch (1984)
❑ *Ancylobacter aquaticus*	0,07 ± 0,01	nd	**Vg**	Koch et Pinette (1987)
❑ *Bacillus subtilis*				
en croissance	0,67 ± 0,14	25 - 35	**Hyp** ; *Cc*	Whatmore et Reed (1990)
en phase stationnaire	0,53 ± 0,02	45 - 55	**Hyp** ; *Cc*	
en croissance	0,65	29	**Hyp** ; *T*	
❑ *Listeria monocytogenes*				
sur milieu normal	0,55 ± 0,14	34	**Hyp** ; *T*	Patchett *et al.* (1992)
sur milieu + 5% NaCl	0,83 ± 0,2			
sur milieu + 7,5% NaCl	0,73 ± 0,2			

Tableau n°I.2 : Valeurs de pression de turgescence ($\Delta\Pi$) et de volume non-osmotique (VNO) chez quelques microorganismes

(a) : Principes de la méthode de mesure du $\Delta\Pi$: **Hyp** : chocs hyperosmotiques croissants
Vg : éclatement des vacuoles de gaz

(b) : Techniques de mesure du volume cellulaire : *T* : mesure de la turbidité
Cc : mesure par Coulter counter
Eau : mesure de la teneur en eau des cellules
AI : mesure par analyse d'image

I.2.4. Phase passive de l'osmorégulation : étude de la variation du volume cellulaire

La première réponse à un choc hyperosmotique est une diminution du volume de la cellule. Cette variation de volume est simplement due à un flux d'eau dans le cas de cellules à paroi souple, ce qui est le cas pour la plupart des bactéries et des levures. Si le choc osmotique est de trop grande amplitude, une **plasmolyse** des cellules peut être observée, c'est-à-dire séparation de la membrane plasmique de la paroi cellulaire.

La difficulté d'étude de la réponse volumique à un choc osmotique est liée là encore à la taille des cellules et donc à l'utilisation de techniques de suivi du volume cellulaire au cours du temps. Les techniques trouvées dans la littérature pour ce type d'étude sont la détermination de la teneur en eau des cellules (Miguelez et Gilmour, 1994), la mesure de la turbidité de la suspension cellulaire (Matts et Knowles, 1971 ; Roth *et al.*, 1985), le Coulter counter (Whatmore et Reed, 1990b) et l'analyse d'image (Berner et Gervais, 1994).

Pour l'analyse de la réponse volumique suite à un choc osmotique, deux paramètres sont importants :

- ❑ la vitesse initiale de variation du volume cellulaire qui correspond à la vitesse initiale de sortie d'eau de la cellule
- ❑ la valeur finale du volume cellulaire atteint qui traduit la quantité totale d'eau perdue par la cellule

L'obtention de ces paramètres est obtenue par la cinétique d'évolution du volume cellulaire suite à un choc hyperosmotique. La réponse volumique peut être extrêmement rapide, de l'ordre de quelques secondes et nécessite en fonction du système étudié la technique appropriée (Brown, 1990).

Berner et Gervais (1994) ont développé une chambre de visualisation couplée à un système vidéo leur permettant une mesure du volume cellulaire par analyse d'image (*cf* Figure n°I.5). Cette technique n'est applicable que pour des cellules de taille moyenne (levures) et de forme sphérique. L'étude de la réponse volumique à un choc osmotique chez *Saccharomyces cerevisiae* a mis en évidence l'extrême rapidité des flux d'eau (10 secondes). Leur étude a également montré que les variations du volume cellulaire ne sont pas seulement liées à l'amplitude du choc osmotique mais également à la nature du dépresseur utilisé et au niveau de la pression osmotique initial. Ainsi l'utilisation de glycérol comme osmolyte dépresseur entraîne une plus faible variation du volume de la levure qu'avec du sorbitol à intensité de choc équivalente (*cf* Figure n°I.6).

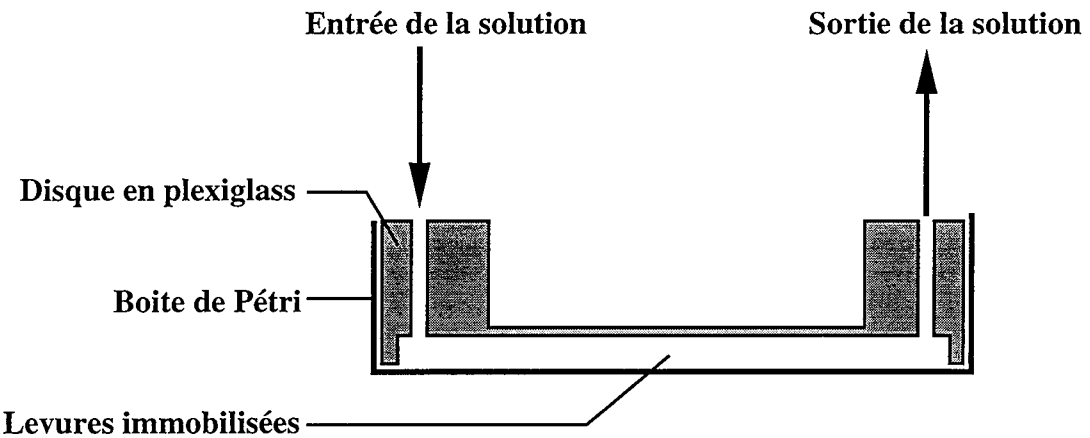


Figure n°I.5 : Vue schématique de la chambre de visualisation. (D'après Berner et Gervais, 1994)

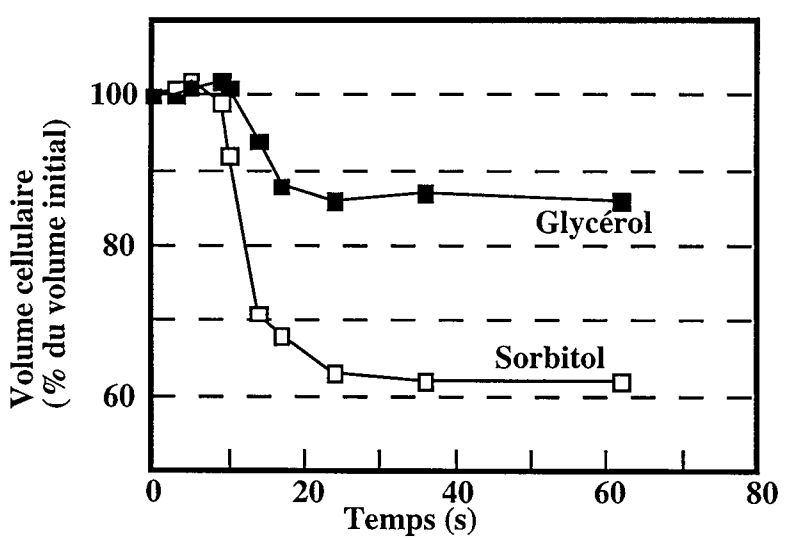


Figure n°I.6 : Evolution du volume cellulaire en réponse à un choc osmotique généré par du glycérol et du sorbitol. *Amplitude du choc : 1,6 osmol.kg^{-1}. (D'après Bernet et Gervais, 1994).*

Le glycérol est un composé qui pénètre rapidement dans la cellule et compense donc en partie la différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane plasmique. Le flux d'eau nécessaire à l'équilibre des pressions osmotiques intra- et extracellulaires est alors moins important qu'avec un soluté non-pénétrant tel que le sorbitol.

Matts et Knowles (1971) ont suivi la réponse volumique à un choc hyperosmotique chez *E. coli* K12 par mesure de la turbidité de la suspension cellulaire. Ils ont observé deux phases : une première augmentation de la turbidité après l'ajout de l'osmolyte dépresseur traduisant une diminution du volume cytoplasmique et total de la cellule (Alemohammad et Knowles, 1974), puis cette valeur de turbidité peut être maintenue ou retourner à sa valeur initiale. Le retour au volume initial est, dans ce cas, dépendant de la présence du potassium dans le milieu. D'autre part ils ont montré que la vitesse initiale de diminution du volume cellulaire est proportionnelle à la pression osmotique du milieu exocellulaire et non pas à sa force ionique.

Cayley et *al.* (1991) ont observé chez *Escherichia coli* K12 une diminution du volume d'eau de la cellule et du volume d'eau cytoplasmique en fonction de l'osmolarité du milieu de culture (Figure n°I.7). Ils ont trouvé une relation entre le volume d'eau cytoplasmique et le taux de croissance de la bactérie (Figure n°I.7). Les auteurs suggèrent que le volume d'eau cytoplasmique (et plus précisément l'eau libre) est le déterminant de la croissance d'*Escherichia coli*. D'après les auteurs, cette relation n'est pas universelle mais est spécifique aux cellules d'*Escherichia coli* cultivées dans des conditions de stress osmotique. Cette concentration du milieu intracellulaire entraîne des modifications des propriétés thermodynamiques du cytoplasme. Cayley et *al.* (1991) ont ainsi discuté l'influence de la diminution du volume d'eau libre sur les coefficients d'activité du potassium et des macromolécules et sur la répercussion attendue sur les interactions DNA-protéines. Ces modifications thermodynamiques peuvent expliquer la dépendance de la vitesse de croissance de la bactérie à la quantité d'eau cytoplasmique.

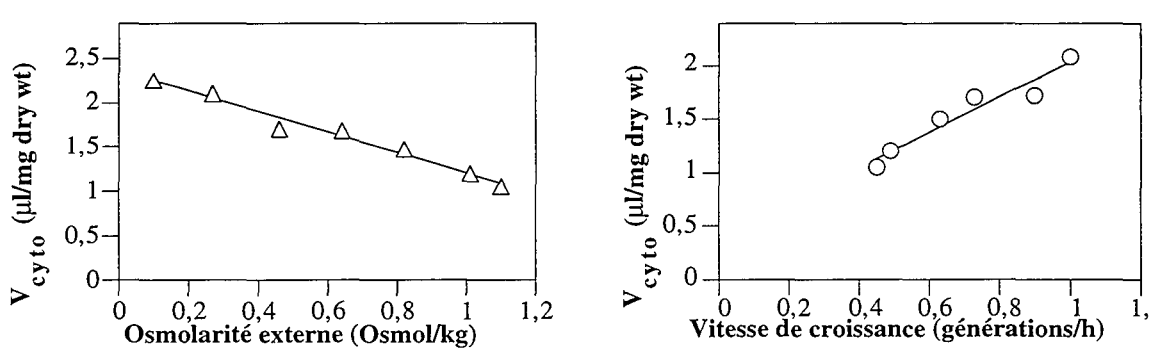


Figure n°I.7 : Evolution du volume d'eau cytoplasmique d'*E. coli* avec l'osmolarité du milieu de culture et le taux de croissance. *(D'après Cayley et al., 1991)*

A la fin de cette phase passive, la cellule se trouve dans une situation difficile. Cette chute du volume cellulaire entraîne une perte importante d'eau cellulaire et une concentration du milieu intracellulaire. La concentration de certains métabolites peut, en outre, entraîner des effets inhibiteurs sur certaines activités enzymatiques (Yancey, 1982). L'état physiologique de la cellule à cet instant est donc primordial pour sa capacité à survivre au stress osmotique. Si la cellule a réussi à maintenir une activité métabolique à la fin de cette phase passive, elle va retrouver son volume initial en accumulant un certain nombre de solutés (par synthèse ou par transport). Cette accumulation intracellulaire va créer un gradient de pression osmotique vers l'intérieur de la cellule et donc entraîner une entrée d'eau.

Le retour au volume initial dépend donc de l'amplitude du choc hyperosmotique (Berner, 1994). Le temps nécessaire au retour au volume initial est lié au microorganisme et à sa capacité de survie. Ainsi *Bacillus subtilis* retrouve son volume initial 6 heures après un choc hyperosmotique d'une amplitude de 0,8 osmol.kg^{-1} (Whatmore et Reed, 1990b). Pour comparaison, le retour au volume initial nécessite 3 heures chez la bactérie xérotolérante *Halomonas elongata* après un choc hyperosmotique d'une amplitude de 2 osmol.kg^{-1} (Miguelez et Gilmour, 1994).

I.2.5. Phase active de l'osmorégulation

I.2.5.1. Rôle osmotique des ions

a. Potassium

Le potassium est le cation le plus abondant dans le cytoplasme des bactéries. Il est l'un des osmolytes majeurs intervenant dans le maintien de la pression de turgescence cellulaire. Néanmoins le terme de soluté compatible est réservé aux composés pouvant être accumulés en grande quantité dans la cellule sans perturber le métabolisme cellulaire. Or, à de fortes concentrations intracellulaires, le potassium peut entraîner des inhibitions importantes de certaines activités enzymatiques.

Dès 1965, Epstein et Schultz ont montré que pour des cellules d'*Escherichia coli* en croissance, la teneur intracellulaire en ions potassium était déterminée par l'osmolarité du milieu externe et que, de plus, les cellules répondaient à un choc hyperosmotique (par ajout de NaCl, glucose ou saccharose) par un influx de potassium (*cf* Figure n°I.8).

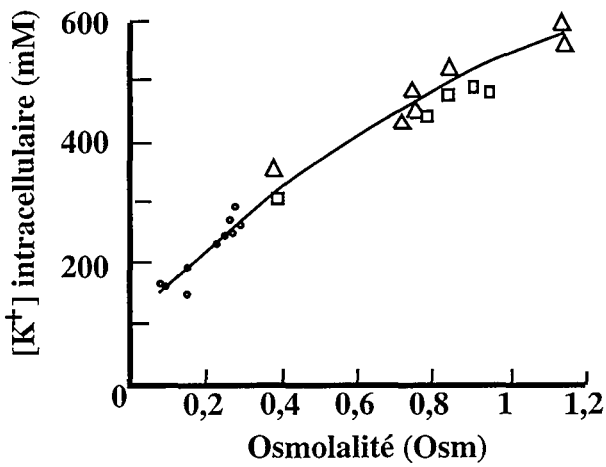


Figure n°I.8 : Effet de l'osmolarité du milieu de culture sur la concentration intracellulaire en potassium d'*E. coli* en croissance. *(D'après Epstein et Schultz, 1965)*

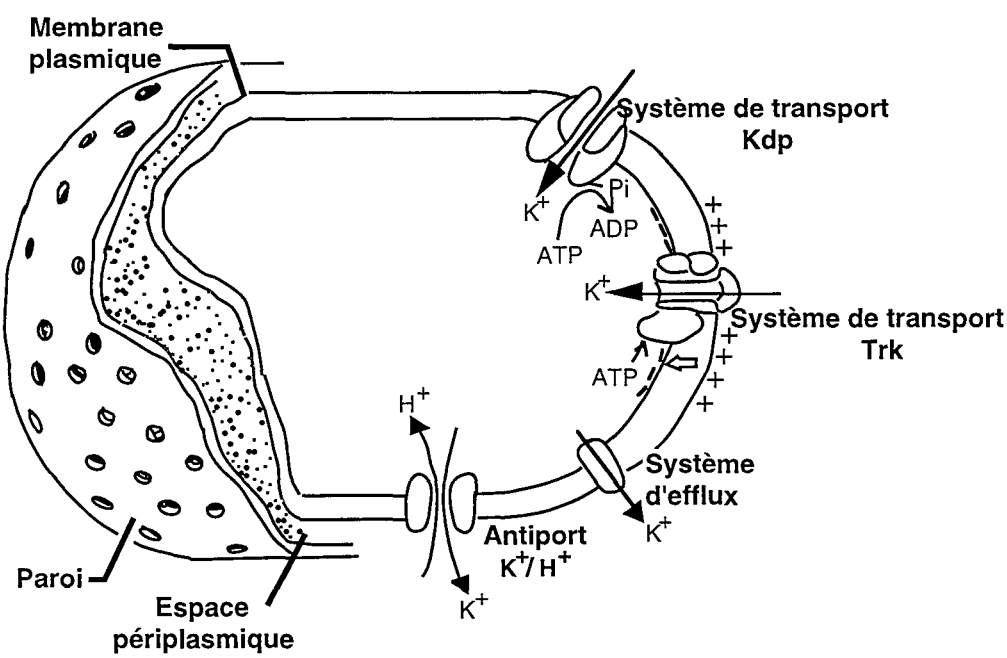


Figure n°I.9 : Localisation possible des systèmes de transport du potassium *(D'après troller, 1987).*

A l'inverse, Dinnbier *et al.* (1988) ont montré que lors d'un choc hyperosmotique, l'accumulation de potassium est seulement transitoire et qu'après 30 minutes la concentration intracellulaire de potassium est proche de celle mesurée avant le choc. Ils suggèrent que le mouvement des ions potassium est le seul mécanisme primaire de la régulation osmotique c'est-à-dire le seul mécanisme sur lequel la pression osmotique ait une influence directe. Les autres mécanismes identifiés (synthèse de glutamate et de tréhalose) seraient régulés par les variations de la concentration interne en ions potassium. Ce rôle de signal secondaire de l'osmorégulation pour le potassium a été cité par différents auteurs (Higgins *et al.*, 1987; Booth et Higgins, 1990).

Lorsque l'augmentation de la pression osmotique est obtenue par l'ajout de molécules diffusantes non consommées telles que le glycérol, *E. coli* n'accumule pas de potassium. De ce fait, la turgescence ou la variation du volume cellulaire semblent responsables de l'accumulation du potassium et non pas l'augmentation de l'osmolarité en soi (Welsh *et al.*, 1991).

A l'aide d'isotope radioactif du potassium, il a été montré que chez *Escherichia coli* la concentration interne de cet ion est le résultat de rapides échanges entre le potassium intra- et extracellulaire (Meury *et al.*, 1985). En fortes osmolarités ce sont les vitesses d'influx qui sont modifiées, la vitesse d'efflux du potassium est inchangée. A l'inverse, c'est la vitesse d'efflux qui varie en réponse à un choc hypoosmotique.
Lors d'un choc hyperosmotique, la vitesse d'influx du potassium vers l'intérieur de la cellule est inversement proportionnelle à la concentration intracellulaire en potassium mais indépendante de l'osmolarité externe. Par contre, lors d'un choc hypoosmotique, l'efflux de potassium est proportionnellement lié à l'osmolarité du milieu mais est indépendant de la concentration interne en potassium.

Chez *Escherichia coli* cultivée sur milieu synthétique, quatre systèmes d'influx et au moins trois systèmes d'efflux du potassium ont été identifiés (Rhoads et Epstein, 1977 ; Bakker *et al.*, 1987) (*cf* Figure n°I.9).

Les quatre systèmes d'entrée du potassium dans la cellule diffèrent principalement par leur affinité pour le cation. Ainsi les systèmes TrkA et TrkF possèdent une faible affinité alors que KUp et Kdp ont une forte affinité. Ces systèmes nécessitent tous de l'ATP . Les systèmes Trk utilisent de plus un gradient de protons pour le transport du potassium.

Dans des conditions normales de turgescence, les systèmes KUp et TrkA sont exprimés de façon constitutive, mais l'activité de TrkA est également stimulée lors d'une croissance sous forte pression osmotique externe (Epstein, 1986).

Le système Kdp, commun à de nombreuses bactéries à Gram négatif, possède une haute affinité pour le potassium. Son activité est stimulée lors de chocs hyperosmotiques (Epstein, 1986). Ce système prend le relais quand les autres ne fonctionnent plus comme lors de mutations, de faibles concentrations externes en potassium (< 0,1 mM) ou de chocs hyperosmotiques élevés

Le rôle du potassium dans la restauration de la pression de turgescence après un choc hyperosmotique a été étudié par Whatmore et Reed (1990) chez *Bacillus subtilis*, bactérie à Gram positif. Ces auteurs observent notamment une synthèse de proline dépendante de l'accumulation d'ions potassium. Ils suggèrent que le potassium sert de signal secondaire de l'osmorégulation chez *Bacillus subtilis* en déclenchant la synthèse de solutés compatibles tels que la proline.

b. Sodium

Si chez la plupart des espèces microbiennes le potassium est accumulé après un choc hyperosmotique, il existe néanmoins certains microorganismes qui accumulent du sodium : des cyanobactéries (Reed *et al.*, 1984b), des eubactéries (Oren, 1986) et des levures (Larsson *et al.*, 1990).

Unemoto et Hayashi (1979) ont observé chez la bactérie à Gram négatif *Vibrio alginolyticus* une accumulation de sodium quand la concentration en NaCl est augmentée dans le milieu de culture. La bactérie n'accumule dans ces conditions pas ou peu de potassium. La concentration intracellulaire en sodium reste néanmoins toujours inférieure à celle du milieu externe.

Brevibacterium sp. accumule aussi des ions sodium lorsque le choc hyperosmotique est réalisé avec un sel de sodium (Nagata *et al.*, 1991). Le pool intracellulaire de potassium reste alors constant. L'inverse est observé lorsque le choc hyperosmotique est effectué avec un sel de potassium.

L'effet toxique d'une accumulation importante de sodium dans la cellule a été montrée par Rengpipat *et al.* (1988). L'effet de la concentration en sodium et potassium a été étudiée sur l'activité spécifique *in vitro* d'enzymes clés du métabolisme de bactéries halophiles (*Halobacteroides acetoethylicus*) et non halophiles (*Clostridium*, *Butyribacterium*, *Sarcina*). *H. acetoethylicus* accumule du sodium après un choc osmotique au NaCl et conserve un pool intracellulaire élevé en sodium. Ainsi l'activité spécifique *in vitro* d'une enzyme clé de la glycolyse (glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase) a son optimum pour une concentration en NaCl de 2 M chez *H. acetoethylicus* et pour une concentration proche de zéro pour *Butyribacterium methylotrophicum* (*cf* Figure n°I.10). *H. acetoethylicus*, bactérie halophile, possède donc des enzymes physiologiquement adaptées aux environnements salins. Par contre, les bactéries non halophiles citées ci-dessus auraient besoin de maintenir des concentrations intracellulaires en potassium ou sodium faibles, par transport actif, pour conserver une activité métabolique.

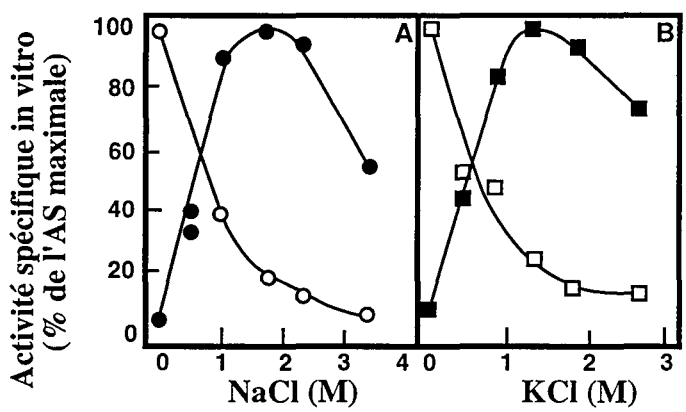


Figure n°I.10 : Comparaison des effets de différentes concentrations en NaCl (A) et KCl (B) sur l'activité spécifique *in vitro* de la glycéraldéhyde-3-P deshydrogénase de *Halobacteroides acetoethylicus* (noir) et *Butyribacterium methylotrophicum* (blanc). *(D'après Rengpipat et al., 1988).*

Nishi et Yagi (1995) ont étudié les mécanismes d'exclusion du sodium suite à un choc hyperosmotique chez la levure *Zysaccharomyces rouxii*. Après un ajout de NaCl dans le milieu externe, ils ont observé un influx rapide et transitoire d'ions sodium et chlorure. L'influx de sodium est accompagné d'une diminution du pH externe puis l'efflux du cation entraîne une remontée du pH mettant ainsi en évidence la participation des protons. Par l'utilisation d'inhibiteurs, les auteurs ont montré que l'influx de sodium est couplé à un efflux de protons par les ATPases membranaires et que l'exclusion du sodium est réalisé par les antiports Na^+/H^+.

c. Contre-ion

Afin de maintenir le potentiel électrique cellulaire, l'accumulation de potassium ou de sodium doit être équilibrée par la sortie d'autres cations ou l'accumulation d'anions.

Etant l'anion le plus abondant chez de nombreuses bactéries, le glutamate pourrait jouer ce rôle. Mais en conditions de forte pression osmotique, l'acide aminé est accumulé chez *Escherichia coli* en quantité deux fois moins importante que le potassium (Dinnbier *et al.*, 1988).

Killham et Firestone(1984) ont montré que la concentration en ion chlorure augmente en même temps que le potassium chez *Streptomyces sp.*, transféré dans un milieu de forte osmolarité. Ils proposent les ions chlorures comme le principal contre-ion du potassium. Il est également possible qu'un efflux d'ion sodium puisse équilibrer l'influx de potassium, comme chez certaines cyanobactéries (Reed *et al.*, 1984b).

Tempest *et al.* (1970) ont décrit une augmentation du pH intracellulaire chez *Escherichia coli* en réponse à un choc hyperosmotique. Richey *et al.* (1987) ont calculé que cette augmentation de pH pouvait représenter la sortie d'un nombre suffisant de protons pour compenser l'excès de charge dû au potassium. Toutefois, pour Dinnbier *et al.* (1988) l'augmentation du pH est transitoire et correspond seulement à la brève accumulation du potassium.

Nishi et Yagi (1995) ont mis en évidence chez *Zygosaccharomyces rouxii* un échange entre sodium et proton après un choc hyperosmotique faisant intervenir les ATPases membranaires et l'antiport Na^+/H^+.

Munro *et al.* (1972) ont observé chez *Escherichia coli* une rapide excrétion d'un cation divalent, la putrescine (ou 1,4 - diaminobutane), en réponse à un choc hyperosmotique qui permettrait de retrouver l'équilibre électrique cellulaire (à raison d'une molécule de putrescine échangée contre deux molécules de potassium). Toutefois, il a été montré que de faibles contenus cellulaires en putrescine ne perturbent pas l'influx de potassium lors d'un choc hyperosmotique.

I.2.5.2. Rôle osmotique des solutés compatibles

Les solutés compatibles sont des composés neutres, de faible poids moléculaire pouvant s'accumuler à de fortes concentrations intracellulaires sans causer d'inhibition de l'activité enzymatique cellulaire. Certains peuvent compenser les effets déstabilisants d'autres agents.

Tableau n°3 : Liste des solutés compatibles et osmoprotecteurs bactériens

Composés	Espèce bactérienne	Mode (a) d'accumulation	Références (b)
❑ **Acides aminés**			
Glutamate			
	E. coli	S	(1)
	Salmonella typhimurium et orianienburg	?, S	(1), (2)
	Klebsiella aerogenes	?	(2)
	Serratia marscescens	S, T	(4)
	Vibrio parahaemolyticus et harveyi	?, S	(2), (5)
	Pseudomonas aeruginosa	?	(2)
	Clostridium sporogenes	?	(2)
	Rhizobium meliloti	S, T	(1)
	Rhizobium sp.	S	(12)
Glutamine			
	E. coli	S, T	(1)
	Corynebacterium glutamicum	S	(23)
	Corynebacterium ammoniagenes	?	(18)
	Staphylococcus aureus	S	(6)
	Streptomyces griseus et californicus	S	(7)
Proline			
	E. coli	T	(1)
	Klebsiella aerogenes	?	(2)
	Salmonella typhimurium et orianienburg	T, ?	(1), (2)
	Serratia marscescens	T	(4)
	Sarcina lutea	?	(2)
	Bacillus subtilis	S	(3)
	Bacillus megaterium et cereus	?	(2)
	Brevibacterium lactofermentum	S	(1)
	Corynebacterium glutamicum	S	(23)
	Lactobacillus acidophilus et plantarum	T, ?	(8), (2)
	Lactococcus lactis	T	(20)
	Micrococcus lysodeikticus	?	(2)
	Staphylococcus aureus	T	(6)
	Streptococcus faecalis	?	(2)
	Streptomyces griseus, californicus et clavuligerus	S, T T	(7) (1)
❑ **Disaccharides**			
Tréhalose			
	E. coli	S	(1)
	Ectothiorhodospira halochloris	S	(1)
	Mixococcus xanthus	S	(1)
	Corynebacterium glutamicum	S	(23)
	Rhizobium sp. et meliloti	S	(17)
	Sulfolobus solfataricus	?	(1)
Mannosucrose	*Agrobacterium tumefaciens*	S	(1)
❑ **Acides aminés méthylés**			
Proline bétaïne			
	E. coli	T	(11)
	Rhizobium meliloti	T	(1)
Taurine bétaïne			
	Klebsiella aerogenes	T	(1)
Acide butyrique			
	Klebsiella pneumoniae	T	(1)
γ-amino bétaïne			
	E. coli	T	(11)
	Clostridium sporogenes	T	(2)
	Streptococcus faecalis	T	(2)
ß-alanine bétaïne			
	E. coli	T	(1)
	Salmonella typhimurium	T	(1)

Tableau n°3 (suite)

Composés	Espèce bactérienne	Mode (a) d'accumulation	Références (b)
❑ **Acides aminés méthylés**			
Glycine bétaïne			
	E. coli	S^C, T	(1)
	Klebsiella pneumoniae	T	(9)
	Salmonella typhimurium	T	(1)
	Vibrio costicola Ba1	T	(1)
	Ectothiorhodospira halochloris	T	(1)
	Bacillus subtilis	T	(3)
	Bradorhizobium japonicum	T	(1)
	Brevibacterium ammoniagenes	?	(19)
	Brevibacterium lactofermentum et linens	T	(13), (16)
	Lactobacillus acidophilus	T	(10)
	Lactococcus lactis	T	(20)
	Listeria monocytogenes	?	(21)
	Rhizobium meliloti	S^C, T	(1)
	Staphylococcus aureus	T	(15)
	Methanogenium anulus, cariaci	?	(1)
	Methanococcus igneus, jannaschii	?	(1)
	et thermolithotrophicus	?	(1)
	Rhodobacter sphaeroides	S^C, T	(1)
Carnithine			
	E. coli	T	(1)
Acide crotonique			
	E. coli	T	(1)
❑ **Peptides**			
γ-Glutamylglutamine	*E. coli*	S	(1)
Glutathion	*E. coli*	S	(1)
N-Acétylglutamyl glutamine	*Rhizobium meliloti*	S	(14)
❑ **Autres**			
Ectoïne			
	Ectothiorhodospira halochloris	S	(1)
	Vibrio costicola Ba1	S	(1)
	Deleye halophila	S	(1)
	Halomonas elongata et halinophila	S	(1)
	Bacillus sp., pasteurii	?	(24)
	Brevibacterium linens	S	(16)
	Brevibacterium casei, epidermidis	?	(24)
	Rhizobium	?	(22)
Acide pipécolique	*Brevibacterium ammoniagenes*	S	(19)
N-Acétyl-ß-lysine	*Methanosarcina thermophila*	S	(1)
3-Dimethylsulfonio-propionate	*Klebsiella pneumoniae*	T	(1)
3-(Phorpholino)propane sulfonate	*E. coli*	T	(1)
Choline-O-sulfate	*E. coli*	T	(1)
	Klebsiella pneumoniae	T	(1)
	Salmonela typhimurium	T	(1)

(a) : Mode d'accumulation : T : par transport ; S : par synthèse ; S^c : par synthèse en présence de choline ; ? : mode inconnu

(b) : Références : (1) Csonka et Hanson, 1991 ; (2) Measure, 1975 ; (3) Whatmore et al., 1990 ; (4) Suguria et Kisumi, 1985 ; (5) Makemson et Hastings, 1979 ; (6) Anderson et Witter, 1982 ; (7) Killham et Firestone, 1984 ; (8) Jewell et Kashket (1991) ; (9) Le Rudulier et Bouillard, 1983 ; (10) Hutkins et al., 1987 ; (11) Larsen et al., 1987 ; (12) Hua et al., 1982 ; (13) Kawahara et al., 1990 ; (14) Smith et Smith, 1989 ; (15) Bae et al., 1993 ; (16) Bernard et al., 1993 ; (17) Breedveld et al., 1993 ; (18) Frings et al., 1993 ; (19) Gouesbet et al., 1992) ; (20) Molenaar et al., 1993; (21) Patchett et al., 1992 ; (22) Talibart et al., 1994 ; (23) Wojcik, 1992 ; (24) Galinski et Trüper, 1994.

Les bactéries peuvent accumuler plusieurs solutés compatibles différents selon l'espèce considérée et les conditions de culture mais semblent préférer certains plus que d'autres (*cf* Tableau n°I.3).

Ainsi ces solutés pourraient diminuer l'énergie libre d'hydratation des molécules du substrat. La vitesse de la réaction enzymatique, qui est peut-être liée à la capacité de l'enzyme à déshydrater le substrat, pourrait s'en trouver améliorée. De même, les solutés compatibles pourraient également agir directement sur les enzymes et stabiliser la structure ternaire et quaternaire des protéines en diminuant l'hydratation des chaînes latérales (Yancey *et al.*, 1982).

a. Acides aminés

Il a été montré que le pool d'acides aminés libres varie en quantité et en composition, en fonction de la pression osmotique du milieu extérieur. Les liens physiologiques entre les variations de la concentration en acides aminés et celles de la pression osmotique ne sont pas élucidés. Il est probable que les mécanismes diffèrent sensiblement d'un acide aminé à l'autre.

α Acide glutamique

Chez les bactéries, il existe trois voies possibles de biosynthèse du glutamate à partir de l'α-cétoglutarate (*cf* Figure n°I.11). L'amination réductrice de l'α-cétoglutarate en glutamate (par la glutamate deshydrogénase) est souvent admise comme seule voie de synthèse du glutamate chez un certain nombre de bactéries. Cependant en présence d'une faible teneur en ions ammonium, certains auteurs admettent la possibilité d'intervention de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase chez certaines souches telles que *Klebsiella aerogenes* et *Salmonella typhimurium* (Rosenfeld et Brenchley, 1983).

De nombreux microorganismes possèdent à la fois l'activité glutamate deshydrogénase (gdh) et glutamate synthase (gogat) et des transaminases. C'est le cas notamment chez *Escherichia coli* (Ankri, 1991), *Salmonella typhimurium* (Botsford *et al.*, 1994), *Brevibacterium flavum* (Sung *et al.*, 1984), *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992) ou *Corynebacterium glutamicum* (Delaunay, 1995). Mais la part de chacune dans la synthèse de l'acide glutamique n'a pas été élucidée.

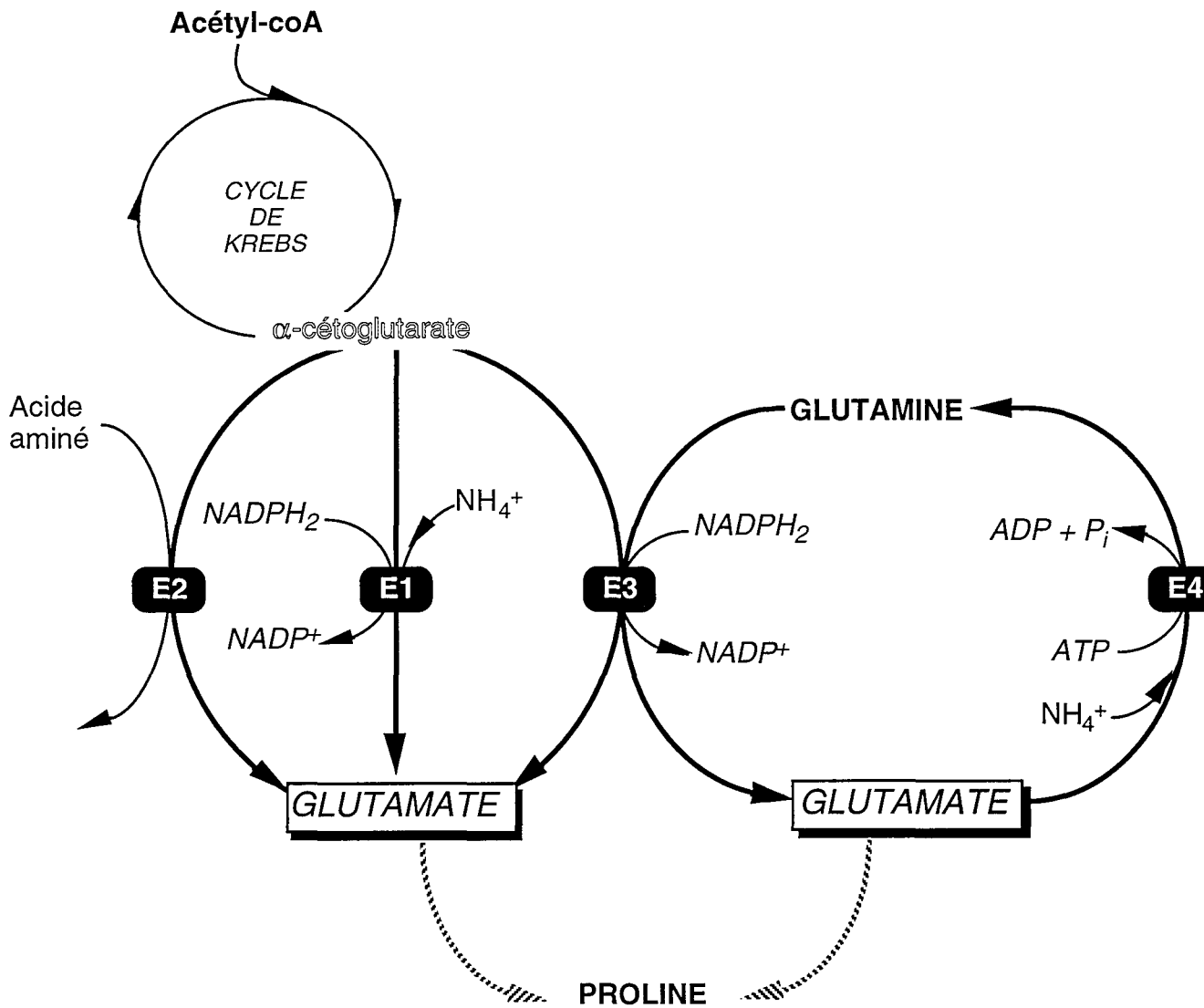


Figure n°I.11 : Voies possibles de biosynthèse de l'acide glutamique er des ses dérivés.
E1 : Glutamate deshydrogénase
E2 : Transaminases
E3 : Glutamate synthase ou Glutamine amide 2 oxoglutarate amino transférase (gogat)
E4 : Glutamine synthétase

Chez les bactéries à Gram négatif dans des conditions de forte osmolarité, le niveau basal en glutamate intracellulaire augmente de 10 fois jusqu'à représenter 90 % des acides aminés libres (Csonka, 1988). D'après Richey *et al.* (1987), la teneur interne en glutamate est proportionnelle à la pression osmotique externe chez *Escherichia coli* en phase exponentielle de croissance. Par contre, Dinnbier *et al.* (1988) ont montré que l'accumulation du glutamate en réponse à un choc hyperosmotique n'est que transitoire. Pour Welsh *et al.* (1991) cette accumulation transitoire n'est observée qu'en conditions de limitation en azote, alors qu'en culture continue sous limitation carbonée, la teneur en glutamate interne reste élevée.

L'ajout de glutamate dans le milieu ne permet pas, chez *E. coli*, de lever l'inhibition de croissance due à une élévation de l'osmolarité externe (Larsen *et al.*, 1987), alors que chez *Serratia marscescens* l'effet du glutamate est réelle (Sugiura *et al.*, 1985).

Les mécanismes régulant l'accumulation de glutamate en fonction de l'osmolarité ont été peu étudiés. Chez *Vibrio harveyi*, lors d'un choc hyperosmotique, l'activité glutamate synthase diminue alors que l'activité glutamate deshydrogénase augmente (Gurevich et *al.*, 1986). Chez *Salmonella typhimurium*, l'emploi de souches déficientes pour la glutamate deshydrogénase et la glutamate synthase ainsi que l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes n'a pas permis de déterminer le voie responsable de l'accumulation du glutamate en réponse à un choc osmotique (Botsford *et al.*, 1994).

Chez les bactéries à Gram positif, le niveau cellulaire en glutamate est généralement 8 à 10 fois plus élevé que chez les Gram négatif (Measures, 1975). Une accumulation de glutamate dans la cellule est également observée dans des conditions de fortes osmolarités mais elle apparaît moins importante et moins rapide que pour les bactéries à Gram négatif (Tempest *et al.*, 1970). Toutefois aucune accumulation de glutamate n'a été mise en évidence lors d'un choc hyperosmotique chez *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989), *Bacillus subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990b) et *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

Chez *Rhizobium meliloti*, cultivé en forte osmolarité, aucune modification du niveau d'activité glutamate deshydrogénase n'est observée (Hua *et al.*, 1982). De plus l'accumulation de glutamate n'est pas perturbée chez des souches mutantes pour la glutamate deshydrogénase ou pour la glutamate synthase (Botsford et Lewis, 1990). Par contre elle est complètement bloquée

par l'ajout d'acide amino-oxyacétique, inhibiteur des transaminases (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 1994). Ainsi la transamination de l'α-cétoglutarate serait à l'origine du glutamate accumulé.

Le rôle de l'osmolarité sur la synthèse du glutamate est difficile à préciser. Ainsi différents facteurs ont été proposés comme signal de régulation de l'accumulation du glutamate. Une hypothèse a souvent été avancée : le glutamate étant chargé négativement, il pourrait servir à neutraliser les ions potassium accumulés dans la cellule. Le lien entre la pression de turgescence et l'accumulation du glutamate pourrait donc se faire par l'intermédiaire des ions potassium (Dinnbier *et al.*,1988).

Ainsi d'après Tempest *et al.* (1970), l'accroissement du pH intracellulaire observé lors d'un choc hyperosmotique chez *E. coli* (lié à l'accumulation des ions potassium) activerait la glutamate deshydrogénase. Mais pour Dinnbier *et al.* (1988) cette variation du pH n'est que transitoire et ne suffit donc pas à expliquer l'activation de la synthèse du glutamate.

D'autre part Measures *et al.* (1975) ont mis en évidence une augmentation de l'activité *in vitro* de la glutamate deshydrogénase en présence de fortes concentrations en potassium chez *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Ils proposent alors le potassium intracellulaire comme signal de régulation de la synthèse du glutamate chez ces bactéries. Par contre les activités de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase ne sont pas affectées dans ces conditions.

Chez *Brevibacterium flavum*, Shiio et Ozaki (1970) ont observé une activation de la glutamate deshydrogénase par le potassium, mais le glutamate ne semble pas être accumulé en réponse à un choc hyperosmotique chez cette bactérie.

Par contre chez *Corynebacterium glutamicum*, l'activité *in vitro* de la glutamate deshydrogénase est diminuée par des concentrations croissantes en potassium et sodium. Dans ce cas, une activation de l'enzyme par l'influx de cations suite à un choc hyperosmotique est peu probable (Delaunay, 1995).

β Glutamine

L'accumulation de glutamine a été également observée en condition de forte osmolarité externe chez *Escherichia coli* par synthèse *de novo* (MacLaggan *et al.*, 1990) et par transport (Gehring *et al.*, 1990). Mais sa teneur intracellulaire est beaucoup plus faible que celle du

glutamate. Comme l'acide glutamique est le précurseur de la biosynthèse de la glutamine, il est possible que son augmentation résulte de celle du glutamate (Csonka, 1989) (*cf* Figure 11).

Il a été également observé une synthèse de glutamine avec un pool intracellulaire de glutamate constant en réponse à un choc hyperosmotique chez des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* (Anderson et Witter, 1982), *Streptomyces griseus* (Killham et Firestone, 1984) et *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

γ Proline

Chez les bactéries, la voie principale de biosynthèse de la proline est réalisée à partir de l'acide glutamique par une succession de 4 réactions (*cf* Figure n°I.12). La troisième réaction de la voie de biosynthèse est réalisée spontanément. Chez *E. coli*, les trois enzymes sont exprimées de manière constitutive, mais la proline exerce une rétro-inhibition sur la première enzyme, la glutamate kinase (Csonka et Baich, 1983).

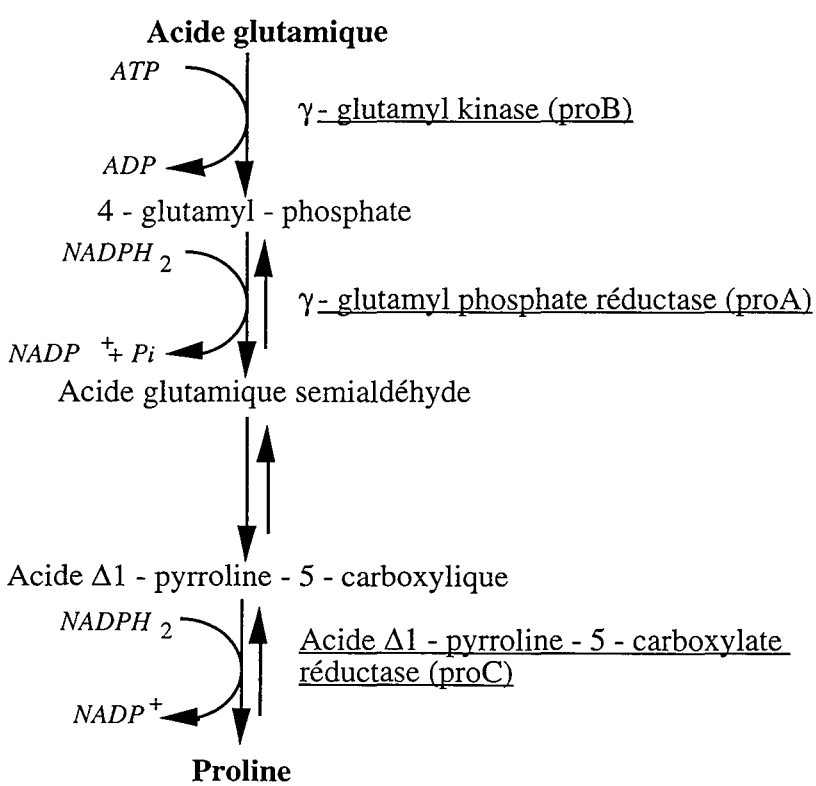


Figure n°I.12 : Voie principale de biosynthèse de la proline chez *E. coli. (D'après Leisinger, 1987).*

Il existe néanmoins une certain nombre de voies alternatives de synthèse de la proline (*cf* Figure n°I.13). Notamment chez *Corynebacterium glutamicum*, Serebrijki *et al.* (1995) ont proposé une voie alternative catalysée par l'aspartate deshydrogénase (Asd). En effet l'intégration du gène asd de *C.glutamicum* dans le génome d'une souche auxotrophe *proA* d'*E. coli* permet à cette dernière de retrouver son autotrophie.

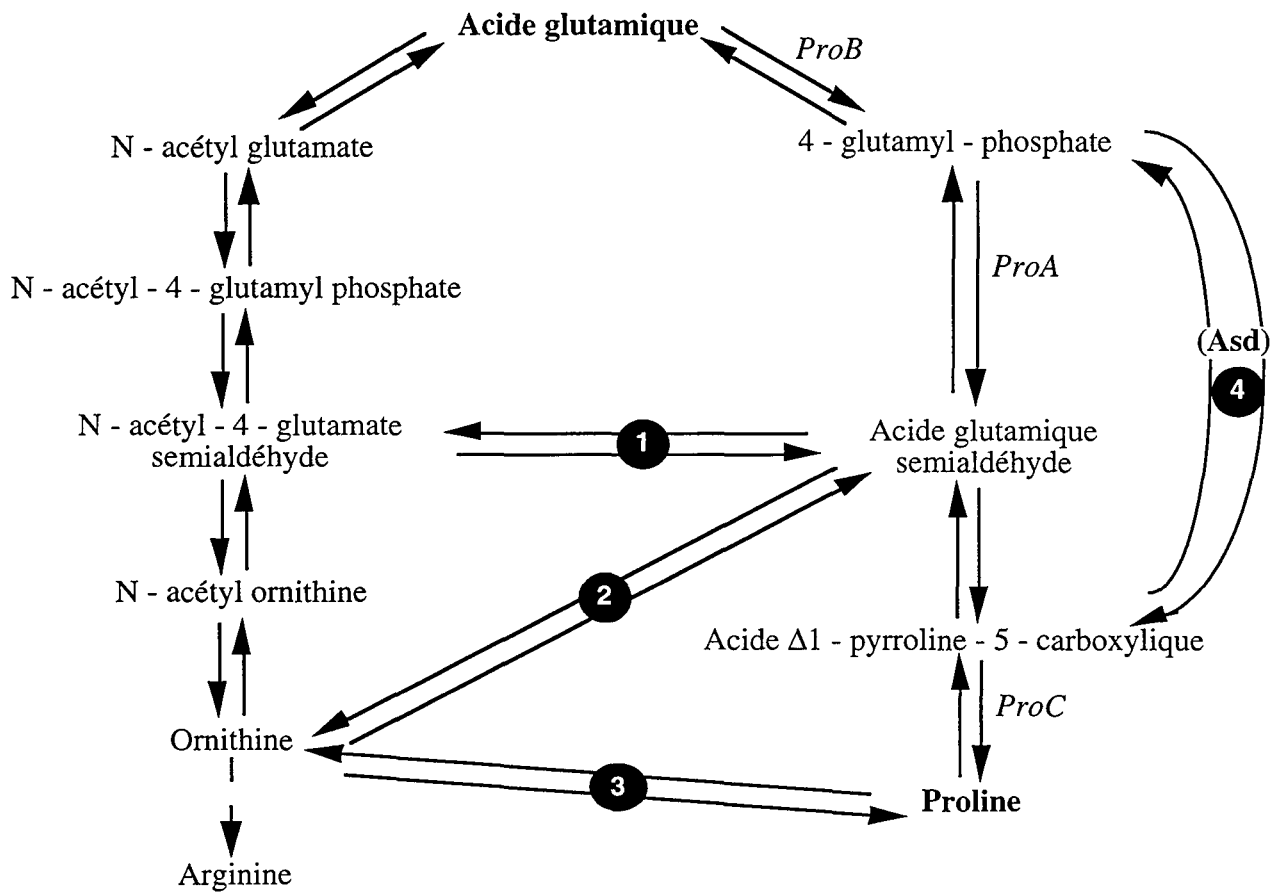


Figure n°I.13 : Voies alternatives de synthèse de la proline :
1 : voie alternative proposée par Leisinger (1987)
2 : voie alternative proposée par Fons et *al.* (1987)
3 : voie alternative proposée par Serebrijsky at *al.* (1995)

L'osmolarité du milieu de culture n'affecte ni la biosynthèse ni la dégradation de la proline chez les entérobactéries telles que *E. coli* et *Salmonella typhimurium* (Csonka, 1988). Toutefois des souches mutantes d'*E. coli* (Csonka *et al.*, 1988), de *Serratia marcescens* (Sugiura *et al.*, 1985) et *Salmonella typhimurium* (Csonka, 1981) productrices de proline montrent une meilleure

résistance vis-à-vis de la pression osmotique. La teneur intracellulaire en proline est alors proportionnelle à l'osmolarité du milieu.

Une synthèse de proline en réponse à un choc hyperosmotique n'a été mise en évidence que chez certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990b), *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) et *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992). Par contre un grand nombre de bactéries accumulent la proline en réponse à un choc hyperosmotique lorsque l'acide aminé est présent dans le milieu. La proline agit dans ce cas comme un osmoprotecteur.

Chez les bactéries à Gram positif telles que *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992) et *Bacillus subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990b), la synthèse de la proline semble être dépendante de l'accumulation des ions potassium en réponse à un stress hyperosmotique. Le potassium servirait alors de signal secondaire de l'osmorégulation en déclenchant les mécanismes de défense de la bactérie dont semble faire partie la synthèse de la proline (Whatmore *et al.*, 1990).

b. Tréhalose

Le tréhalose, α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside, est un disaccharide non réducteur constitué de 2 molécules de glucose reliées entre elles par une liaison α(1-1). L'α,α-tréhalose est la forme rencontrée dans la nature.

La biosynthèse du tréhalose à partir du glucose est réalisée par 2 réactions :

UDP-Glucose + Glucose-6-P $\xrightarrow[\text{(EC 2.4.1.36)}]{\text{Tréhalose-6-P synthétase}}$ Tréhalose-6-P + UDP

Tréhalose-6-P $\xrightarrow[\text{(EC 3.1.3.12)}]{\text{Tréhalose-6-P phosphatase}}$ Tréhalose + Pi

L'hydrolyse du tréhalose est réalisée par la tréhalase (EC 3.2.1.28). Chez les bactéries, la présence d'activité tréhalasique a été mise en évidence chez *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Mycobacterium smegmatis* (Elbein, 1974), chez *E. coli* et chez *Ectothiorhodospira halochloris* , bactérie halophile extrême (Boos, 1987).

Une accumulation de ce disaccharide est connue depuis plusieurs années chez les cyanobactéries, où le tréhalose est le soluté compatible prépondérant (Mackay *et al.*, 1984). Plus

récemment, une accumulation de tréhalose en condition d'osmolarité élevée a été mise en évidence chez *E. coli* (Larsen *et al.*, 1987) et chez *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

Le pool intracellulaire en tréhalose de cellules d'*Escherichia coli* en phase exponentielle de croissance sur milieu synthétique augmente avec la concentration de NaCl du milieu (Styrvold et Strøm, 1991) (*cf* Figure n°I.14).

Dinnbier *et al.*(1988) ont observé lors d'un choc hyperosmotique une accumulation transitoire du potassium et du glutamate chez *E. coli* ; puis le tréhalose est synthétisé par la bactérie pour devenir progressivement l'osmolyte cytoplasmique majoritaire (*cf* Figure n°I.15). Welsh *et al.* (1991) ont observé le même phénomène pour des cultures continues sous limitation azotée tandis que sous limitation carbonée le tréhalose et le glutamate sont accumulés simultanément.

En phase stationnaire de croissance, la teneur intracellulaire en tréhalose chez *E. coli* diminue, probablement avec la diminution de la turgescence cellulaire (Welsh *et al.*, 1991). Un choc hyperosmotique réalisé par ajout de glycérol (soluté non consommé par la bactérie mais pouvant diffusé à travers la membrane cellulaire) n'entraîne pas de synthèse de tréhalose chez *E. coli* (Welsh *et al.*, 1991). Ces auteurs suggèrent que l'accumulation de tréhalose est contrôlée par la turgescence cellulaire plutôt que par l'osmolarité en soi.

L'accumulation du tréhalose semble être également contrôlée par les ions potassium. Ainsi des souches d'*E. coli* défectives dans le transport du potassium accumulent du tréhalose plus rapidement et en plus grande quantité qu'une souche sauvage. A l'inverse des souches mutantes accumulant en permanence du potassium montrent une faible accumulation de tréhalose après un choc hyperosmotique (Dinnbier *et al.*, 1988).

Giaever *et al.* (1988) ont montré que l'activité spécifique *in vitro* de la tréhalose-6-phosphate synthase est plus importante dans des cellules d'*E. coli* cultivées en forte osmolarité. L'activité *in vitro* de cette enzyme est stimulée par le KCl, le glutamate de potassium mais aussi par le NaCl et le LiCl. Ces auteurs ont montré l'existence d'un contrôle transcriptionnel des gènes otsA et otsB impliqués dans la synthèse du tréhalose par l'osmolarité.

Des souches d'*E. coli* défectives pour l'une des deux enzymes intervenant dans la synthèse du tréhalose et donc incapables d'accumuler ce sucre montrent une faible résistance aux élévations de la pression osmotique du milieu externe (Klein *et al.*, 1991).

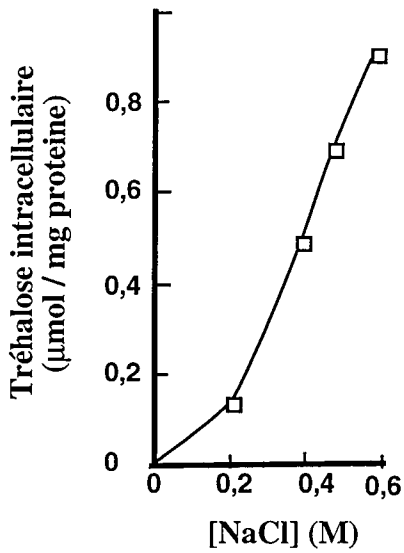


Figure n°I.14 : Concentration intracellulaire en tréhalose chez *E. coli* cultivée en milieu synthétique à différentes concentrations en NaCl. *(D'après Styrvold et Strom, 1991).*

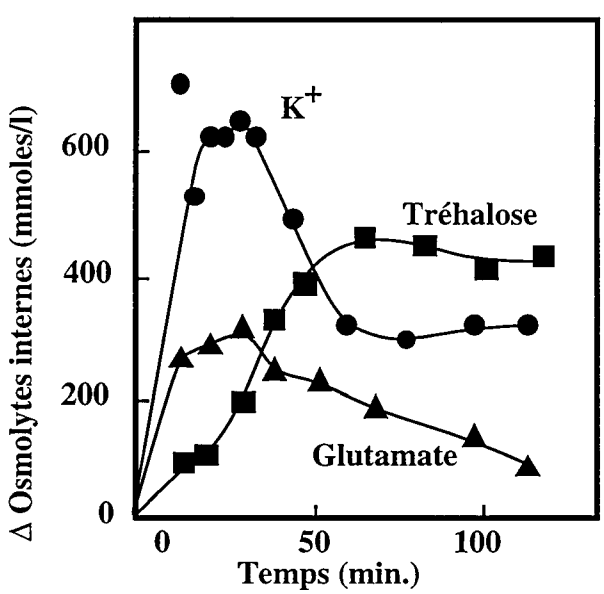


Figure n°I.15 : Variations des concentrations cellulaires en potassium, glutamate et tréhalose après un ajout de NaCl chez *E. coli. (D'après Dinnbier et al., 1988).*

Contrairement à *E. coli*, lors d'un choc hyperosmotique *Corynebacterium glutamicum*, cultivée en fiole, accumule du tréhalose uniquement pendant la phase stationnaire de croissance. Dans ces conditions, la souche accumule en phase de croissance principalement de la proline (Wojcik, 1992).

c Autres solutés compatibles

Quelques autres solutés compatibles tels que des peptides ou des disaccharides sont connus chez un certain nombre de bactéries (*cf* Tableau n°I.3).

I.2.5.3. Rôle des osmoprotecteurs

Les osmoprotecteurs sont des solutés compatibles qui peuvent lever des inhibitions de croissance bactérienne en conditions de fortes pressions osmotiques quand ils sont présents dans le milieu. Ils sont alors accumulés dans la cellule non plus par synthèse *de novo*, mais par simple transport.

a. Proline

Un bon nombre de bactéries peuvent accumuler la proline quand elle est présente dans le milieu de culture, en condition de forte osmolarité.

Lors d'un choc hyperosmotique des bactéries à Gram négatif telles que *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* sont entièrement dépendantes de la présence de proline exogène. Dans ces conditions, la teneur intracellulaire en proline est proportionnelle à l'osmolarité du milieu (Csonka,1988) . Dinnbier *et al.* (1988) observent alors une inhibition partielle de l'accumulation de potassium et une chute rapide de la teneur intracellulaire en tréhalose.

Ainsi chez *E. coli*, en présence de proline et de bétaïne, la bactérie préfère l'utilisation de ces composés aux dépens du tréhalose pour rétablir sa pression de turgescence (Dinnbier *et al.*, 1988). Les auteurs suggérent une répression de la synthèse du tréhalose par ces composés. Pour Rod *et al.* (1988), la synthèse du tréhalose est bien réprimée par la bétaïne exogène mais pas par la proline.

Escherichia coli et *Salmonella typhimurium* possèdent trois systèmes de transport de la proline appelés PutP, ProP et ProU (Lucht et Bremer, 1994).

La principale perméase PutP fonctionne quand la proline est utilisée comme source de carbone et d'énergie mais ne joue aucun rôle dans l'accumulation de l'acide aminé sous stress osmotique.

L'activité du système ProP est fortement stimulée par une osmolarité élevée. ProP serait le principal transporteur de la proline en condition de forte osmolarité. Ce transporteur accepte également la taurine, l'ectoïne, la bétaïne et ses dérivés comme substrat.

Enfin le système ProU fonctionne préférentiellement sous forte osmolarité. Ce transporteur a une faible affinité pour la proline (Km=0,2 mM) mais une très forte affinité pour la glycine-bétaïne (Km=1,3 µM).

Chez *Brevibacterium linens*, la proline est un osmoprotecteur aussi efficace que la glycine-bétaïne (Jebbar *et al.*, 1995).

Lactococcus lactis accumule aussi de la proline dans des conditions de forte osmolarité (Molenaar *et al.*, 1993). Les auteurs ont mis en évidence un transporteur de la proline stimulé par une pression osmotique élevée. La bactérie accumule de préférence la bétaïne si elle est présente également dans le milieu. Le transport de proline est alors inhibé par la bétaïne. Les auteurs suggèrent que la bétaïne serait un inhibiteur compétitif pour le transporteur de la proline.

Par contre, chez *Staphylococcus aureus*, Bae *et al.* (1993) ont montré que la proline et la bétaïne sont accumulés par deux transporteurs différents.

b Bétaïnes

La bétaïne (ou glycine-bétaïne) et ses dérivés sont connus comme étant des osmoprotecteurs plus ubiquitaires que la proline (Csonka, 1989). Une synthèse *de novo* est rare chez les bactéries aérobies prototrophes (Galinski et Trüper, 1994). Une accumulation de bétaïne, quand elle est présente dans le milieu, a été observée en réponse à un stress hyperosmotique chez un grand nombre de bactéries à Gram négatif.

Chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, la bétaïne à 1 mM dans le milieu de culture est un osmoprotecteur plus efficace que la proline (Le Rudulier et Bouillard, 1983, Cayley *et al.*, 1992). La glycine-bétaïne peut alors être accumulée à de très fortes concentrations intracellulaires (jusqu'à 0,8M).

Chez ces bactéries, la bétaïne est transportée par les systèmes ProP et ProU (May *et al.*, 1986) qui interviennent également pour le transport de la proline (bien que ces 2 solutés ne soient pas des analogues structuraux). Il a été montré que ces systèmes possèdent des affinités plus importantes pour la bétaïne que pour la proline (Lucht et Bremer, 1994).

De même chez *Serratia marcescens*, l'inhibition de croissance par le NaCl est levée par un ajout de bétaïne dans le milieu (Sugiura *et al.*, 1985).

Citons également qu'en présence de bétaïne, *E. coli* préfère l'utilisation de ce composé au dépens d'une synthèse de tréhalose pour rétablir sa pression de turgescence (Dinnbier *et al.*, 1988 ; Rod *et al.*,1988) suggérant une répression de la synthèse de tréhalose par la bétaïne.

L'accumulation de glycine-bétaïne dans *Escherichia coli* s'accompagne d'une diminution des concentrations intracellulaires de potassium, de glutamate et de tréhalose et d'une augmentation du volume cytoplasmique (Cayley *et al.*, 1992). D'après Sutherland *et al.* (1986), l'entrée de bétaïne dans le cytoplasme bactérien stimulerait la croissance des cellules stressées en réduisant l'effet toxique du potassium sur les activités enzymatiques.

Cayley *et al.* (1992) ont essayé d'expliquer l'effet de la bétaïne sur le volume cytoplasmique à partir d'une analyse thermodynamique de la relation :

$$V_{cyto} = V_b + \frac{\Phi_{ii} \cdot (\Sigma n_j)_{cyto}}{\frac{\Delta\Pi}{RT} + \Phi_{ex} \cdot (\Sigma C_j)_{ex}}$$

V_b : volume non-osmotique
Φ_{ii} :coefficient osmotique intracellulaire
$(\Sigma n_j)_{cyto}$: quantité totale des solutés intracellulaires
Φ_{ex} : coefficient osmotique extracellulaire
$(\Sigma C_j)_{ex}$: concentration externe en solutés

Ainsi l'augmentation de 50% du volume cytoplasmique observée sur les cellules stressées en présence de bétaïne pourrait s'expliquer mathématiquement par une augmentation de $(\Sigma n_j)_{cyto}$, une diminution du $\Delta\Pi$, une augmentation de V_b ou de Φ_{ii}.

La seule explication retenue par les auteurs est une augmentation du coefficient osmotique intracellulaire (Φ_{ii}). La bétaïne dans le cytoplasme aurait donc un comportement osmotique plus idéal thermodynamiquement que les solutés qu'elle remplace (Cayley *et al.*, 1992). La mesure des coefficients osmotiques montre, en effet, une augmentation de 40% du Φ_{ii} en présence de bétaïne.

D'autres composés, analogues structuraux de la bétaïne, tels que le diméthylthétine (ou sulfobétaïne), la proline-bétaïne ou la γ-butyrobétaïne ont aussi un effet osmoprotecteur chez *E. coli* (Larsen *et al.*, 1987 ; Le Rudulier *et al.*,1984).

Chez de nombreuses bactéries à Gram positif, une accumulation analogue de bétaïne a été observée, notamment chez *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) et *Brevibacterium linens* (Bernard *et al.*, 1993).

Chez *Bacillus subtilis* cultivé dans un milieu à forte osmolarité et enrichi en bétaïne, la synthèse de proline est entièrement réprimée et la bétaïne est utilisée comme le seul osmoprotecteur (Whatmore *et al.*, 1990b).

Enfin chez *Staphylococcus aureus* cultivé sur milieu synthétique, Pourkomailian et Rooth (1992) ont mis en évidence la présence de deux transporteurs de la glycine-bétaïne, l'un à faible affinité pour le substrat et stimulé par le NaCl en forte concentration, l'autre à forte affinité non influencé par la pression osmotique du milieu. Par contre, Bae *et al.* (1993) n'ont trouvé chez la bactérie cultivée sur milieu complexe qu'un seul transporteur de la glycine-bétaïne, celui-ci est stimulé par de fortes concentrations de NaCl. Le transport de la glycine-bétaïne serait soumise à une rétro-inhibition par la bétaïne intracellulaire (Stimeling *et al.*, 1994 ; Pourkomailian et Booth, 1994). Cela expliquerait les différences observées entre cellules cultivées sur milieu complexe et celles cultivées sur milieu synthétique. Le transporteur à haute affinité serait particulièrement inhibé sur milieu complexe par la bétaïne externe (Stimeling *et al.*, 1994).

II. Osmorégulation chez les corynebactéries

Les corynebactéries appartiennent à la branche phylogénétique des bactéries actinomycètes. Cette famille de bactéries à Gram positif contient notamment les genres *Corynebacterium*, *Brevibacterium* et *Arthrobacter*. Ces bactéries sont très utilisées dans l'industrie alimentaire puisqu'on les retrouve dans les procédés de production d'acides aminés (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*), de fabrication des fromages (*Brevibacterium*)...

II.1. Etendue des connaissances actuelles

L'osmorégulation des corynebactéries n'a été étudiée que très récemment. Les premières publications concernant les réponses physiologiques de ces bactéries à un choc osmotique datent de 1989 (Kawahara *et al.*, 1989). Depuis on peut relever une dizaine de publications sorties sur ce sujet.

L'ensemble de ces publications donnent un descriptif des métabolites intervenant dans les phénomènes d'osmorégulation. Une attention particulière est donnée dans la majorité des publications à l'étude des osmoprotecteurs chez les corynébactéries.

II.2. Métabolites intervenant dans l'osmorégulation

II.2.1. Ions

Le potassium est le cation le plus abondant dans le cytoplasme des corynebactéries. Chez *Brevibacterium linens*, le pool intracellulaire en potassium augmente avec la concentration en NaCl du milieu (Bernard *et al.*, 1993).

A la suite d'un choc osmotique par ajout de sorbitol dans le milieu de culture, Kawahara et al. (1989) n'ont pas observé de variation du pool intacellulaire en potassium chez *Brevibacterium lactofermentum.*

Brevibacterium sp. accumule des ions sodium lorsque le choc hyperosmotique est réalisé avec un sel de sodium (Nagata *et al.*, 1991). Le pool intracellulaire de potassium reste alors constant. L'inverse est observé lorsque le choc hyperosmotique est effectué avec un sel de potassium.

Ces mêmes auteurs ont montré que le pool de sodium libre est nettement inférieur au pool total obtenu par les techniques classiques de mesure des ions intracellulaires. (Nagata *et al.*, 1995). Ils suggèrent que la bactérie arrive à maintenir un faible pool intracellulaire libre de sodium grâce à des systèmes d'efflux actifs (pompes à sodium, antiport Na^+/H^+).

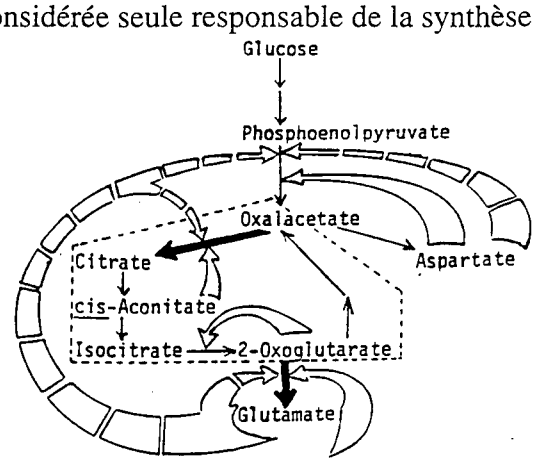
II.2.2. Solutés compatibles

II.2.2.1. Acides aminés

a. Acide glutamique

Chez ces bactéries, il semble exister les trois voies possibles de biosynthèse de l'acide glutamique à partir de l'α-cétoglutarate : par la glutamate deshydrogénase, la glutamate synthase et les transaminases. La présence de la glutamate deshydrogénase et de la glutamate synthase a été notamment mise en évidence chez *Brevibacterium flavum* (Sung *et al.*, 1984) et *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992). Chez *Corynebacterium glutamicum* , la glutamate deshydrogénase, la glutamate synthase et l'aspartate transaminase sont présentes (Delaunay, 1995). Mais leur rôle dans la synthèse du glutamate n'a pas été établi.

Un schéma global de la régulation de la biosynthèse de l'acide glutamique (*cf* Figure n°I.16) a été proposé chez *Brevibacterium flavum* (Shiio et Ujigawa, 1978). La glutamate deshydrogénase est dans ce cas considérée seule responsable de la synthèse de glutamate.



Regulation of glutamate and aspartate biosyntheses in *Brevibacterium flavum*. ⇨, feedback inhibition (*6*, *8*, *10*, *11*); □□⇨, feedback repression; ➡, preferential conversion ⊏⊐, amphibolic pathway.

Figure n°I.16 : Régulation de la biosynthèse de l'acide glutamique chez *Brevibacterium flavum. (D'après Shiio et Ujigawa, 1978).*

Le glutamate est connu comme soluté compatible chez un grand nombre de bactéries. Néanmoins aucune accumulation de glutamate n'a été mise en évidence lors d'un choc hyperosmotique chez *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) et *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

Chez *Brevibacterium linens*, le pool intracellulaire en glutamate augmente à la suite d'un ajout de NaCl dans un milieu, contenant du glutamate et du lactate comme sources énergétiques, en présence de bétaïne ou de proline (Jebbar *et al.*, 1995).

b. Glutamine

Selon Frings et al. (1993), l'accumulation de glycine-bétaïne et l'accumulation ou la synthèse de glutamine sont responsables de l'osmoadaptation du genre *Corynebacterium* cultivé sur milieu complexe.

Une légère accumulation de glutamine a été mise en évidence en phase stationnaire de croissance en condition de forte osmolarité chez *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

c. Proline

Brevibacterium lactofermentum accumule de la proline suite à un choc hyperosmotique réalisé avec du sorbitol (Kawahara *et al.*, 1989). De même, suite à un ajout de NaCl dans le milieu, une forte accumulation de proline est observée chez *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992).

Chez *Brevibacterium lactofermentum* (renommé *Corynebacterium glutamicum*, Liebl *et al.*, 1991), Kawahara *et al.* (1989) ont montré que l'activité de la Δ-1-Pyrroline-5-carboxylate réductase était multipliée par 3 dans les cellules cultivées en forte osmolarité. Ainsi la rétro-inhibition sur la glutamate kinase semble ne pas être effective chez *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) et *Corynebacterium glutamicum* (Wojcik, 1992) puisqu'elles accumulent de la proline sous condition de forte pression osmotique. Ainsi l'activité *in vitro* de la glutamate kinase de *Brevibacterium flavum* n'est pas affectée par la proline (Yoshinaga *et al.*, 1975). L'osmorégulation de la biosynthèse de la proline chez ces bactéries est donc différente de celle des entérobactéries.

Chez *Corynebacterium glutamicum*, la présence des ions potassium dans le milieu est indispensable à l'accumulation de la proline lors d'un choc hyperosmotique (Wojcik, 1992).

II.2.2.2. Tréhalose

Lors d'un choc hyperosmotique, *Corynebacterium glutamicum,* cultivée en fiole sur mileu synthétique contenant du glucose comme source énergétique, accumule du tréhalose uniquement pendant la phase stationnaire de croissance. Un ajout de potassium dans le milieu de culture entraîne une chute du pool intracellulaire en tréhalose, de même un ajout de bétaïne dans le milieu affecte fortement l'accumulation du tréhalose (Wojcik, 1992).

II.2.2.3. Autres solutés compatibles

Un autre soluté compatible important chez les corynebactéries est l'ectoïne, composé tétrahydropyrimidinique synthétisé à partir de l'acide aspartique (*cf* Figure n°I.17). Il est notamment le soluté compatible principal des bactéries du genre *Brevibacterium*. Par contre ce composé n'est pas retrouvé chez le genre *Corynebacterium* (Frings *et al.*, 1993).

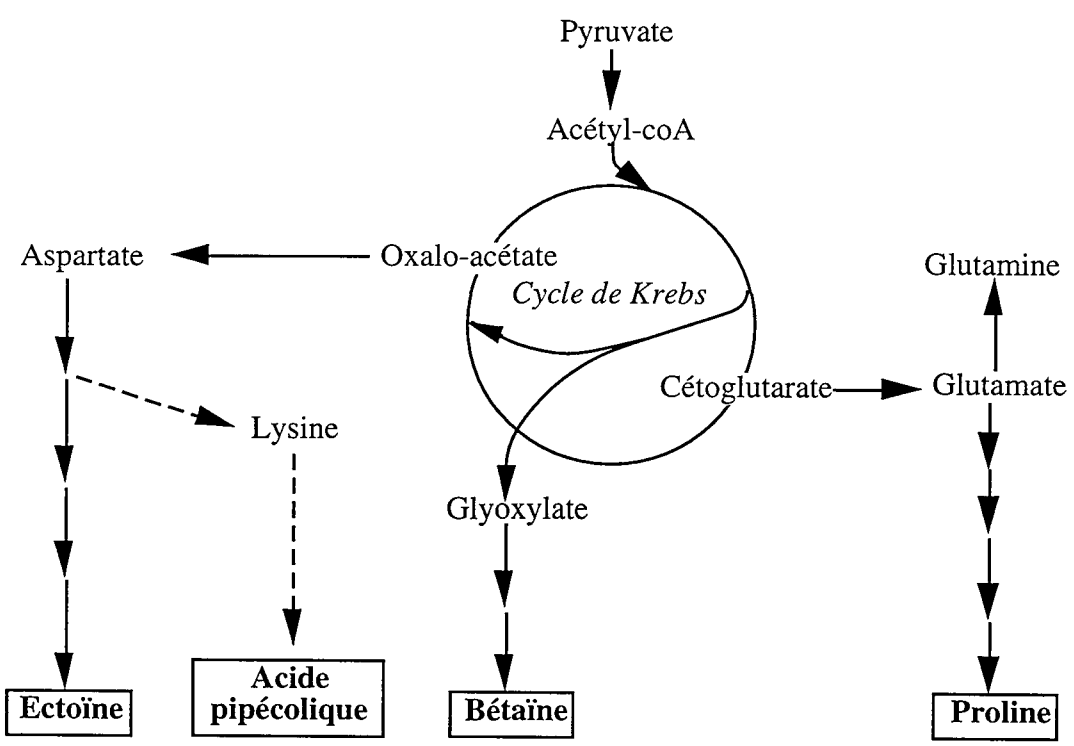


Figure n°I.17 : Voies de biosynthèse des solutés compatibles rencontrés chez les Corynebactéries. *(D'après Galinski et Trüper, 1994).*

Chez *Brevibacterium linens* cultivé sur milieu synthétique avec du glutamate et du lactate comme sources énergétiques, le pool intracellulaire d'ectoïne augmente avec la concentration en NaCl du milieu jusqu'à 1 M (Bernard et al., 1993) (*cf* Figure n°I.18).

Brevibacterium ammoniagenes accumule de l'acide pipécolique en réponse à un choc hyperosmotique sur milieu synthétique contenant du glucose et du lactate (Gouesbet *et al.*, 1992). Sa concentration intracellulaire augmente avec l'élévation de la concentration externe en NaCl (*cf* Figure n°I.19). Le KCl, le saccharose, et le sorbitol exercent approximativement le même effet que le NaCl, alors que le glycérol n'a aucun effet sur le pool intracellulaire en acide pipécolique. Les auteurs suggèrent une régulation par l'osmolalité externe de la voie de biosynthèse de l'acide pipecolique à partir de la lysine (*cf* Figure n°I.17).

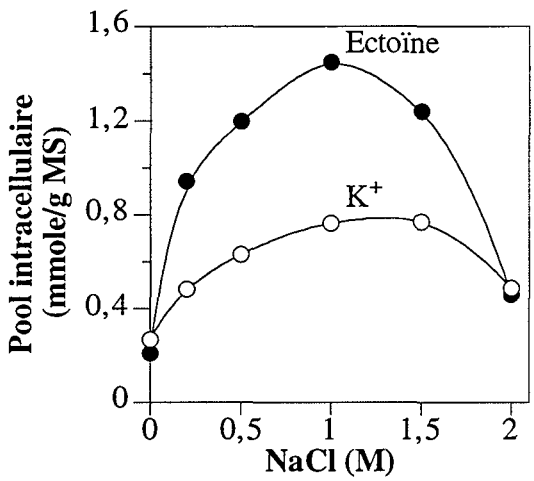


Figure n°I.18 : Teneur intracellulaire en ectoïne et potassium chez *B. linens* cultivée à différentes concentrations en NaCl. *(D'après Bernard et al., 1993).*

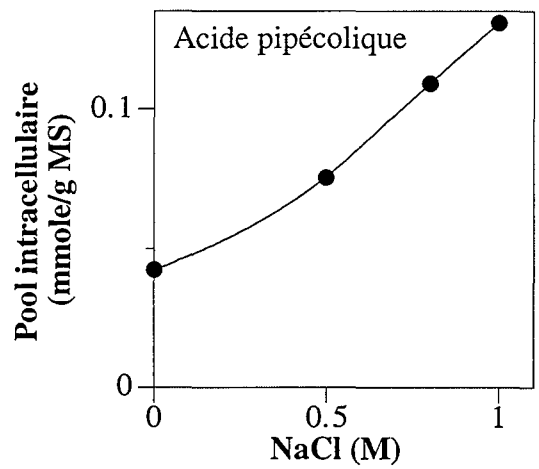


Figure n°I.19 : Teneur intracellulaire en acide pipécolique chez *B. ammoniagenes* cultivée à différentes concentrations en NaCl. *(D'après Gouesbet et al., 1992).*

II.2.3. Osmoprotecteurs

II.2.3.1. Proline

Chez *Brevibacterium linens*, la proline est un osmoprotecteur aussi efficace que la glycine-bétaïne (Jebbar *et al.*, 1995). Néanmoins elle ne se comporte pas comme un osmoprotecteur vrai, elle n'est en effet accumulée que transitoirement et n'inhibe pas la synthèse de glutamate, tréhalose

et ectoïne (cf Figure n°I.20 - B). L'utilisation de ^{14}C-proline montre que l'acide aminé est métabolisé pour la synthèse des solutés compatibles cités ci-dessus. A la fin de la croissance, 50% de la radioactivité initiale ont été incorporés dans l'ectoïne, principal soluté compatible de *Brevibacterium linens.*

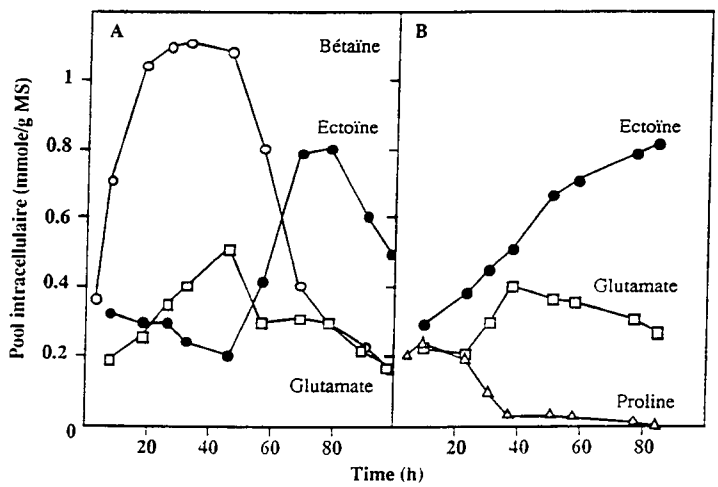


Figure n°I.20 : Evolution du pool intracellulaire en métabolites chez *Brevibacterium linens* cultivée en milieu synthétique contenant 1,5 M NaCl en présence de bétaïne (A) ou de proline (B). *(D'après Jebbar et al., 1995).*

II.2.3.2. Bétaïnes

Une accumulation de bétaïne a été observée chez *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) et *Brevibacterium linens* (Bernard *et al.*, 1993).

Chez *Corynebacterium glutamicum* , la présence de bétaïne à 1 et 10 mM dans le milieu en forte osmolarité affecte la synthèse de proline sans la stopper complètement (Wojcik, 1992). Les accumulations de tréhalose et de glutamine sont affectées par la bétaïne.

Chez *Brevibacterium linens*, la glycine-bétaïne est un osmoprotecteur efficace (Jebbar *et al.*, 1995). Elle agit comme un véritable osmoprotecteur puisque elle est accumulée, non métabolisée et elle abolit totalement la synthèse du principal soluté compatible (ectoïne) si elle est en concentration non-limitante dans le milieu (cf Figure n°I.20 - A).

Enfin, la présence de glycine-bétaïne (1 mM) dans le milieu de culture en condition de forte osmolarité (1 M NaCl) entraîne une diminution du pool intracellulaire en ectoïne chez *Brevibacterium linens* (Bernard et al., 1993) et en acide pipécolique chez *Brevibacterium ammoniagenes* (Gouesbet *et al.*, 1992).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Souches microbiennes 47

I.1. Caractéristiques des souches sauvages 47

I.2. Descriptif des souches recombinées 48

II. Milieux de culture 48

II.1. Milieu de conservation des souches 48

II.2. Milieu liquide BMCG 48

III. Procédés de culture 49

III.1. Conservation des souches 49

III.2. Culture sur boite de Pétri 49

III.3. Culture en fiole d'Erlenmeyer 49

III.4. Culture en fermenteur 50

III.4.1. Régulations des conditions physico-chimiques 50

III.4.1.1. Régulation de température 50

III.4.1.2. Agitation 50

III.4.1.3. Aération 50

III.4.1.4. Régulation du pH 50

III.4.2. Mise en oeuvre des cultures discontinues 50

III.4.3. Mise en oeuvre des cultures continues 51

III.4.4. Mise en oeuvre des chocs osmotiques 51

III.4.4.1. Cultures discontinues 51

III.4.4.2. Cultures continues 51

IV. Méthodes analytiques de dosage 52

IV.1. Mesure de la concentration de biomasse 52

IV.1.1. Mesure de la masse sèche cellulaire d'un échantillon 52

IV.1.2. Détermination de la concentration en biomasse à partir de la mesure de la densité optique 52

IV.2. Dosage du glucose 53

IV.3. Dosage des ions sodium et potassium 54

IV.4. Dosage des ions ammonium 54

IV.5. Dosages des acides aminés 54

IV.6. Dosage du tréhalose 57

IV.7. Dosage des acides organiques, alcools et sucres **57**
IV.8. Dosage de la bétaïne **59**
IV.9. Dosage des protéines **59**
IV.10. Dosage d'enzymes intracellulaires **60**
IV.10.1. Obtention des extraits cellulaires bruts 60
IV.10.2. Dosages enzymatiques 60
IV.10.2.1. Dosage de la glutamate deshydrogénase (gdh) 61
IV.10.2.2. Dosage de la glutamate synthase ou glutamine amide 2 oxoglutarate transférase (gogat) 61
IV.10.2.3. Dosage de l'aspartate transaminase 62
IV.11. Mesure de la pression osmotique du milieu **62**

V. Méthode d'extraction des métabolites intracellulaires **63**
V.1. Analyse bibliographique **63**
V.2. Mode de prélèvement et de concentration des cellules **64**
V.2.1. Centrifugation 64
V.2.2. Centrifugation multicouche 66
V.2.3. Filtration 66
V.2.4. Système de prélèvement et de blocage rapide des échantillons 66
V.3. Protocoles d'extraction des métabolites intracellulaires **67**
V.3.1. Après centrifugation 67
V.3.2. Après centrifugation multicouche 68
V.3.3. Après filtration 68
V.4. Choix et développement de la méthode utilisée dans l'étude **68**
V.4.1. Méthode d'extraction des composés organiques intracellulaires 68
V.4.1.1. Choix de la technique utilisée 68
V.4.1.2. Efficacité de l'extraction 70
V.4.1.3. Evolution du contenu cellulaire 71
V.4.1.4. Reproductibilité de la méthode 73
V.4.2. Méthode d'extraction des cations intracellulaires 74

VI. Détermination du contenu en eau libre des cellules **74**
VI.1. Principe de la technique **74**
VI.2. Mesure de la masse totale des bactéries **74**
VI.3. Mesure de l'espace interstitiel **76**
VI.4. Dosage du thiosulfate **76**
VI.5. Calcul du volume interstitiel et du contenu en eau des cellules **77**
VI.5.1. Calcul point par point 77
VI.5.2. Calcul par régression linéaire 77

VII. Suivi du volume cellulaire 78
VII.1. Utilisation du compteur de particules (Coulter counter) 78
VII.2. Utilisation d'une méthode spectrophotométrique 79

VIII. Détermination de la pression osmotique intracellulaire 80

IX. Etude du transport de sucres par marquage radioactif 82

X. Exploitation des données expérimentales 83
X.1. Calcul des concentrations intracellulaires 83
X.2. Détermination des vitesses et des rendements en réacteur discontinu 85
X.3. Détermination des vitesses et des rendements en réacteur continu 86

Matériel et méthodes

I. Souches microbiennes

I.1. Caractéristiques des souches sauvages

Le microorganisme utilisé *Corynebacterium glutamicum melassecola* (ATCC 17965 et ATCC 14752) a été fourni par la société ORSAN. Ses principales caractéristiques sont donnés dans le tableau n°II.1.

Caractères principaux	Production d'acides à partir de		Autres caractères	
Bactérie à Gram positif	Saccharose	+	Uréase	+
Bacilles courts, droits ou légèrement incurvés isolés ou par paire Dimensions : 0.7 à 1 µm x 1 à 3 µm	Glucose	+	Hydrolyse gélatine	-
	Fructose	+	Hydrolyse caséine	-
	Maltose	+		
Aspect sur gélose : colonies jaune pâle à jaune, régulières et lisses	Tréhalose	+	Réduction des	+
	Mannose	+	nitrates en nitrites	
Non sporulant Non mobile	Rhamnose	-		
	Galactose	-	Esculine	-
Anaérobie facultative Auxotrophe pour la biotine	Raffinose	-	Hippurate	+
	Arabinose	-		
Production d'acide glutamique	Lactose	-		
Température optimale de croissance : 25-37°C	Xylose	-		
	Dextrine	-		
pH optimal de croissance : 7,3 - 7,4	Salicine	-		
G+C : 55 à 57,7 %	Amidon	-		
Paroi : *meso*-DAP, arabinose et galactose. Présence de courtes chaines d'acides mycoliques (22 à 36 carbones)				

Tableau n°II.1 : Caractéristiques de l'espèce bactérienne *Corynebacterium glutamicum* (D'après Collins et Cummins, 1986)

I.2. Descriptif des souches recombinées

Les souches mutées de *Corynebacterium glutamicum melassecola,* utilisées au cours de ce travail, dérivent de la souche sauvage ATCC 14752 ; elles ont été construites à l'Institut de Génétique et Microbiologie (Orsay). Un descriptif de ces souches est présenté dans le tableau n°II.2.

Nom du mutant	Caractère phénotypique	Construction du mutant
mutant *proA*	bradytrophie à la proline complémentable par la proline résistance à la Kanamycine	inactivation du gène ProA par insertion d'une cassette
mutant *proC*	auxotrophie à la proline complémentable par la proline résistance à la Kanamycine	inactivation du gène ProC par insertion d'un transposon
mutant *gdhA*	déficience en gdh résistance à la Kanamycine	inactivation du gène GdhA par insertion d'une cassette

Tableau n°II.2 : Description des souches recombinées

II. Milieux de culture

II.1. Milieu de conservation des souches

Le milieu BCC (Bouillon Cœur Cervelle, Biokar Solabia) est utilisé pour le repiquage des souches sur boîte de Pétri. Sa composition est décrite en Annexe n°II:

II.2. Milieu liquide BMCG

Le milieu BMCG (Basal Medium Corynebacterium Growth) modifié est le milieu de base pour la croissance de *Corynebacterium* (cf Annexe n°III). Ce milieu résulte d'une combinaison de plusieurs vitamines (acide nicotinique, acide panthoténique, *myo*-inositol et choline) et d'un composé chélatant du fer, la déféroxamine, additionnée au milieu minéral de base décrit par Liebl et al. (1989). L'osmolalité de ce milieu contenant 20 g/l de glucose est de 0,4 osmol.kg^{-1}.

III. Procédés de culture

III.1. Conservation des souches

La conservation de la souche à moyen terme est réalisée par congélation sous glycérol ("glycérol stock"). Une culture de la souche est effectuée en milieu liquide BMCG-glucose. Après croissance des bactéries jusqu'en phase exponentielle, un volume de glycérol stérile est ajouté à trois volumes de la culture. La suspension bactérienne à 25% de glycérol est ensuite répartie dans des tubes stériles (1 ml) puis congelée à -20 ^{0}C.

III.2. Culture sur boite de Pétri

Les bactéries sont repiquées sur boîte de Pétri contenant du milieu BCC. Pour les souches recombinées, de la kanamycine est ajoutée au milieu BCC à raison de 25 mg/l d'antibiotique. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 48 heures.

III.3. Culture en fiole d'Erlenmeyer

Les précultures sont ensemencées à partir d'une colonie récupérée sur boîte de Pétri. Elles sont effectuées sur milieu liquide BMCG-glucose en fiole d'erlenmeyer. Pour les souches mutantes, une solution concentrée de kanamycine filtrée à 0,22 µm est ajoutée au milieu BMCG pour atteindre une concentration finale en antibiotique de 25 mg/l. Pour la souche *proC*, une solution de proline filtrée à 0,22 µm est également ajoutée au milieu (concentration finale en proline de 2 g/l). Les cultures en fiole d'erlenmeyer sont réalisées à une température de 34°C durant 12h à 170 RPM.
Lorsque les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance, la préculture est utilisée pour ensemencer le réacteur.

III.4. Culture en fermenteur

Le fermenteur utilisé dans cette étude est un réacteur (Sétric Génie Industriel) de 2 litres (volume total). Sa configuration générale est présentée en Annexe n°IV.

III.4.1. Régulations des conditions physico-chimiques

III.4.1.1. Régulation de température

La température est régulée à 34,5°C par une sonde chauffante et par circulation d'eau froide dans un doigt de gant.

III.4.1.2. Agitation

L'agitation est obtenue par une turbine de type Rushton. Dans notre cas, la vitesse est fixée à 1000 tours/minute. Cette vitesse permet une bonne homogénéisation du milieu de culture et une bonne aération.

III.4.1.3. Aération

L'aération est réalisée à l'aide d'un diffuseur d'air (sparger). Dans notre cas, le débit d'air entrant dans le fermenteur est de 0,7 VVM.

Le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu est controlé à l'aide d'une sonde à oxygène. Dans nos conditions de culture, il se situe au dessus de 20 % tout au long de la fermentation.

L'étalonnage de la sonde est effectué après la stérilisation. La valeur 0% est obtenue en insufflant de l'azote dans le réacteur. La valeur 100% est réglée en aérant le fermenteur dans les conditions de fermentation (pH, agitation, aération).

III.4.1.4. Régulation du pH

Le pH est régulé à 7,3 par un système PID couplé à une sonde à pH stérilisable (Ingold). L'étalonnage de la sonde est effectué avant stérilisation. La régulation du pH se fait par injection à l'aide d'une pompe péristaltique d'une solution de soude 4N en phase de croissance. En phase stationnaire, la régulation du pH se fait par injection d'acide chlorhydrique 2N.

III.4.2. Mise en oeuvre des cultures discontinues

Le milieu de base (solution A) est stérilisé dans le réacteur de 2 litres par autoclavage (20 minutes à 120°C). Les solutions de supplément et de source de carbone stériles sont ajoutées stérilement avant inoculation.

L'inoculum est constitué de bactéries en phase exponentielle de croissance (environ 2 g/l de biomasse sèche). Le taux d'ensemencement est de 5% en volume.

III.4.3. Mise en oeuvre des cultures continues

Les cultures continues débutent par une phase discontinue dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent. Lorsque la culture atteint la fin de la phase exponentielle de croissance, la phase continue débute en alimentant le réacteur en milieu BMCG complet neuf. Du moût bactérien est soutiré en permanence par la sonde de niveau à l'aide d'une pompe péristaltique. Le volume de liquide dans le réacteur reste constant à 1 litre. Le débit d'alimentation et de soutirage fixe le taux de dilution de travail par la relation :

$$D = \frac{Q}{V}$$

D : taux de dilution (h^{-1})
Q : débit d'alimentation (l/h)
V : volume de milieu dans le réacteur (l)

Il est généralement admis que l'état stationnaire de la culture est atteint au bout d'une période équivalente à 5 fois le temps de passage (1/D). A l'état stationnaire, le taux de croissance de la bactérie est égal au taux de dilution de la culture.

III.4.4. Mise en oeuvre des chocs osmotiques

III.4.4.1. Cultures discontinues

Le fermenteur est ensemencé avec des bactéries cultivées en fiole d'erlenmeyer sur milieu BMCG (0,4 Osm). Les bactéries sont mises en culture durant 2-3 heures sur le même milieu en réacteur. Du milieu BMCG complet (sels, vitamines, source de carbone) et une solution concentrée de NaCl (5 M) sont ajoutés afin d'atteindre l'osmolalité désirée sans diluer la concentration en nutriments du milieu de culture.

III.4.4.2. Cultures continues

La culture continue débute sur milieu BMCG à 0,4 Osm. Le choc hyperosmotique est réalisé lorsque l'état stationnaire est atteint. Du milieu BMCG complet (sels, vitamines, source de carbone) et une solution concentrée de NaCl (5 M) sont ajoutés dans le réacteur afin d'atteindre l'osmolalité désirée. Le réacteur est alors alimenté avec du milieu BMCG supplémenté en NaCl d'osmolalité désirée.

IV. Méthodes analytiques de dosage

IV.1. Mesure de la concentration de biomasse

IV.1.1. Mesure de la masse sèche cellulaire d'un échantillon

Des coupelles en aluminium sont mises à sécher dans une étuve à 110°C pendant 24 heures. Ces coupelles sont pesées sur une balance de précision (Mettler). Un volume déterminé de moût de fermentation de densité optique connue est centrifugé à 7000 g et 0°C pendant 1 minute. Le surnageant est ensuite retiré ; le culot bactérien est resuspendu dans une solution de NaCl isotonique afin de le laver. Une deuxième centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est à nouveau retiré puis le culot bactérien est resuspendu dans de l'eau distillée. La suspension bactérienne est placée dans une coupelle en aluminium préalablement tarée et mise à sécher dans l'étuve à 110°C pendant 48 heures.

La différence de masse permet de calculer la concentration cellulaire en biomasse sèche par litre après correction dû à l'apport de NaCl présent dans l'espace interstitiel du culot bactérien. Pour tenir compte de ce biais, la mesure de l'espace interstitiel de culots de bactéries cultivées à différentes pressions osmotiques est réalisée grâce à la méthode décrite plus loin (*cf* § VI.3). La connaissance du volume interstitiel permet alors de calculer la masse de NaCl apporté par le lavage et de corriger la masse de matière sèche :

$$Msc = Msc_{mesurée} - \left(\frac{V_{int} \times [NaCl]}{1000}\right)$$

Msc : masse sèche cellulaire corrigée (g)
$Msc_{mesurée}$: masse sèche cellulaire mesurée (g)
V_{int} : volume interstitiel (ml)
[NaCl] : concentration en NaCl de solution de lavage (g/ml)

IV.1.2. Détermination de la concentration en biomasse à partir de la mesure de la densité optique

La concentration en biomasse est déterminée à partir de la mesure de la densité optique à 570 nm avec un spectrophotomètre Novaspec II LKB. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une culture bactérienne dense en phase de croissance. Plusieurs échantillons sont prélevés et les mesures de densité optique et de la masse sèche cellulaire sont réalisés. Une relation linéaire entre la concentration en matière sèche cellulaire (gMS/l) et la densité optique à 570 nm est obtenue (*cf* Figure n°II.1).

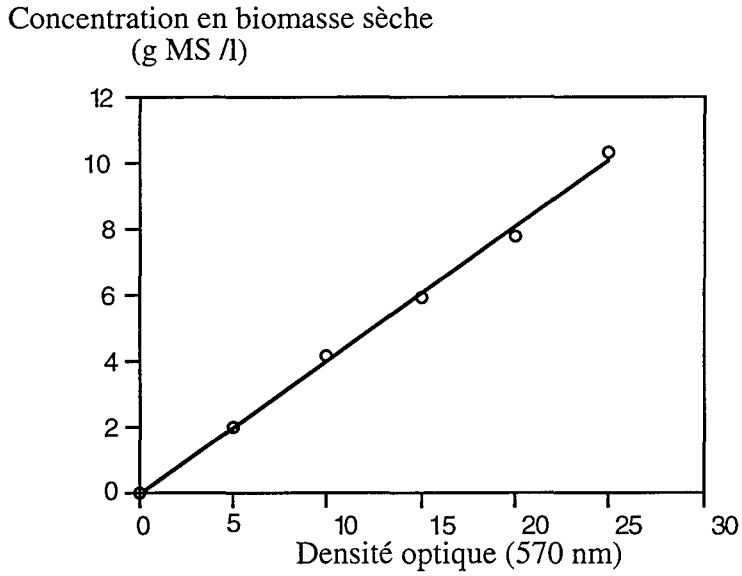


Figure n°II.1 : Relation entre la densité optique d'une suspension de *Corynebacterium glutamicum* et sa concentration en biomasse sèche.

IV.2. Dosage du glucose

La concentration de glucose dans le milieu de culture est déterminée par la méthode de dosage des sucres réducteurs de Miller. En milieu basique, l'acide 3,5-dinitrosalicylique réagit avec tous les sucres réducteurs pour former une coloration jaune orangée. Cette coloration est proportionnelle à la concentration en glucose entre 0 et 1 g/l. La variation attribuée au dosage est de l'ordre de 10%.

❑ Réactif :

40 g d'acide dinitrosalicylique
8 g de phénol
2 g de sulfite de sodium

Le mélange est dissous dans 2 litres de NaOH 2% puis 800 g de tartrate de sodium et potassium sont ajoutés. Le volume est complété à 4 litres avec de l'eau distillée.

❑ Procédure :

200 µl d'échantillon sont mélangés à 300 µl de réactif . Les échantillons sont maintenus 15 minutes à 100°C puis refroidis. La coloration jaune reste stable pendant une heure. 150 µl du mélange sont placés dans une microplaque. La lecture de la plaque est réalisée à 640 nm par un Spectrophotomètre Multiskan multi-canaux. Une gamme étalon allant de 0 à 1 g/l est préparée avec du glucose.

IV.3. Dosage des ions sodium et potassium

Le dosage des cations dans les extraits cellulaires est réalisé par spectroscopie d'Absorption Atomique (Spectromètre VARIAN AA20).

La détection est effectuée aux longueurs d'onde suivantes :

Sodium : 589 nm
Potassium : 766,2 nm

IV.4. Dosage des ions ammonium

Les ions ammoniums sont dosés à l'aide d'une sonde conductimétrique (Orion 95-12). Lors de l'analyse, l'échantillon est amené à un pH très basique par ajout de NaOH concentré afin de transformer les ions ammonium en ammoniac, lequel diffuse à travers la membrane de la sonde et modifie la conductivité de l'électrolyte. Cette variation est mesurée par un millivoltmètre. Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en ammoniac et la réponse de la sonde en millivolts pour des concentrations allant de 10^{-6} à 1 M d'ammonium. La reproductibilité des mesures est de l'ordre de 5%.

IV.5. Dosages des acides aminés

Le dosage des acides aminés est réalisé sur une chaine CLHP Hewlett Packard 1090. Cette technique nécessite une dérivatisation pré-colonne par l'orthophtaldialdéhyde (OPA) et le 9 - fluorenylmethylchloroformate (FMOC) permettant leur détection. Cette technique a été décrite par Godel et *al.* (1992). Les acides aminés primaires réagissent avec l'OPA et peuvent être détectés à 338 nm ; les acides aminés secondaires réagissent avec le FMOC et peuvent être détectés à 262 nm (*cf* Figure n°II.2).

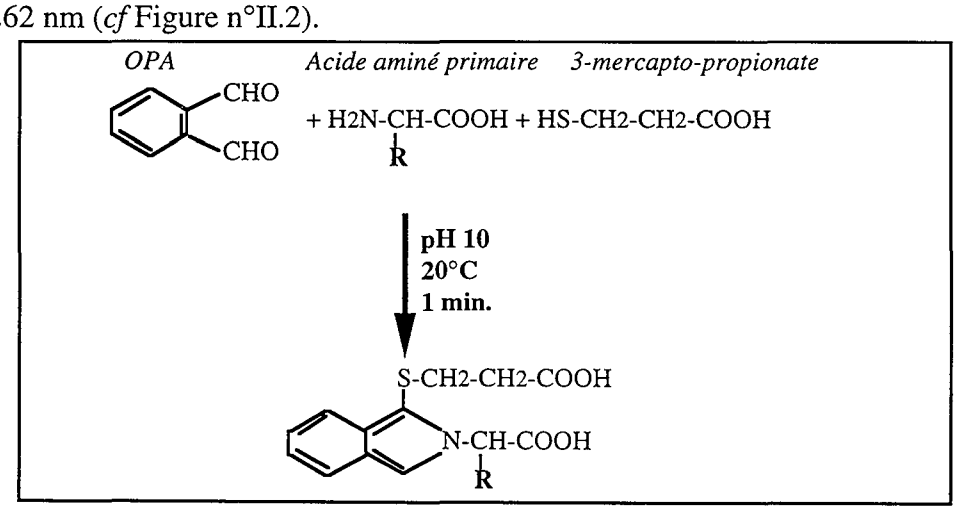


Figure n°II.2 : Principe de dérivatisation des acides aminés primaires et secondaires

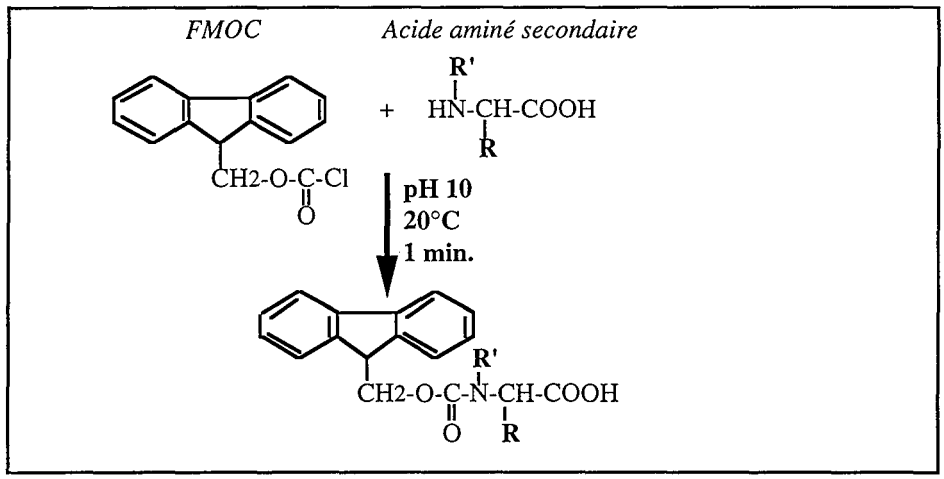


Figure n°II.2 (suite)

❑ Colonnes :

Précolonne Hewlett Packard ODS-Hypersil C18 (5 µm,20 x 2,1 mm)
Colonne Hewlett Packard ODS-Hypersil C18 (5 µm,200 x 2,1 mm) placée dans un four thermostaté à 40°C.

❑ Préparation des phases mobiles :

Phase mobile A :

-Acétate Sodium	20 mM
-Triethylamine	0,024%(v/v)
(Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide acétique dilué)	
-Tétrahydrofurane	0,5%(v/v)

Phase mobile B :

-Acétate Sodium	100 mM
(Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide acétique dilué)	
-Méthanol	40%(v/v)
-Acétonitrile	40%(v/v)

❑ Dérivatisation pré-colonne :

Les dérivés sont préparés directement dans la seringue de l'injecteur automatique.
Sont prélevés successivement :

3 µl de tampon borate 0,4 N, pH 10,4
1 µl d'OPA
1 µl d'échantillon
1 µl de FMOC

Entre chaque prélèvement l'aiguille est rincée, les différents réactifs sont mélangés par plusieurs mouvements de piston de la seringue.

❑ Elution :

Un gradient d'élution est réalisé entre 0 et 17 minutes comme indiqué ci-dessous :

Temps (min)	% A	% B	Débit (ml / min)
0	100	0	0,45
17	40	60	0,45
18	0	100	0,45
24	0	100	0,45
25	100	0	0,45

❑ Détection :

Condition A : Acides aminés primaires
Longueur d'onde de détection 338 nm
Longueur d'onde de référence 390 nm
Condition B : Acides aminés secondaires
Longueur d'onde de détection 262 nm
Longueur d'onde de référence 324 nm

La durée totale de l'analyse (dérivatisation + élution + stabilisation) est de 35 minutes. Un chromatogramme est présenté Figure n°II.3.

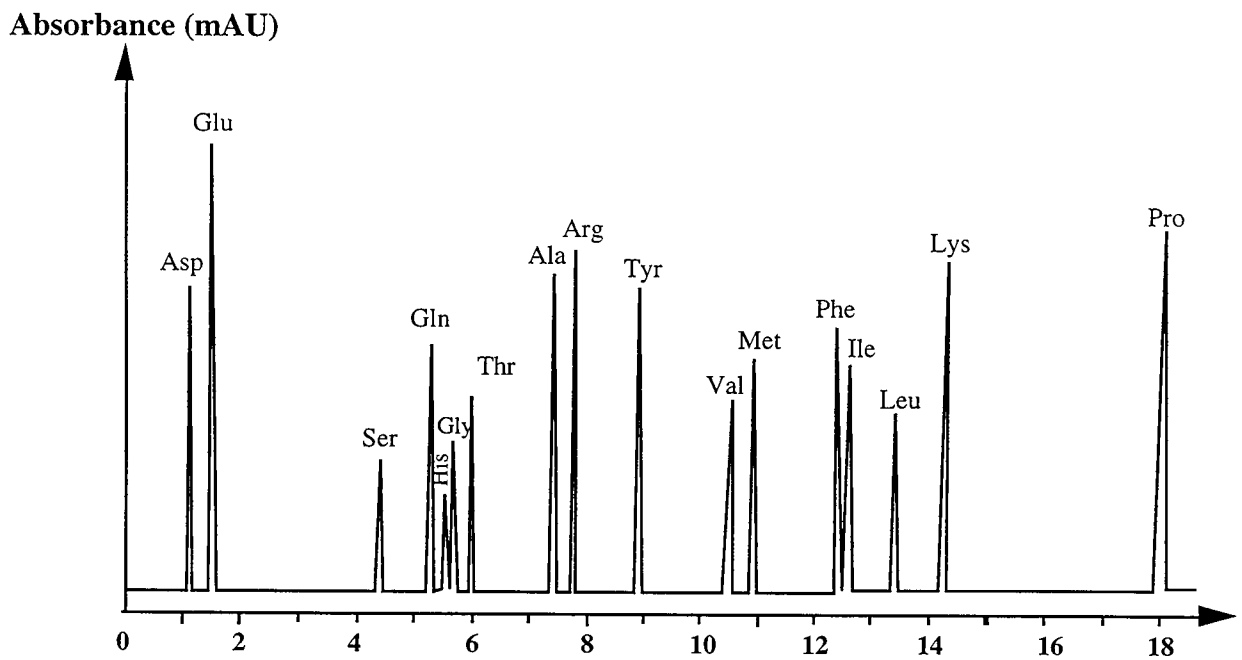


Figure n°II.3 : Aminogramme type

IV.6. Dosage du tréhalose

Le dosage du tréhalose est réalisé par une méthode enzymatique développée par Wojcik (1992). Le tréhalose, en présence d'une tréhalase, est transformé en 2 molécules de glucose. Le glucose est alors dosé par l'intermédiaire d'un kit enzymatique (Sigma 510-A).

❑ Matériel :

Tampon phosphate disodique 120 mM - citrate 40 mM : pH 5,7
Solution de tréhalase de rein de porc (Sigma T-8778) à 3.10^{-4} U/µl
Kit enzymatique de dosage du glucose (Sigma 510 - A)
Photomètre 8 canaux Titertek Multiskan MCC/340

❑ Procédure :

Pour chaque échantillon, 2 tubes sont préparés : l'un pour le dosage du glucose contaminant, l'autre pour le dosage du tréhalose.

	Glucose contaminant	Tréhalose
Echantillon	25 µl	25 µl
Tampon	25 µl	23 µl
Tréhalase		2 µl

La réaction se déroule à 37°C pendant 1 heure. Elle est ensuite arrêtée en plongeant les tubes dans un bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. Le glucose dans les échantillons est alors dosé par la méthode enzymatique au GOD-POD selon les spécifications décrites dans le kit Sigma (Une capsule de GOD-POD est ici dissoute dans 48,4 ml d'eau au lieu de 98,4 ml comme indiqué). Une gamme étalon en tréhalose est réalisée entre 0 à 2 g/l

IV.7. Dosage des acides organiques, alcools et sucres

Le dosage est réalisé sur une chaine CLHP Millipore Waters 712. L'utilisation de 2 détecteurs permet la détection d'un plus grand nombre de composés retenus par la colonne. En effet, les sucres et alcools présentent une faible absorption en UV mais une réponse importante en réfractométrie. Les chromatogrammes sont présentés Figure n°II.4. Les conditions expérimentales sont présentées ci-dessous :

❑ Colonnes :

Précolonne
Colonne Brownlee Polypore H placée dans un four thermostaté à 65°C.

❑ Elution :

Injection de 25 µl d'échantillon
Elution avec une solution d'acide sulfurique 0,02 M à un débit fixe de 0,6 ml/mn.

❑ Détecteurs :

Un réfractomètre et un détecteur UV

La durée totale de l'analyse est de 18 minutes.

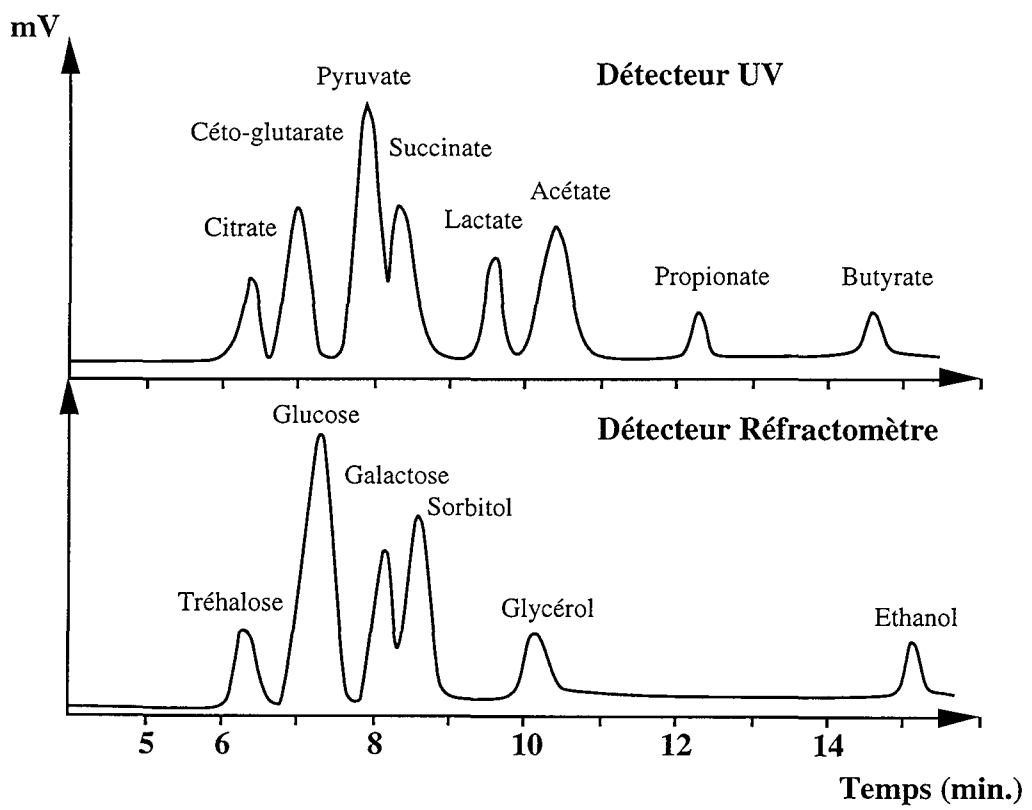


Figure n°II.4 : Chromatogrammes types des acides organiques et sucres

IV.8. Dosage de la bétaïne

Le dosage est réalisé sur une chaine CLHP Waters 712 WISP.

❑ Colonnes :

Précolonne Waters Carbo^{TM} Sentry
Colonne Waters Carbohydrate Column (4.6 x 250 mm ; 60 Å ; 4 µm) placée dans un four thermostaté à 35°C.

❑ Elution :

Injection de 10 µl d'échantillon
Elution avec une solution Acétonitrile/Eau (75/25, v/v) à un débit fixe de 1,4 ml/mn.

❑ Détecteurs :

Un réfractomètre 410 Waters

La bétaïne est détectée au bout de 5,3 minutes.

IV.9. Dosage des protéines

La méthode de Lowry a été choisie pour déterminer la quantité totale de protéines présentes dans les extraits cellulaires bruts issus de la lyse des cellules et destinés au dosage d'enzyme. Cette technique associe la réaction de Biuret caractérisant la présence de liaisons peptidiques et une réaction colorée des phénols avec le réactif phosphotungstomolybdique de Folin et Ciocalteu.

❑ Réactifs :

solution A	Na_2CO_3	2 g
	tartrate de Na, K	0,02 g
	NaOH	100 ml
solution B	$CuSO_4$, 5 H_2O	0,5 g
	H_2SO_4	1 goutte
	eau distillée	100 ml
solution C	solution A	50 ml
	solution B	1 ml

❑ Procédure :

Cette méthode est utilisable pour des concentrations en protéines comprises entre 0,01 et 0,1 g/l. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution d'albumine bovine. 1 ml de la solution à doser est mélangé avec 3 ml de solution C. Le tout est agité et laissé reposer 10 minutes à l'obscurité. 0,3 ml de réactif de Folin et Ciocalteu sont ensuite ajoutés. Après agitation immédiate, l'ensemble est remis à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture s'effectue alors à 540 nm.

IV.10. Dosage d'enzymes intracellulaires

IV.10.1. Obtention des extraits cellulaires bruts

La séparation cellules-milieu s'effectue par centrifugation à 7000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est récupéré et resuspendu dans un tampon phosphate de manière à obtenir une concentration cellulaire de 5 g/l. La composition de ce tampon est la suivante :

KCl	0,2 g/l
KH_2PO_4	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
Na_2HPO_4, 7 H_2O	2,16 g/l

La lyse des cellules est effectuée par broyage mécanique (Broyeur Braun Kobold). Lors du broyage mécanique les bactéries sont lysées en raison des importantes forces de frottement dues aux billes ajoutées à la solution bactérienne et aux vibrations auxquelles l'ensemble est soumis.

Le broyage est réalisé avec des billes de verre de 0,1 à 0,11 mm de diamètre en quantité telle que leur poids soit égal à celui de la solution à broyer. Le broyage se fait par cycles de 30 secondes pour une durée totale de 10 minutes. En raison de l'échauffement du flacon contenant la solution provoqué par les forces de frottement, une réfrigération est assurée par la détente de CO_2.

Le pourcentage de lyse obtenu par cette technique, de l'ordre de 98%, est supérieur à celui que l'on obtient généralement avec la sonication qui sont de l'ordre de 30 à 50% (Delaunay, 1995). Avec une concentration cellulaire de 5 g/l, cette méthode de broyage permet d'atteindre des concentrations en protéines de l'ordre de 1 g/l ce qui est tout à fait suffisant pour les dosages enzymatiques effectués.

IV.10.2. Dosages enzymatiques

Toutes les activités enzymatiques données seront des activités enzymatiques spécifiques. Elles s'expriment en quantité molaire ou pondérale de substrat disparu ou de produit apparu par unité de temps et de poids en protéines. L'activité mesurée est l'activité initiale de l'enzyme car ce n'est que dans ces conditions que l'on est sûr de l'absence de produits de la réaction qui par la suite peuvent influer sur l'activité enzymatique.

De manière à prendre en compte une éventuelle activité parasite qui fausserait les mesures, chaque dosage est réalisé dans deux essais parallèles. Le premier est réalisé normalement pour déterminer l'activité enzymatique recherchée, le second est effectué en absence du substrat de l'enzyme dosée afin de quantifier toute activité parasite. L'activité enzymatique est alors corrigée par différence entre les essais.

IV.10.2.1. Dosage de la glutamate deshydrogénase (gdh)

❑ Réactifs :

tampon Bis-Tris, pH 7,4	50 mM
NH_4Cl	40 mM
α-cétoglutarate	5 mM
$NADPH_2$	0,25 mM

+ 0,1 mg de protéines (extrait cellulaire)

❑ Procédure :

La réaction est déclenchée par l'ajout de $NADPH_2$. La disparition du $NADPH_2$ est suivie au spectrophotomètre (Multiskan MCC/340) à 340 nm.Une mesure d'absorbance est réalisée toutes les 30 secondes pendant 4 minutes. L'activité spécifique de la GDH est exprimée en µmoles de $NADP^+$ formées par minute et par milligramme de protéine.

IV.10.2.2. Dosage de la glutamate synthase ou glutamine amide 2 oxoglutarate transférase (gogat)

❑ Réactifs :

tampon Bis-Tris, pH 7,4	50 mM
glutamine	40 mM
α-cétoglutarate	5 mM
$NADPH_2$	0,25 mM

+ 0,5 mg de protéines (extrait cellulaire)

❑ Procédure :

La procédure est identique à celle suivie pour la gdh. L'activité spécifique de la gogat est exprimée en µmoles de $NADP^+$ formées par minute et par milligramme de protéine.

IV.10.2.3. Dosage de l'aspartate transaminase

Ce dosage est réalisé grâce à un kit enzymatique (Sigma n°DG158-UV).

❑ Réactifs :

Réactif A	tampon phosphate, pH 7,4	80 mM
	L-aspartate	200mM
	NADH	0,18 mM
	LDH	1,2 KU/l
	MDH	0,6 KU/l
Réactif B	α-cétoglutarate	12 mM
	+ 0,5 mg de protéines (extrait cellulaire)	

❑ Procédure :

Ce dosage associe 2 réactions enzymatiques : la première catalysée par l'aspartate transaminase et la seconde par la malate déshydrogénase.

$$\alpha\text{-cétoglutarate} + \text{L-aspartate} \leftrightarrow \text{L-glutamate} + \text{oxaloacétate}$$

$$\text{oxaloacétate} + \text{NADH} + H^+ \leftrightarrow \text{L-malate} + NAD^+$$

La réaction est déclenchée par l'ajout de l'extrait cellulaire. On dose ensuite la disparition du $NADH_2$ au spectrophotomètre à 340 nm. Une mesure d'absorbance est réalisée toutes les 10 secondes pendant 2 minutes. L'activité spécifique de l'aspartate transaminase est exprimée en µmoles de NAD^+ formées par minute et par milligramme de protéine.

IV.11. Mesure de la pression osmotique du milieu

La pression osmotique des solutions est mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre (Roebling). L'osmomètre détermine le point de congélation des solutions aqueuses. L'abaissement du point de congélation par rapport à l'eau distillée donne une mesure directe de la concentration osmolaire. L'eau pure se solidifie à 0°C; une solution aqueuse avec une osmolalité de 1 osmole par kilo d'eau se solidifie à -1,858°C.

L'échantillon est introduit dans un godet plastique propre. Celui-ci est fixé à la tête de mesure et introduit dans l'enceinte réfrigérée. A une température de surfusion définie, une aiguille froide se déplace automatiquement et plonge dans l'échantillon. La température monte alors jusqu'à ce que l'échantillon atteigne le point de congélation (*cf* Figure n°II.5).

L'eau pure a un plateau de congélation plus long que les solutions aqueuses qui ont un point d'inflexion de quelques secondes seulement.

Comme l'osmolalité et le point de congélation sont directement reliés entre eux, l'affichage numérique se fait en mosmol.kg^{-1} H_2O.

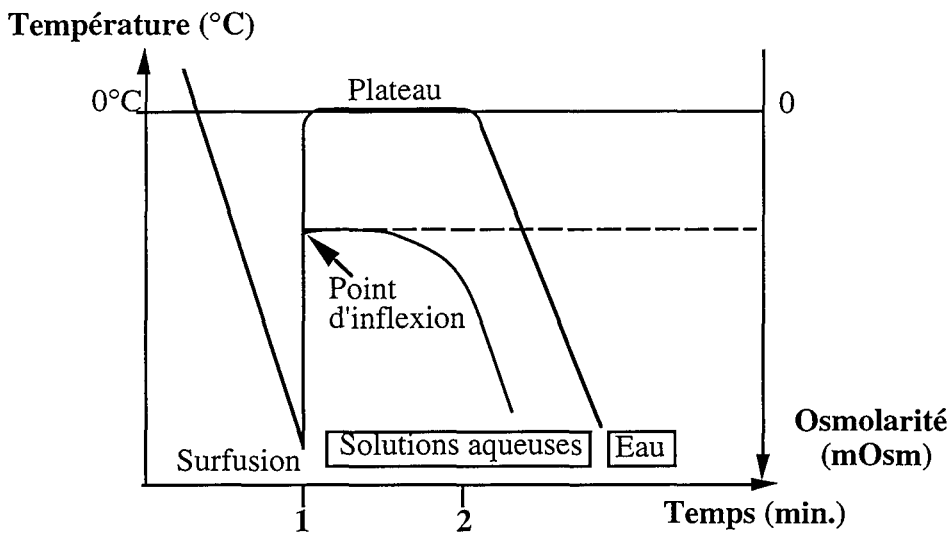


Figure n°II.5 : Courbes typiques de congélation de l'eau et de solutions aqueuses

V. Méthode d'extraction des métabolites intracellulaires

V.1. Analyse bibliographique

Toutes les méthodes recensées dans la littérature sont basées sur le même principe. Une première étape de récupération et de concentration des cellules est nécessaire pour que les extraits cellulaires entrent dans la gamme de sensibilité des techniques d'analyse. Cette étape est suivie d'une étape de blocage du métabolisme cellulaire et d'extraction des métabolites. Elle représente le point critique des méthodes d'extraction. En effet le blocage du métabolisme cellulaire doit être suffisamment rapide afin de limiter toute évolution des concentrations intracellulaires en cours d'extraction.

Une méthode d'extraction et de dosage des métabolites intracellulaires doit être jugée selon trois critères :

- ❑ l'efficacité de l'extraction
- ❑ l'évolution du contenu cellulaire au cours des manipulations *ex situ*
- ❑ la reproductibilité de la méthode

Les techniques recensées diffèrent par leur mode de récupération et de concentration des cellules et par l'agent dénaturant utilisé.
On peut citer trois modes de récupération et de concentration des cellules différents :

- ❑ la filtration
- ❑ la centrifugation
- ❑ la centrifugation multicouche

Différents agents perméabilisants peuvent être utilisés au cours des étapes de blocage et d'extraction des métabolites intracellulaires. On peut citer l'acide perchlorique, l'acide nitrique, le diméthyl sulfoxyde, l'acide trichloroacétique, l'éthanol. L'utilisation d'acides ou de bases comme agent lysant nécessite une étape supplémentaire de neutralisation de l'extrait cellulaire.

On peut également obtenir une extraction des métabolites intracellulaires à l'aide de traitements physiques tels que les ultrasons, les chocs hypoosmotiques et thermiques (eau glacée, eau bouillante, congélation).

V.2. Mode de prélèvement et de concentration des cellules

Les échantilons prélevés subissent une première étape de récupération et de concentration des cellules. Les cellules après concentration sont traitées le plus rapidement possible pour extraire les composés intracellulaires (*cf* Figure n°II.6).

V.2.1. Centrifugation

Un volume de moût de fermentation de densité optique connue est centrifugé à 0°C. La centrifugation s'effectue par une montée-descente à 7000 g sur une centrifugeuse (Jouan MR 14-11). L'ensemble des opérations de prélèvement et de centrifugation dure de 1 à 2 minutes.

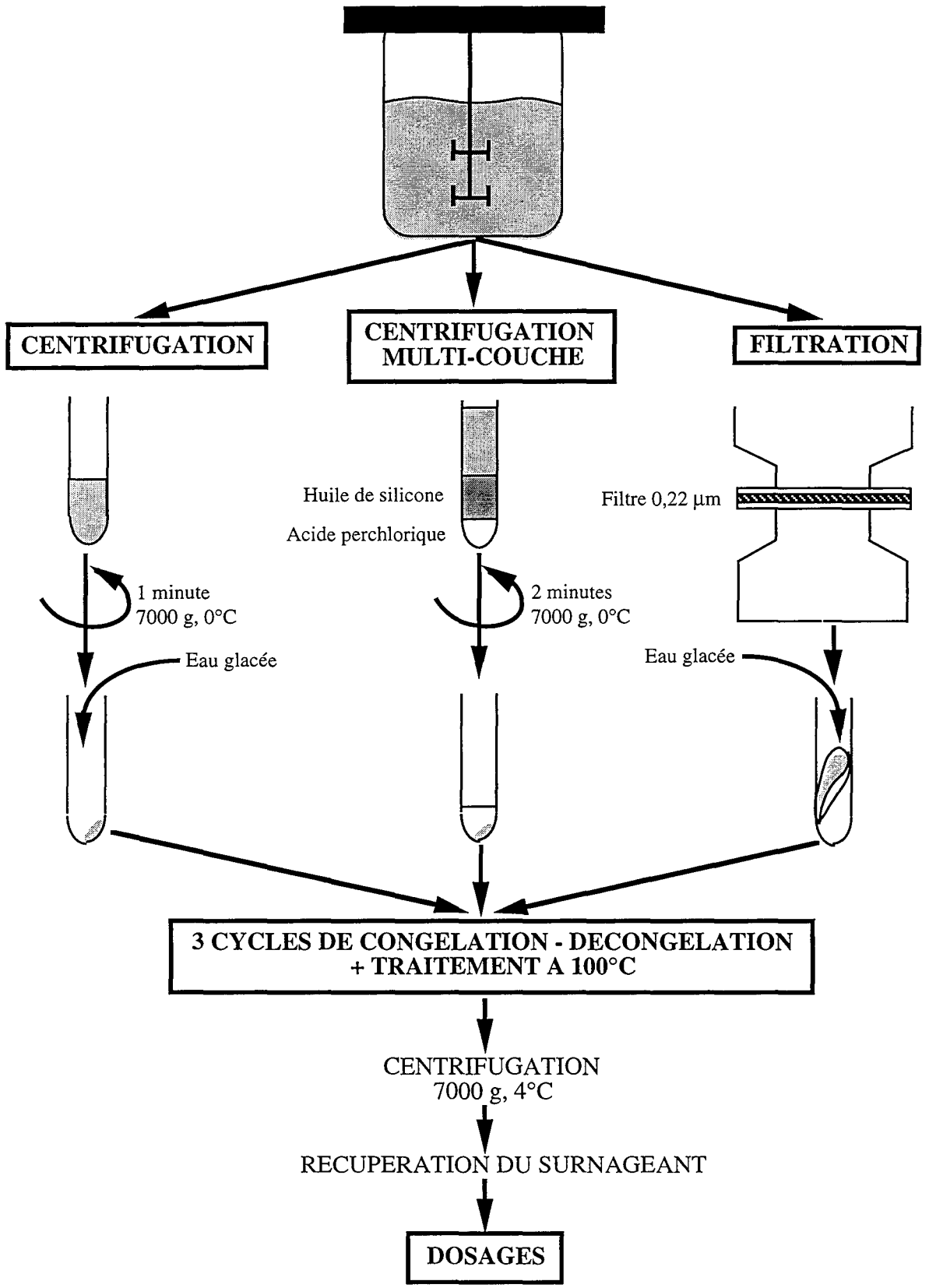


Figure n°II.6 : Protocoles d'extraction des métabolites intracellulaires

V.2.2. Centrifugation multicouche

Dans des tubes de 7 ml, 3 ml d'huile de silicone (Merck 7742, densité = 1,04) sont déposés à la surface de 1,5 ml d'acide perchlorique 20 % (densité = 1,1). Sur la couche de silicone, un volume de moût de fermentation de densité optique connue est déposé. Les tubes sont ensuite centrifugés 2 minutes à 7000 g à 0°C.

V.2.3. Filtration

Un volume de moût de fermentation de densité optique connue est filtré par aspiration au travers d'une membrane filtrante (Gellman Sciences) de porosité 0,22 µm. La membrane avec son gateau de filtration peut être lavée par une solution tampon et récupérée en quelques secondes.

V.2.4. Système de prélèvement et de blocage rapide des échantillons

Un système de prélèvement et de blocage rapide a été mis au point sur la base de celui décrit par Theobald et *al.* (1995). Il permet de prélever un échantillon et de le bloquer à l'acide perchlorique en quelques dixièmes de secondes.

Une aiguille hypodermique est reliée à l'intérieur du fermenteur par un capillaire CLHP (Ø interne : 1 mm) et une vanne stérilisable de type Luer Lock (Ø interne : 1 mm) (*cf* Figure n°II.7). Le volume mort de ce système est de 100 µl ce qui est négligeable par rapport au volume de milieu prélevé (5 ml). Un tube à essai sous vide et fermé hermétiquement contenant de l'acide perchlorique concentré permet de prélever et de bloquer les échantillons rapidement. Le temps nécessaire à l'échantillon pour passer du fermenteur à l'acide perchlorique a été estimé à partir de mesures du débit d'écoulement. Ce temps est inférieur à 0,1 seconde. Le temps nécessaire à l'acide perchlorique pour pénétrer les cellules et bloquer le métabolisme en inactivant les enzymes a été estimée à 0,15 secondes (Theobald et *al.*, 1995). Le temps total de blocage des échantillons par notre système est donc de l'ordre de 0,2 seconde.
Pour maintenir la stérilité du système, l'aiguille est placée entre chaque utilisation dans un tube scellé contenant de l'éthanol.

L'extraction des métabolites intracellulaires est ensuite réalisée par une succession 3 cycles de congélation-décongélation. Les extraits cellulaires sont ensuite neutralisés à la soude puis les métabolites dosés.

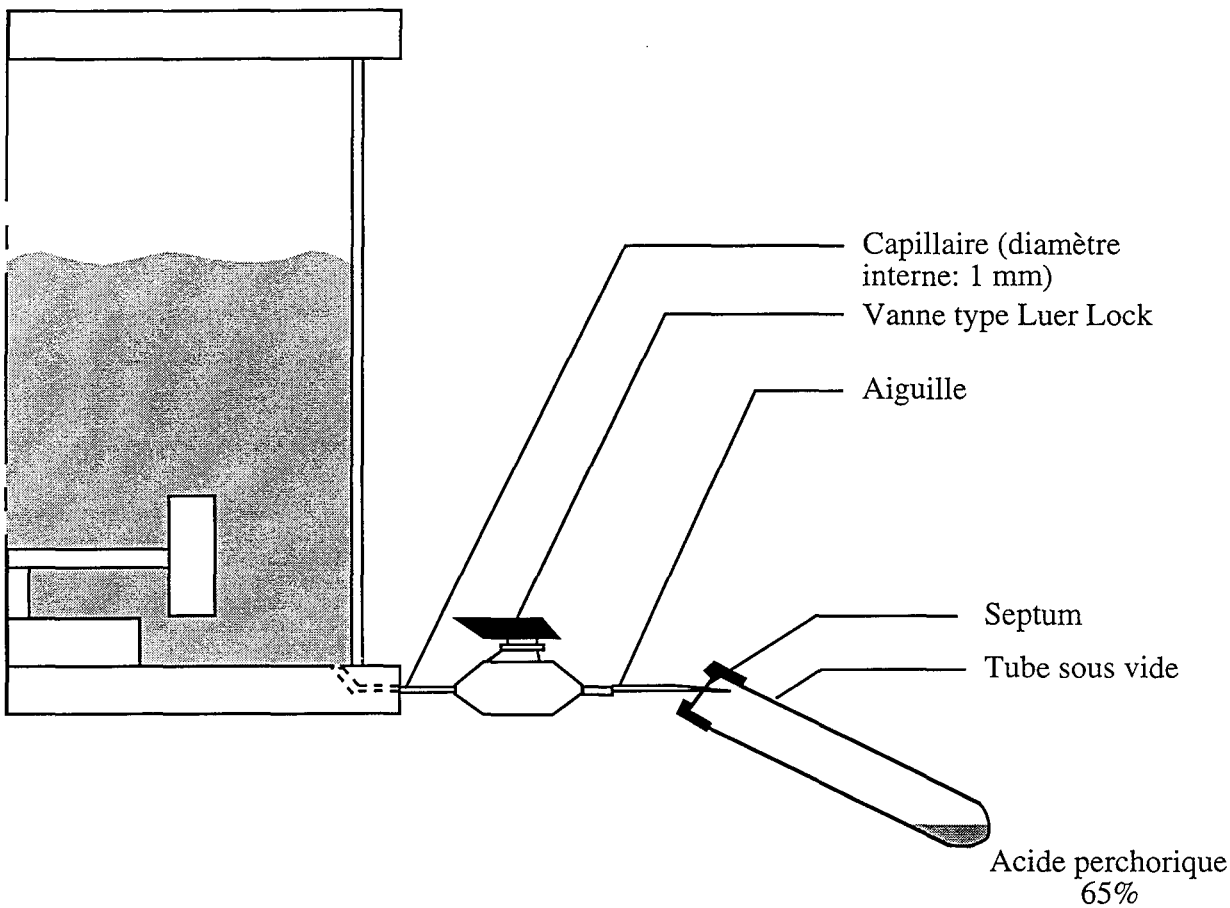


Figure n°II.7 : Système de prélèvement et de blocage rapide des échantillons adapté au fermenteur SGI 2 litres

V.3. Protocoles d'extraction des métabolites intracellulaires

Quelque soit le type d'extraction, le volume d'eau à ajouter est calculé de manière à obtenir une suspension bactérienne de 5 g/l. Cette concentration est, d'après notre étude, optimale pour l'extraction.

V.3.1. Après centrifugation

Après centrifugation, le tube est vidé de son surnageant. Le liquide restant sur les parois et au fond du tube est éliminé en l'absorbant avec du papier filtre sans toucher le culot bactérien. Le culot est ensuite resuspendu et vortexé dans un volume connu d'eau glacée, d'eau bouillante ou d'un agent dénaturant lysant (acide perchlorique 20 %, DMSO). Les tubes traités à l'eau glacée ou avec un agent lysant (après neutralisation, dans le cas de l'acide perchlorique) sont conservés au congélateur à -20°C. Ceux traités à l'eau bouillante sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes puis mis au congélateur.

Les tubes traités à l'eau glacée ou bouillante subissent par la suite trois cycles de décongélation-congélation puis sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Tous les tubes sont alors mis à centrifuger à 0°C à 7000 g pendant 2 minutes. Les surnageants sont ensuite récupérés dans des tubes stériles. Ces extraits cellulaires peuvent alors être analysés ou stockés au congélateur à -20°C.

V.3.2. Après centrifugation multicouche

Pendant la centrifugation, les cellules ayant traversé la couche d'huile se retrouvent directement dans l'acide perchlorique. Après la centrifugation, le surnageant et l'huile sont retirés par aspiration. La suspension bactérienne dans l'acide perchlorique subit alors 3 cycles de décongélation-congélation. Les tubes sont alors centrifugés à 7000 g pendant 2 minutes et le surnageant est récupéré et neutralisé à la soude. Ces extraits cellulaires peuvent alors être analysés ou stockés au congélateur à -20°C.

V.3.3. Après filtration

La membrane filtrante et son gateau sont placés dans un tube contenant un volume connu d'eau glacée, bouillante ou d'un agent lysant (acide perchlorique 20%, acide nitrique 20%). Le tube est vortexé par à-coup afin de décoller le gateau de la membrane. Le filtre est ensuite retiré du tube.

Les suspensions bactériennes dans l'eau subissent trois cycles de congélation-décongélation et un séjour de 15 minutes dans l'eau bouillante.
Les tubes sont ensuite centrifugés à 7000 g pendant 2 minutes et le surnageant est récupéré. Ces extraits cellulaires peuvent alors être analysés ou stockés au congélateur à -20°C.

V.4. Choix et développement de la méthode utilisée dans l'étude

V.4.1. Méthode d'extraction des composés organiques intracellulaires

V.4.1.1. Choix de la technique utilisée

Une étude comparative des différentes méthodes d'extraction décrites précédemment des métabolites organiques intracellulaires a été réalisée.

Cinq techniques d'extraction ont été testées sur une même culture bactérienne réalisée en fiole d'Erlenmeyer sur milieu BMCG-glucose :

- ❑ récupération des cellules par **centrifugation** puis extraction des métabolites dans l'**eau bouillante** pendant 15 minutes
- ❑ récupération des cellules par **centrifugation** puis extraction des métabolites dans l'**eau glacée** pendant 15 minutes
- ❑ récupération des cellules par **centrifugation** puis extraction dans l'eau glacée suivi de 3 cycles de **congélation-décongélation**
- ❑ récupération des cellules par **filtration** puis extraction dans l'eau glacée suivi de 3 cycles de **congélation-décongélation**
- ❑ récupération des cellules par **centrifugation multicouche** puis extraction dans l'**acide perchlorique** suivi de 3 cycles de **congélation-décongélation**

Le glutamate et le tréhalose ont été dosés sur les cinq extraits obtenus (*cf* Tableau n°II.3).

Récupération des cellules	**Extraction**	**Glutamate dosé en µmole/gMS**	**Tréhalose dosé en µmole/gMS**
Centrifugation	Eau glacée	38	20
	Eau bouillante	40	20
	Congélation-Décongélation	40	21
Filtration	Congélation-Décongélation	41	22
Centrifugation multi-couche	$HClO_4$ + Congélation-Décongélation	37	19

Tableau n° II.3 : Quantités de glutamate et tréhalose récupérées au cours des protocoles d'extraction différant par le mode de récupération et d'extraction.

Pour l'étape de récupération et concentration des cellules, la centrifugation ou la filtration ont été gardées du fait de leur simplicité de mise en oeuvre. Pour l'extraction des métabolites, la méthode de congélation-décongélation a été retenue car elle ne nécessite pas notamment de post-traitement de l'extrait cellulaire (étape de neutralisation après utilisation de l'acide perchlorique). Dans ce type de méthode il est en effet important de réduire le nombre d'étapes afin de limiter les risques d'erreur.

La technique de centrifugation multicouche reste particulièrement intéressante dans le cas où les composés intracellulaires à doser sont présents en quantité non négligeable dans le milieu externe.

Dans un second temps, une étude d'optimisation de la technique choisie a été réalisée. L'optimisation passe par la quantification de 2 paramètres :

- ❑ l'efficacité de l'extraction sur les métabolites recherchés
- ❑ les risques d'évolution du contenu intracellulaire en cours d'extraction

V.4.1.2. Efficacité de l'extraction

Dans un premier temps, nous avons essayé d'optimiser le rendement d'extraction en jouant sur le rapport (Biomasse prélevée/Volume d'eau de resuspension). Ainsi, sur une même culture bactérienne, des aliquotes identiques ont été prélevés au même instant, puis centrifugés à froid pendant 1 minute à 7000 g. Les culots bactériens sont ensuite resuspendus dans un volume déterminé d'eau glacée afin d'atteindre le rapport (Biomasse prélevée/Volume d'eau de resuspension) désiré. Les tubes subissent ensuite trois cycles de congélation-décongélation. L'acide glutamique et le tréhalose ont été dosés sur chaque extrait (*cf* Figure n°II.8).

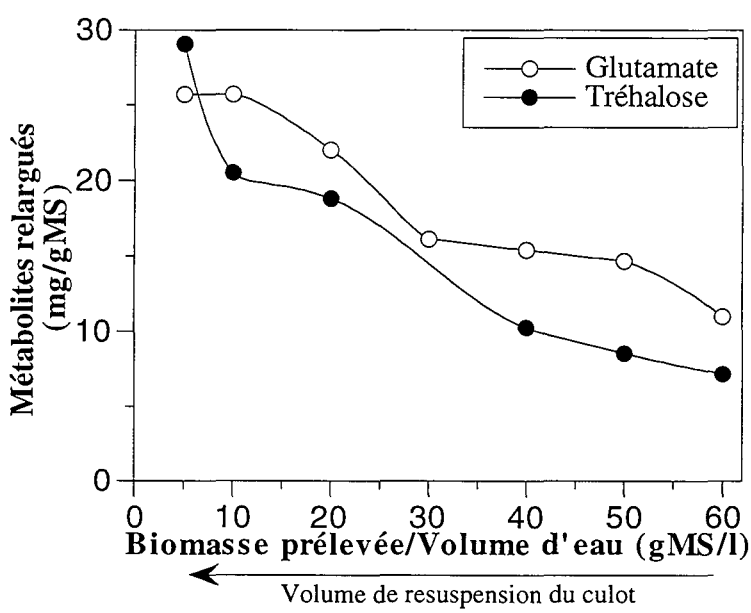


Figure n°II.8 : Influence du rapport (Biomasse prélevée / Volume de resuspension) sur l'extraction des métabolites organiques.

Le meilleur rendement d'extraction est obtenu autour des 5 gMS/l. Tsapis et Kepes (1977) ont montré que le facteur important pour ce type d'extraction basé sur un choc hypoosmotique et

hypothermique n'est pas l'osmolalité de l'échantillon mais plutôt la différence d'osmolalité au moment du choc. Ceci expliquerait en partie le meilleur rendement d'extraction pour les suspensions bactériennes fortement diluées (5 g/l) ; l'apport d'eau étant plus important, la différence d'osmolalité au moment du choc est également plus importante.

Dans un second temps, nous avons essayé de quantifier l'efficacité de l'extraction des métabolites par cette méthode. Une première extraction a alors été réalisée dans les conditions optimales. Après décongélation et centrifugation, le surnageant est récupéré pour les dosages des métabolites et le culot bactérien est repris à nouveau dans un volume d'eau glacée puis subit le même traitement que précédemment. Les résultats sont résumés dans le tableau n°II.4.

Quantités relarguées (mg/gMS)	Osmolalité des cultures (osmol.kg^{-1})		
	0,4	1,2	2,2
1ère extraction	**35** 25	**44** 50	**30** 55
2ème extraction	**1,5** 0	**2** 0	**1,5** 1
Efficacité de la 1ère extraction	**96%** 100%	**96%** 100%	**95%** 98%

Tableau n°II.4 : Quantités de glutamate (caractère **gras**) et de tréhalose (caractère normal) relarguées lors de 2 extractions successives réalisées sur 3 cultures d'osmolalité différente.

V.4.1.3. Evolution du contenu cellulaire

Lors des protocoles d'extraction des métabolites intracellulaires, les risques d'évolution du contenu cellulaire entre le prélèvement et le dosage peuvent être importants. Cette évolution dépend du métabolite concerné. Ainsi, Weibel *et al.* (1974) ont montré que le pool d'ATP disparaissait totalement en 1,5 secondes lorsque les levures sont placées en anaérobiose. Saez et Lagunas (1976) ont observé une diminution de 70% du pool cellulaire en pyruvate au bout de 30 secondes chez la levure, tandis que le pool de glutamate évolue très peu avec le temps de blocage.

Cette évolution des pools intracellulaires a lieu avant la phase d'extraction donc pendant la phase de récupération et de concentration des cellules, dans notre cas pendant la centrifugation. Le maximum de précautions a été pris pour minimiser ces risques. Notamment, à partir du prélèvement, toutes les étapes sont réalisées au froid afin de ralentir le métabolisme bactérien et dans du matériel stérile pour éviter toute contamination étrangère. Nous avons malgré tout voulu quantifier le risque d'évolution du contenu cellulaire en glutamate et tréhalose au cours de la phase

de concentration des cellules. Pour cela, des aliquotes, provenant de la même culture et prélevés au même instant, ont été centrifugés pendant 1, 2, 5, 10 et 20 minutes à 7000 g. L'acide glutamique et le tréhalose ont été dosés dans les extraits cellulaires obtenus après congélation-décongélation (*cf* Figure n°II.9). Les résultats montrent une absence d'évolution des pools en glutamate et tréhalose entre 1 et 10 minutes de centrifugation.

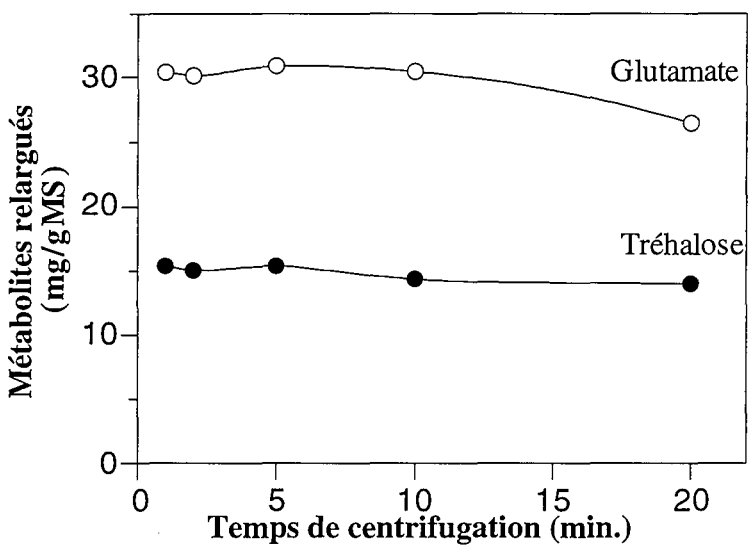


Figure n°II.9 : Effet du temps de centrifugation sur l'extraction des métabolites organiques intracellulaires.

Dans le but de vérifier toute éventuelle évolution des pools intracellulaires pendant la première minute du prélèvement, nous avons utilisé un système de blocage rapide d'échantillon Les échantillons ont été bloqués avec de l'acide perchlorique dans la seconde qui suit le prélèvement, 30 secondes, 1, 2 et 5 minutes après. L'acide glutamique et le tréhalose ont été dosés dans les extraits cellulaires obtenus après congélation-décongélation (*cf* Figure n°II.10). Les résultats obtenus ne montrent pas de variation significative (<15%) des pools intracellulaires en acide glutamique et tréhalose avec le temps de blocage des échantillons.

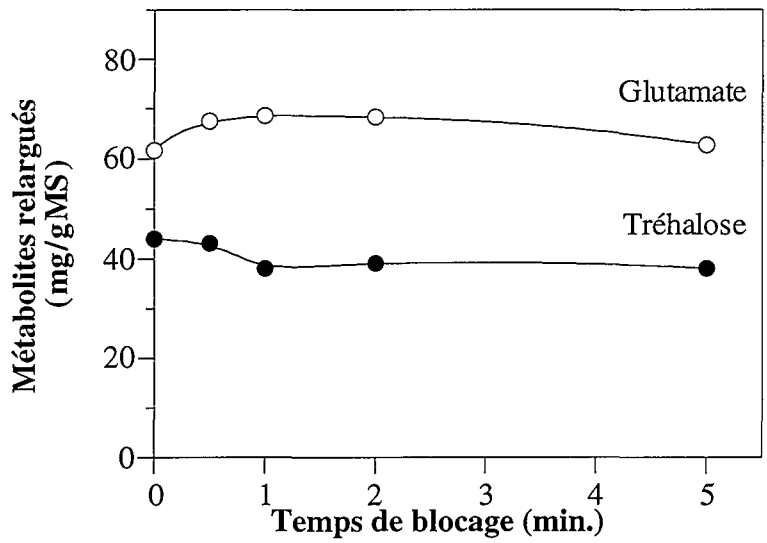


Figure n°II.10 : Effet du temps de blocage des échantillons sur l'extraction des métabolites organiques intracellulaires.

V.4.1.4. Reproductibilité de la méthode

Dans le but de quantifier la reproductibilité des dosages des métabolites intracellulaires extraits par la méthode de congélation/décongélation, une étude statistique a été réalisée sur plusieurs cultures. A partir d'une même culture bactérienne, cinq échantillons ont été prélevés au même instant. La méthode d'extraction est réalisée sur chaque échantillon simultanément et les dosages d'acides aminés (par CLHP) et de tréhalose ont été réalisés. Ainsi les écarts obtenus entre les différents extraits traduisent l'accumulation d'erreurs sur l'ensemble des différentes étapes de la technique. Les résultats sur une culture représentative sont présentés Tableau n°II.5.

	Métabolites extraits (mg/gMS)		
	Acide glutamique	Proline	Tréhalose
Pool cellulaire	44 ± 6,5	44 ± 2	65 ± 9
Variation (%)	15%	5%	13%

Tableau n°II.5 : Quantités d'acide glutamique, de proline et de tréhalose extraits par la technique de congélation/décongélation. *Les pools cellulaires sont présentés avec leur intervalle de confiance à 95% calculé avec 5 déterminations indépendantes*.

V.4.2. Méthode d'extraction des cations intracellulaires

Le dosage des cations intracellulaires est plus délicat du fait de leur présence en grande quantité dans le milieu de culture. Les risques de contamination de l'extrait cellulaire par le milieu extérieur sont alors très important. Un lavage des cellules s'avère, dans ce cas, nécessaire. Il est réalisé grâce à un tampon de pH 7,3 isotonique, glacé et dépourvu des cations recherchés. Le mode de concentration choisi est la filtration car elle permet un lavage rapide des cellules ; le temps de séjour du tampon au contact des cellules est très court et limite donc le relargage des ions cellulaires vers le tampon dû au phénomène d'équilibre de part et d'autre des membranes bactériennes.

Différents modes d'extraction ont été testés (acide perchlorique, acide nitrique, eau glacée, eau bouillante) et ont donné des résultats semblables dans la limite de l'erreur expérimentale qui a été déterminée entre 5 et 10%.

VI. Détermination du contenu en eau libre des cellules

VI.1. Principe de la technique

Cette technique a été mise au point par Larroche *et al.* (1993). Le principe est de déterminer la masse totale d'un culot de centrifugation, de lui soustraire la masse de liquide occupant l'espace interstitiel déterminée par l'intermédiaire d'un marqueur et d'obtenir ainsi la masse humide des bactéries présentes dans le culot. Connaissant la masse de la fraction sèche des bactéries présentes, par différence il est possible d'obtenir la masse de l'eau libre présente dans les cellules. Cette masse d'eau fournit le volume d'eau intracellulaire si la masse volumique est connue.

La méthode de calcul par régression linéaire impose d'effectuer les mesures pour différentes masses de biomasse centrifugée.

Le marqueur d'espace interstitiel utilisé dans cette technique est le thiosulfate de sodium.

VI.2. Mesure de la masse totale des bactéries

Un schéma global du protocole est présenté figure n°II.11. 100 ml de moût de fermentation dense (au moins 2 gMS/l de biomasse) sont prélevés et mis dans un bécher contenant 5 ml de solution concentrée de thiosulfate (400 g/l). Le bécher est placé sous agitation dans un bain glacée pendant 5 minutes. Cette suspension bactérienne est divisée dans 4 tubes de centrifugation de la manière suivante : 10, 20, 30 et 40 ml. Les tubes sont centrifugés à 7000 g et 4°C pendant 2 min.

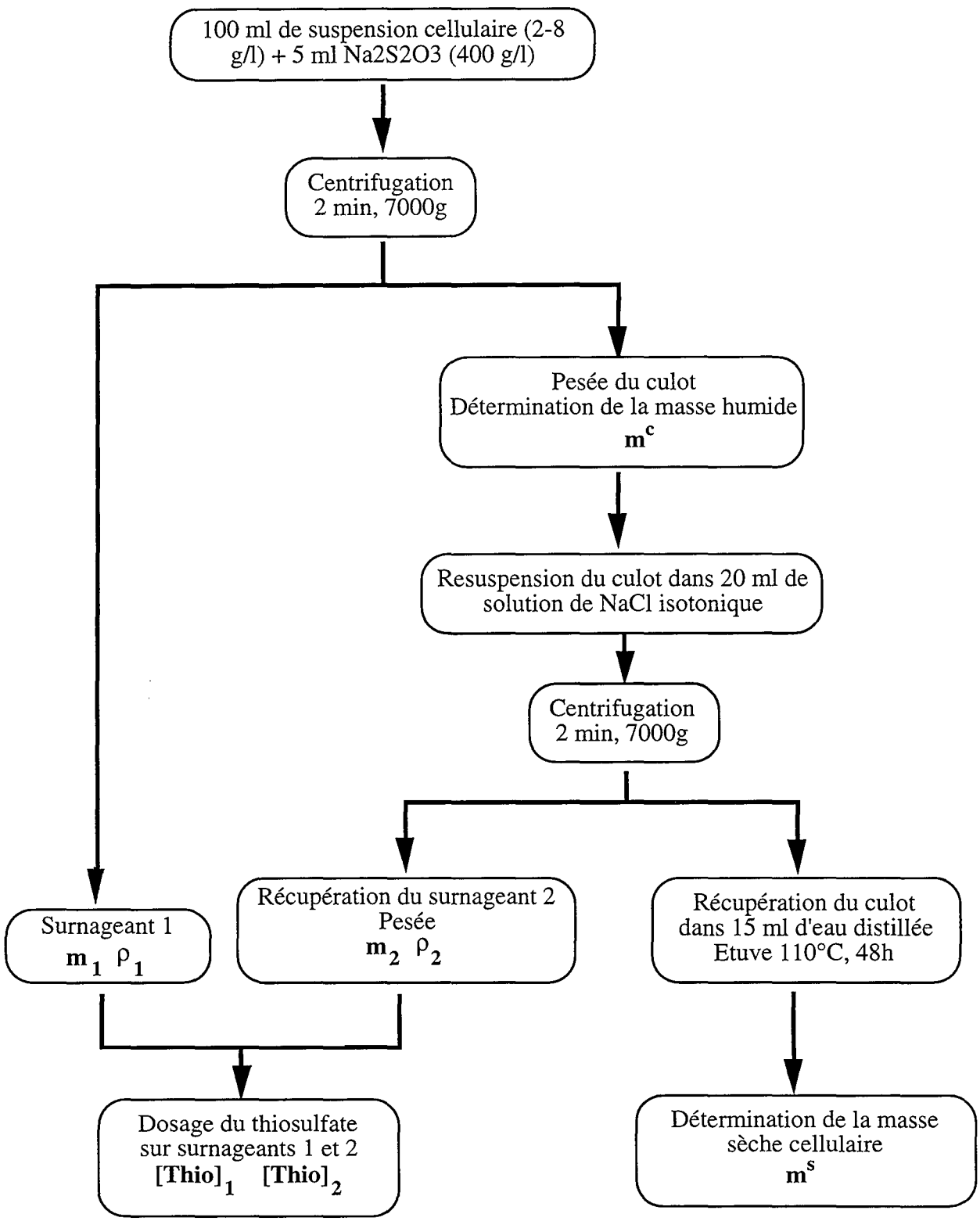


Figure n°II.11 : Protocole de la technique de mesure du contenu en eau des cellules

Les surnageants sont retirés; les parois des tubes sont essuyées avec du papier absorbant sans toucher les culots. Les tubes sont ensuite pesés à la balance de précision (Mettler). Les tubes secs ont été péalablement tarés. Par différence, la masse totale du culot est obtenue et est notée m^c.

VI.3. Mesure de l'espace interstitiel

Le marqueur de l'espace interstitiel utilisé est le thiosulfate de sodium décrit comme non pénétrant dans les cellules (Larroche *et al.*, 1993). La concentration dans la suspension bactérienne $[Thio]_1$ est de 20 g/l.

Le culot obtenu précédemment est lavé par 20 ml de solution de NaCl isotonique. L'ensemble est vortexé jusqu'à remise en suspension totale du culot. Le tube est de nouveau centrifugé à 7000 g à 4°C pendant 2 minutes. Le surnageant est conservé pour déterminer sa concentration en thiosulfate notée $[Thio]_2$. La masse volumique (ρ_2) et la masse (m_2) du surnageant sont mesurées.

Le culot bactérien est remis en suspension dans de l'eau distillée et placée dans une coupelle en aluminium, préalablement tarée, à 110°C pendant 48 heures pour déterminer la masse sèche des bactéries notée m^S, en tenant compte de la masse de NaCl apporté avec le liquide interstitiel (*cf* §IV.1). A la température de 110°C, seule l'eau libre des cellules est évaporée.

VI.4. Dosage du thiosulfate

Le thiosulfate est réduit par une solution d'iode :

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

En ajoutant quelques gouttes d'une solution d'amidon à l'échantillon, on peut visualiser la fin de la réaction. En effet l'iode en excès se complexe avec l'amidon et forme une coloration bleue.

Un volume ($V^{éch}$) d'échantillon est dosé par une solution d'iode jusqu'à apparition de la coloration bleue (ajout de quelques gouttes d'une solution d'amylose à 40 g/l). V_{I_2} est alors le volume d'iode versé. La solution d'iode est auparavant titrée en mesurant le volume d'iode versé $V_{I_2}^{ref}$ pour réduire un volume V_{thio}^{ref} d'une solution de thiosulfate de concentration connue $[Thio]^{ref}$. La concentration en thiosulfate de l'échantillon est alors :

$$[Thio]^{éch} = [Thio]^{ref} . \frac{[Thio]^{ref} . V_{I_2}}{V^{éch} . V_{I_2}^{ref}}$$

Pour doser la concentration $[Thio]_1$, une solution d'iode à environ 10 gI_2/l et 30 gKI/l est préparée ainsi qu'une solution de thiosulfate $[Thio]^{ref}$ à 20 g/l.

Pour doser la concentration $[Thio]_2$, la solution d'iode précédente est diluée 100 fois et une solution de thiosulfate $[Thio]^{ref}$ à 0,1 g/l est préparée.

VI.5. Calcul du volume interstitiel et du contenu en eau des cellules

VI.5.1. Calcul point par point

❑ Volume interstitiel du culot bactérien

$$Ve = \frac{m_2 . [Thio]_2}{\rho_2 . [Thio]_1}$$

Ve : volume interstitiel du culot (ml)
m_2 : masse du surnageant 2 (g)
$[Thio]_2$: [thiosulfate] du surnageant 2 (g/ml)
ρ_2 : masse volumique du surnageant 2 (g/ml)
$[Thio]_1$: [thiosulfate] du surnageant 1 (g/ml)

❑ Masse du liquide interstitiel

$$m^e = \rho_1 . Ve$$

m^e : masse du liquide interstitiel (g)
Ve : volume interstitiel (ml)
ρ_1 : masse volumique du surnageant 1 (g/ml)

❑ Masse de cellules humides

$$m^h = m^c - m^e$$

m^h : masse des cellules humides (g)
m^c : masse du culot de centrifugation humide (g)
m^e : masse du liquide interstitiel (g)

❑ Contenu en eau libre des cellules

$$m_{eau}{}^h = \frac{m^h - m^s}{m^h}$$

$m_{eau}{}^h$: contenu d'eau de la cellule (g eau/g MH)
m^h : masse des cellules humides (g MH)
m^s : masse des cellules sèches (g MS)

$$m_{eau}{}^s = \frac{m^h - m^s}{m^s}$$

$m_{eau}{}^s$: contenu d'eau de la cellule (g eau/g MS

VI.5.2. Calcul par régression linéaire

Pour s'affranchir de la dépendance de la détermination de la matière sèche par rapport à la détermination de la masse humide totale et de la masse d'eau interstitielle, les deux derniers paramètres sont représentés en fonction du premier, c'est à dire de la matière sèche. Un modèle linéaire de forme y = ax + b traduit l'évolution de ces paramètres en fonction de l'évolution de la masse de biomasse sèche (*cf* Figure n°II.12) :

$$m^c = a.m^s + b \qquad \text{et} \qquad me = a'.m^s + b'$$

Le contenu d'eau des cellules est :

$$m_{eau}{}^{h} = \frac{m^{h} - m^{s}}{m^{s}} = 1 - \frac{m^{s}}{m^{h}}$$

$$m_{eau}{}^{h} = 1 - \frac{m^{s}}{(m^{c} - b) - (me - b')} = \frac{(a\text{-}a') - 1}{(a\text{-}a')}$$

La différence entre les deux pentes conduit donc au calcul du contenu d'eau libre cellulaire. Cette technique de traitement des résultats a été appliquée dans notre étude.

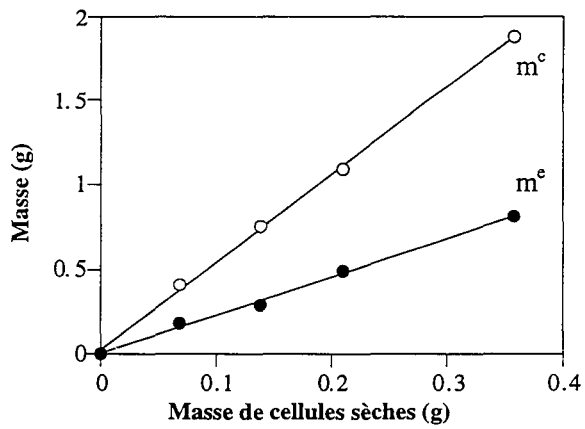


Figure n°II.12 : Evolution de la masse du culot humide (m^c) et de la masse de liquide interstitiel (m^e) en fonction de la masse sèche cellulaire (m^s) chez *Corynebacterium glutamicum* pendant la phase exponentielle de croissance sur milieu BMCG-glucose.

VII. Suivi du volume cellulaire

VII.1. Utilisation du compteur de particules (Coulter counter)

La détermination du volume des cellules d'un échantillon de culture est réalisée à l'aide d'un compteur de particules : le Coulter multisizer II (Luton, England). Un schéma de l'appareil est présenté Figure n°II.13.

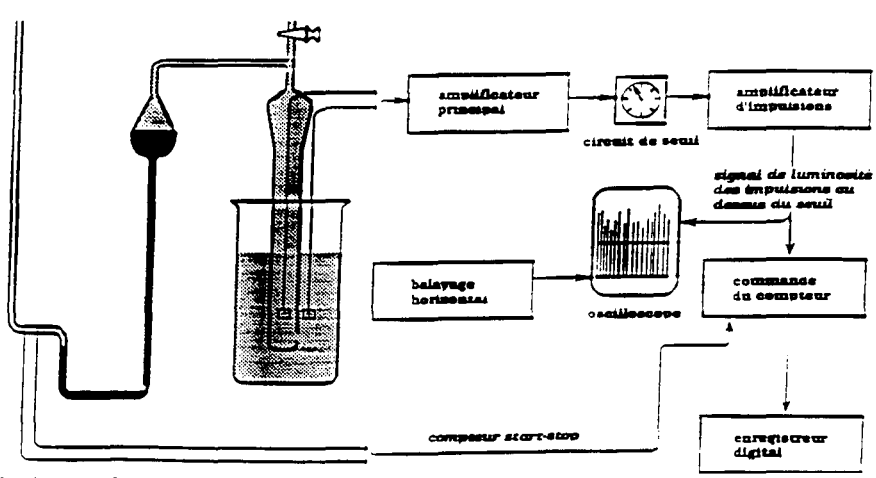


Figure n° II.13 : Schéma de principe du Coulter counter

La suspension bactérienne circule au travers d'une micro-ouverture circulaire. De part et d'autre de cet orifice se trouvent des électrodes en platine alimentées en courant continu. Il existe autour de l'orifice une résistance électrique donnée. Le passage de la suspension de l'extérieur vers l'intérieur est forcé par la création d'un vide partiel en haut du tube. Si une particule passe au travers de l'orifice, elle déplace une partie du volume liquide égale à son propre volume et entraîne ainsi une variation de la résistance. L'intensité du courant étant constante, la variation de résistance engendre une impulsion de tension d'amplitude proportionnelle au volume de la particule. La série d'impulsions est mesurée et comptée.

Les conditions opératoires, retenues pour l'analyse de la suspension bactérienne, sont les suivantes :

- ❑ orifice : pour un orifice donné, la linéarité de la relation entre l'impulsion et le volume de la particule est satisfaisante pour des valeurs de diamètre comprises entre 1,5 et 50% de celui de l'ouverture. L'orifice choisi est de 30 µm.
- ❑ étalonnage : à l'aide de microsphères en latex de 2 µm de diamètre (latex).
- ❑ prélèvements : la suspension bactérienne a été diluée dans une solution saline, préparée selon l'osmolarité désirée, filtrée à 0,22 µm. Une sonication de la suspension est nécessaire pour éviter des passages simultanés de plusieurs bactéries.
- ❑ sonication : la sonication de la suspension est réalisée par une série de 3 cycles de 6 secondes espacés de 1 seconde à une puissance de 150 W. Sonicateur Bioblock CV 501 de 500W. Microsonde de 3 mm de diamètre utilisée pour des volumes de 0,25 à 10 ml.

VII.2. Utilisation d'une méthode spectrophotométrique

En absence de croissance bactérienne, il est possible de suivre l'évolution du volume cellulaire en mesurant la densité optique d'une suspension bactérienne. L'absorbance (A) d'une suspension bactérienne est proportionnelle à l'inverse du volume cellulaire et à l'indice de réfraction (Koch, 1984) par la relation :

$$A \sim \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 . V^{-2/3}$$

n : indice de réfraction du milieu
n_0 : indice de réfraction des bactéries
V : volume des bactéries

Un volume connu (V1) d'une culture bactérienne réalisée sur milieu BMCG à 0,4 Osm est placé dans une cuve de spectrophotomètre et la densité optique DO_0 est lue à 570 nm. Un volume (V2) d'une solution en NaCl concentrée est ajouté dans la cuve afin d'élever l'osmolalité à la valeur désirée. La suspension bactérienne est homogénéisée par bullage d'air entre deux mesures.

La densité optique DO_t est lue toutes les 15 secondes. Pour tenir compte de la dilution et de la variation de l'indice de refraction dues à l'ajout de NaCl, le même volume (V1) de la même culture a été préalablement dilué avec un volume (V2) de solution de Ficoll. Cet ajout de Ficoll permet d'atteindre le même indice de réfraction que celui du milieu avec NaCl mais sans faire varier l'osmolalité du milieu du fait de sa haute masse molaire. La densité optique DO_{Ficoll} de cette suspension est lue à 570 nm.

Les corrections dues à la variation de la densité optique par la dilution et le changement de l'indice de réfraction sont obtenues en ajoutant aux valeurs de D.O. brute la variation de D.O. due au Ficoll :

$$DO = DO_t + (DO_0 - DO_{Ficoll})$$

DO : DO corrigée
DO_t : DO brute après ajout du NaCl
DO_0 : DO initiale
DO_{Ficoll} : DO après ajout du Ficoll

L'inverse de cette valeur corrigée est proportionelle à la surface de la bactérie (Koch, 1984). A partir de l'inverse de la DO corrigée, le volume cellulaire est déterminée de la manière suivante :

$$V = (\frac{1}{DO})^{3/2}$$

VIII. Détermination de la pression osmotique intracellulaire

La technique choisie a été utilisée chez les bactéries par Koch (1984), Whatmore et Reed (1990). La pression osmotique intracellulaire est déterminée en comparant le volume osmotique des cellules où la pression de turgescence a été annulée avec celui des cellules placées dans leur milieu de culture.
Le volume des cellules est déterminé par la méthode décrite au paragraphe précédent.

Un même volume d'une culture bactérienne est placé dans des cuves de spectromètre contenant différentes solutions de NaCl d'osmolarité croissante connue (comprise entre 0,4 et 10 Osm). La densité optique est lue sur chaque cuve 30 secondes après.
Comme décrit au paragraphe ci-dessus, une correction est apportée aux valeurs de densité optique pour tenir compte de la variation de l'indice de réfraction du milieu.

La mesure faite sur la cuve contenant la suspension bactérienne placée dans un milieu de même osmolalité que le milieu de culture sert de référence. Cette mesure ne pouvant pas donner de valeur quantitative sûre, les densités optiques des différentes suspensions seront traduites en pourcentage par rapport au volume des cellules contenues dans la suspension de référence. Les

volumes cellulaires, traduits en pourcentage, sont regroupés sur un graphe en fonction de l'inverse de l'osmolalité des différentes suspensions (cf Figure n° II.14)

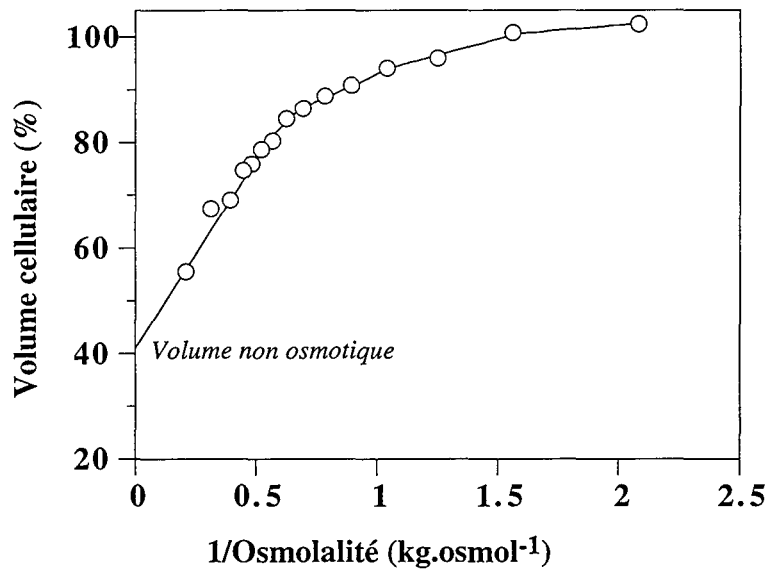


Figure n°II.14 : Détermination de la pression osmotique intracelllulaire : évolution du volume cellulaire en fonction de l'inverse de l'osmolalité des solutions de NaCl

Une augmentation de l'osmolalité entraine une diminution du volume cellulaire. A partir du point d'inflexion, la diminution du volume cellulaire est linéairement liée à l'augmentation de l'osmolarité. Dans cette partie linéaire du graphe, les cellules ont une pression de turgescence nulle ; elles se comportent alors comme un osmomètre parfait c'est à dire : $\Pi int = \Pi ext$

L'intersection à l'origine correspond au volume non osmotique (volume qui ne participe pas aux échanges d'eau : partie de la cellule composée des éléments solides ou insolubles).

Le volume osmotique de la cellule est alors défini comme étant la différence entre son volume à une osmolalité donnée et son volume non osmotique.

❑ Calcul de la pression osmotique intracellulaire

Le calcul est basé sur un bilan de conservation de matière et plus précisément un bilan de conservation des espèces osmolaires. Cela veut dire que quelque soit l'osmolalité de la solution de NaCl, il n'y a aucune perte de métabolites intracellulaires. La pression osmotique intracellulaire est obtenue à partir de la relation suivante :

$$\Pi in_{t(p)} = \frac{\Pi int_{(p=0)} \times VO_{(p=0)}}{VO_{(p)}}$$

$VO_{(p=0)}$: volume osmotique des bactéries ayant $\Delta\Pi=0$

$\Pi int_{(p=0)}$: pression osmotique intracellulaire des bactéries ayant $\Delta\Pi=0$;

$VO_{(p)}$: volume osmotique des bactéries dans leur milieu de culture

$\Pi int_{(p)}$: pression osmotique intracellulairedes bactéries dans leur milieu de culture

IX. Etude du transport de sucres par marquage radioactif

Les cinétiques de transport du sorbitol et du galactose ont été réalisées en utilisant des radio-isotopes.

❑ Préparation des cellules :

Une culture de *Corynebacterium glutamicum* est réalisée sur milieu BMCG-glucose en fiole d'Erlenmeyer. Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont récupérées par centrifugation (7000g, 3°C pendant 5 minutes). Le culot bactérien est récupéré dans du milieu BMCG-glucose frais de manière à obtenir une suspension bactérienne dense (24 g de matière sèche/l).

❑ Procédure :

Le sorbitol et le galactose utilisés proviennent de chez Dupont (Les Ulis). Leurs caractéristiques ainsi que le détail du mélange réactionnel sont présentés dans le tableau suivant.

	Etude du transport du sorbitol		Etude du transport du galactose	
Caractéristiques des sucres radioactifs	concentration : 0,46 mM activité spécifique : 8 GBq/mmol		concentration : 0,32 mM activité spécifique : 11 GBq/mmol	
Mélange réactionnel	Solution de sorbitol (70%) contenant 10 nmoles de ^{14}C-sorbitol	0,4 ml	Solution de galactose (50%) contenant 8 nmoles de ^{14}C-sorbitol	0,65 ml
	suspension bactérienne 24 gMS/l	1,4 ml	suspension bactérienne 24 gMS/l	1,1 ml
Caractéristiques de la suspension finale	Osmolalité : 1,5 osmol.kg^{-1} Radioactivité : 89 000 d.p.m.		Osmolalité : 1,5 osmol.kg^{-1} Radioactivité : 100 000 d.p.m.	

La suspension bactérienne en présence des sucres radioactifs est maintenu à 35°C sous agitation. A t=0 puis toutes les 30 secondes pendant 5 minutes, 100 µl de cette suspension sont prélevés, filtrés sur filtre 0,22 µm et lavés avec 10 ml de milieu BMCG-glucose contenant du sorbitol (0,9 M) ou du galactose (1,1 M). Les filtres sont

ensuite placés dans des tubes à scintillation contenant 10 ml de liquide scintillant. La radioactivité de chaque échantillon ainsi que celle du filtrat est déterminée grâce à un compteur à scintillation Beckman LS 5000 TD.

❑ Calcul du rapport Ci/Ce :

Le rapport des concentrations en sucre intra- et extracellulaire est calculé à partir du rapport des radioactivités entre les cellules et le milieu externe de la manière suivante :

$$Re = \frac{R_{filtrat} - R_{cellules}}{V_{ech}}$$

Re : radioactivité du milieu externe
$R_{filtrat}$: radioactivité du filtrat
$R_{cellules}$: radioactivité des cellules sur le filtre
V_{ech} : volume d'échantillon filtré

$$Ri = \frac{R_{cellules} - R_0}{V_i}$$

Ri : radioactivité intégrée dans les cellules
R_0 : radioactivité des cellules sur le filtre à t=0
V_i : volume intracellulaire des cellules

$$Ci/Ce = Ri/Re$$

X. Exploitation des données expérimentales

X.1. Calcul des concentrations intracellulaires

Le dosage des métabolites fournit les concentrations de ces composés contenus dans les extraits cellulaires. Ces composés peuvent provenir du milieu intracellulaire mais aussi du milieu de culture par apport de liquide interstitiel. Dans certains cas, il est nécessaire de tenir compte de cette "contamination" par le milieu extracellulaire.

La concentration intracellulaire en composé j est égale à :

$$C_j^{in} = \frac{q_j^{in}}{V_{in}}$$

q_j^{in} : quantité de j intracellulaire (mole/g MS)
V_{in} : volume intracellulaire (l/g MS)

La quantité de composé intracellulaire est égale à :

$$q_j^{in} = q_j^{extrait} - q_j^{ex}$$

q_j^{in} : quantité de j intracellulaire (mole/g MS)
$q_j^{extrait}$: quantité dans l'extrait (mole/g MS)
q_j^{ex} : quantité extracellulaire apportée (mole/gMS)

Les dosages analytiques donnent les concentrations du composé j dans l'extrait cellulaire ($C_j^{extrait}$) et dans le milieu extracellulaire ($C_j{}^{ex}$). L'expression de $q_j{}^{in}$ devient alors :

$$q_j{}^{in} = C_j{}^{extrait} . V_{extrait} - C_j{}^{ex} . V_{ex}$$

Le volume de l'extrait ($V_{extrait}$) est composé du volume intracellulaire (V_{in}), du volume "contaminant" apporté avec les cellules lors de la centrifugation (V_{ex}), du volume d'eau amené par l'agent lysant ($V^{eau}{}_{lys}$) et du volume d'eau de la solution de neutralisant ($V^{eau}{}_{neu}$) (dans le cas de l'utilisation d'acide ou de base).

$$V_{extrait} = V_{in} + V_{ex} + V^{eau}{}_{lys} + V^{eau}{}_{neu}$$

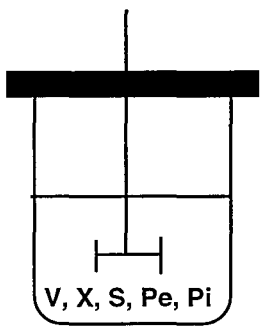
Une estimation de la précision des concentrations intracellulaires peut être calculée de la manière suivante. La concentration intracellulaire se décompose en deux composantes d'après la formule: $C_j{}^{in} = \frac{q_j{}^{in}}{V_{in}}$

La précision de chaque composante a été déterminée expérimentalement, on peut donc estimer l'erreur faite sur le calcul de la concentration intracellulaire :

$$\frac{\Delta C_j{}^{in}}{C_j{}^{in}} = \frac{\Delta q_j{}^{in}}{q_j{}^{in}} + \frac{\Delta V_{in}}{V_{in}}$$

La précision sur l'extraction et le dosage des métabolites intracellulaires étant de l'ordre de 10 à 15% et celle sur la détermination du volume intracellulaire étant de l'ordre de 5 à 10%, on peut estimer une précision sur les concentrations intracellulaires de l'ordre de **20-25%**.

X.2. Détermination des vitesses et des rendements en réacteur discontinu



V : volume de milieu (l)
X : concentration en biomasse (g/l)
S : concentration en substrat (g/l)
Pe : concentration en produit externe (g/l)
Pi : quantité de produit intracellulaire (µmole/g)

A partir des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de formation de produits intra- ou extracellulaires, il est possible de calculer les différentes vitesses à chaque instant t en déterminant la dérivée de la variable considérée par rapport au temps.
La vitesse spécifique instantanée de chaque variable (X, S, P) est définie par le rapport entre la dérivée de la variable considérée par rapport au temps et la valeur de la biomasse X à cet instant.

Les bilans matières de la biomasse X, du substrat S et du produit extracellulaire Pe, donnent :

$$r'''_x = \frac{dX}{dt} \qquad r'''_s = -\frac{dS}{dt} \qquad r'''_p = -\frac{dPe}{dt}$$

$$\mu = \frac{r'''_x}{X} \qquad qs = \frac{r'''_s}{X} \qquad qp = \frac{r'''_p}{X}$$

avec r'''x : vitesse de croissance (g/l.h)
r'''s : vitesse de consommation du substrat (g/l.h)
r'''p : vitesse de production d'un produit extracellulaire (g/l.h)
µ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
qs : vitesse spécifique de consommation du substrat (g/lgh)
qp : vitesse spécifique de production d'un produit (g/g.h)

Un bilan matière des produits intracellulaires sur le réacteur donne :

$Pi.X.V$ Quantité totale du produit dans le réacteur (µmole)

$r'''Pi = \frac{d(PiXV)}{dt} = V.\frac{d(PiX)}{dt}$ Vitesse d'accumulation intracellulaire (µmole/l.h)

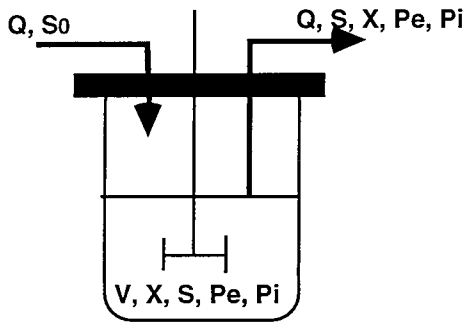
$\Pi pi = \frac{1}{X}.\frac{d(XPi)}{dt}$ Vitesse spécifique d'accumulation intracellulaire (µmole/g.h)

Les rendements globaux s'obtiennent de la manière suivante :

$$Rx/s = \frac{X - X0}{S0 - S} \qquad Rp/x = \frac{P - P0}{X - X0}$$

avec : S0 : concentration de substrat dans le fermenteur à t=0 (g/l)
P0 : concentration de produit dans le fermenteur à t=0 (g/l)
Rx/s : rendement apparent de production de biomasse à partir du substrat (g/g)
Rp/x : rendement apparent de production de produit à partir de la biomasse (g/g)

X.3. Détermination des vitesses et des rendements en réacteur continu



Q : débit d'alimentation et de soutirage (l/h)
S0 : concentration en substrat dans le milieu d'alimentation (g/l)
V : volume de milieu dans le réacteur (l)
X : concentration en biomasse dans le réacteur (g/l)
Pe : concentration en produit du milieu(g/l)
Pi : produit intracellulaire (µmole/g)

Les bilans matières de la biomasse, du substrat, du produit extracellulaire Pe et du produit intracellulaire Pi donnent :

		A l'état stationnaire
❑ Bilan biomasse	$r'''_x = \frac{Q}{V}.X + \frac{dX}{dt}$	$\frac{dX}{dt} = 0$ et $r'''_x = \mu.X$ D=µ
❑ Bilan substrat	$r'''_s = \frac{Q}{V}.(S0 - S) - \frac{dS}{dt}$	$\frac{dS}{dt} = 0$ $r'''_s = \frac{Q}{V}.(S0 - S)$ $r'''_s = r'''_x.Rx/s$ et $\mu=D$ $Rx/s = \frac{X}{S0 - S}$
❑ Bilan produit extracellulaire	$r'''Pe = \frac{Q}{V}.Pe + \frac{dPe}{dt}$	$\frac{dPe}{dt} = 0$ $r'''Pe = \frac{Q}{V}.Pe = D.Pe$
❑ Bilan produit intracellulaire	$r'''Pi = \frac{Q}{V}.Pi.X.V + \frac{d(VXPi)}{dt}$ $r'''Pi = D.Pi + \frac{1}{X}.\frac{d(X.Pi)}{dt}$	$\frac{d(VXPi)}{dt} = 0$ $r'''pi = D.Pi$

CHAPITRE III

Etude cinétique et physiologique de <u>Corynebacterium glutamicum</u> soumise à un choc hyperosmotique en culture discontinue

Chapitre III : Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture discontinue

I. Etude de la réponse de C. glutamicum ATCC 17965 soumise à un ajout de NaCl dans le milieu. 88

I.1. Evolution du volume cellulaire 88

I.2. Evolution des métabolites intracellulaires 93

I.2.1. Chocs osmotiques inférieurs à 2 osmol.kg-1 93

I.2.2. Chocs osmotiques au-delà de 2 osmol.kg-1 105

I.2.2.1. Influence d'une osmolarité élevée sur les paramètres de croissance et de consommation du glucose 105

I.2.2.2. Cinétiques d'accumulation des acides aminés et tréhalose 107

I.2.2.3. Influence de la pression osmotique sur les vitesses spécifiques d'accumulation des acides aminés 108

I.2.2.4. Influence du choc osmotique sur le niveau d'enzymes synthétisant le glutamate 108

I.2.2.5. Conclusion 109

II. Influence de la nature de l'osmolyte dépresseur sur la réponse osmotique de C. glutamicum ATCC 17965 111

III. Etude de la réponse osmotique de C. glutamicum ATCC 14752 121

III.1. Etude de la réponse osmotique de la souche ATCC 14752 en milieu BMCG 121

III.1.1. Cinétiques de croissance et de consommation de glucose de la souche ATCC 14752 après un choc osmotique 121

III.1.2. Cinétiques d'accumulation des métabolites 121

III.1.3. Comparaison avec la souche ATCC 17965 123

III.1.4. Conclusion 124

III.2. Etude de la réponse osmotique de C. Glutamicum ATCC 14752 en présence de proline 126

III.2.1. Culture discontinue en présence de 1,2 g/l de proline 126

III.2.2. Culture discontinue en présence de 2,5 g/l 129

III.2.3. Discussion - conclusion 129

IV. Etude de la réponse osmotique de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 en présence de bétaïne. 131

IV.1. Influence sur la croissance 131

IV.2. Influence sur le contenu cellulaire en métabolites 132

IV.3. Discussion - conclusion 132

V. Récapitulation des résultats 136

Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture discontinue

Dans cette première partie, nous avons étudié le comportement de deux souches de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivées en culture discontinue soumises à un choc hyperosmotique. La souche ATCC 17965 est la souche de base utilisée par la société ORSAN pour les études de compréhension du procédé de production d'acide glutamique. La seconde est la souche qui a été génétiquement modifiée pour l'obtention des mutants testés ultérieurement.

L'étude de la réponse osmotique des souches de *Corynebacterium glutamicum* a été réalisée d'une part par l'approche classique du génie biochimique et d'autre part par une approche intracellulaire. Cette étude a nécessité la mise au point d'un certain nombre de techniques d'extraction et de dosage des métabolites intracellulaires, présentées dans le chapitre précédent. Les variations des paramètres cinétiques de croissance, du volume cellulaire et du contenu cellulaire en métabolites ont été suivies au cours de cultures discontinues suite à un choc hyperosmotique. Pour cela, nous avons utilisé le NaCl comme osmolyte dépresseur, c'est le soluté généralement testé dans les études d'osmorégulation. Nous avons également utilisé d'autres osmolytes dépresseurs de manière à s'assurer que la réponse observée est réellement liée à l'élévation de la pression osmotique.
Enfin nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de la présence de la bétaïne dans le milieu de culture sur la réponse osmotique, cet acide aminé étant présent en forte quantité dans les milieux de production d'acide glutamique.

Cette partie fait l'objet de trois publications dont une est acceptée dans Applied Microbiology and Biotechnology et les deux autres sont soumises à Applied Microbiology and Biotechnology et Biotechnology Letters.

I. Etude de la réponse de *C. glutamicum* ATCC 17965 soumise à un ajout de NaCl dans le milieu.

I.1. Evolution du volume cellulaire

Ce paragraphe est présenté sous forme d'une publication parue dans Biotechnology Letters.

Biotechnology Letters (1996) 18 (2) : 145-148

KINETICS OF VOLUME VARIATION OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* FOLLOWING SALINE OSMOTIC UPSHIFTS

S. GUILLOUET and J.M. ENGASSER*
Institut National Polytechnique de Lorraine
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS
2, avenue de la Forêt de Haye
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

SUMMARY

The variation over time of the volume of *Corynebacterium glutamicum* following osmotic upshocks produced by the addition of increasing NaCl quantities was measured by a light-scattering method. During the first seconds the cell volume rapidly decreased. The extent of volume reduction varied between 30% at 1.5 osmol/kg and 65% at 3.3 osmo/kg. In a second phase the cell volume increased again over a time period lasting 10 minutes or more depending on the magnitude of the saline upshock.

INTRODUCTION

The osmoregulation of Corynebacteria has been receiving increasing attention, specially with respect to the possible stimulating effect of high osmotic pressures on the synthesis of amino acids or other metabolites. When *Corynebacterium glutamicum* was grown in batch or continuous cultures, the addition of NaCl to the medium was reported, during the first hour, to result both in a transient uptake of Na^+ and an increased synthesis of proline, glutamic acid or trehalose,

depending on the culture conditions (Guillouet and Engasser, 1995 a, b). During the minutes following a saline upshock, important water movements across the cell membranes are also occuring: first, a fast passive water efflux from the cell leading to a reduction in cell volume; second, a water influx together with the uptake of ions and the *de novo* synthesis of compatible solutes (Zimmerman, 1978). Consecutive decrease and increase of the cell volume affects the intracellular solutes concentrations, and consequently the intracellular osmotic pressure. Thus, for a more quantitative description of the osmoregulation processes in Corynebacteria, and specially for the evaluation of the internal osmotic pressure, it is important to know the variation over time of the cellular volume.

A simple and rapid method of measuring osmotically induced volume changes of bacteria is to measure changes in the absorbance of the bacteria suspension (Koch, 1961). A decrease in cell volume results in an increased absorbance, whereas the reswelling of cells can be seen from a decreased absorbance. In this study, the light scattering method was used to evaluate the changes over time of the volume of *Corynebacterium glutamicum* induced by the addition of increasing concentrations of NaCl.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and medium composition

Corynebacterium glutamicum melassecola (strain ATCC 17965), given by ORSAN (Paris, France) was grown in shake flasks (34.5°C, 170 rpm) in the modified Basal Medium for *Corynebacterium* Growth (BMCG) (Guillouet and Engasser, 1995a).The osmolality of this medium, measured with a cryoscopic osmometer Hermann Rœbling, is 0.4 osmol/kg.

Optical density measurement and calculation of cell volume

The kinetics of salt-induced changes in optical density were measured in a LKB Novaspec II spectrophotometer connected to an Epson LX-800 printer. The absorbance of a bacterial suspension in exponential growth phase was first determined with a 1-cm path-length at 570 nm. This suspension was then mixed with a solution of NaCl 5M to obtain the desired osmolality. The changes in absorbance were recorded every 15 secondes. Between measurements a slight agitation and aeration were maintained by air bubbling.

In order to evaluate the changes in cell volume from the measured changes in absorbance, first one has to take into account the dilution of the cell suspension due to the addition of NaCl. The effect of the dilution of the medium was determined by adding to the original growing cell suspension the same volume of culture medium than the previously added volume of concentrated NaCl. The measured absorbance variation at 570 nm as a result of dilution was added to the determined absorbance of the cell suspension after NaCl addition.

A second correction to consider is the effect of the increased refractive index (RI) of the medium due to the addition of NaCl. This is done by independently measuring the absorbance

variation of the cell suspension following the addition of a solution of Ficoll, a high molecular mass polymer of sucrose. Ficoll has a high refractive index but, due to its high molecular weight, has little effect on the medium osmotic pressure. In a first step, the RI of BMCG solutions containing increasing concentrations of NaCl and Ficoll were measured in the absence of cells (Fig. 1) by an Atago Co refractometer.

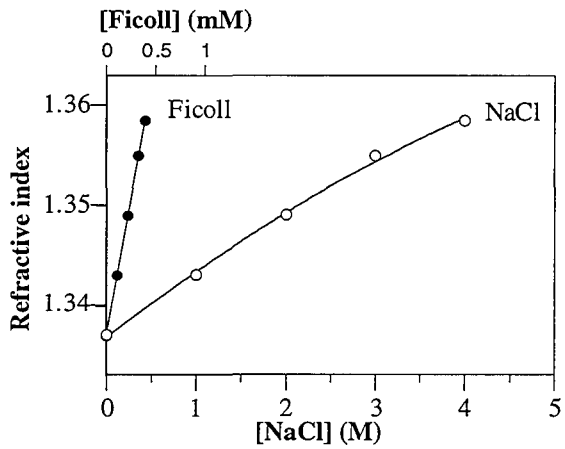


Figure 1 : Effect of NaCl and Ficoll on the refractive index of BMCG medium

The effect of RI on the optical density of the cell suspension was then determined by adding to the suspension a concentrated Ficoll solution to obtain a RI similar to that of the cell suspension with added NaCl. Addition of increasing quantities of Ficoll resulted in a proportional decrease in the absorbance of the cell suspension, measured at 570 nm, due to the increase in refractive index (Fig. 2). This measured decrease in absorbance with Ficoll was then added to the increase in absorbance observed upon the addition of NaCl to correct for the change in RI.

Changes in cellular volume due to salt addition was calculated from the measured variations in absorbance by assuming that the absorbance is inversely proportional to the cell volume at the 3/2 power (Koch, 1984).

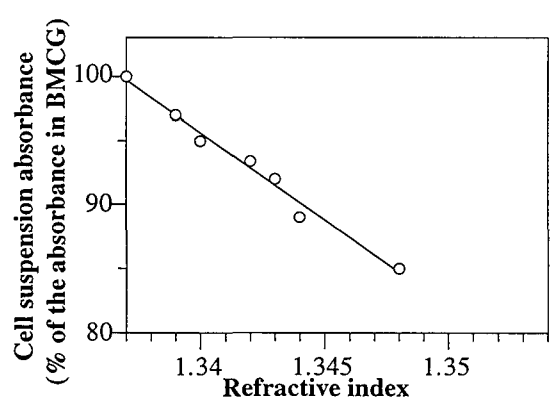


Figure 2 : Effect of the RI on the Optical Density of *C. glutamicum* suspension

RESULTS AND DISCUSSION

Corynebacterium glutamicum cells in exponential growth phase were first submitted to an increased medium osmolality from 0.4 to 1.5 osmol/kg by addition of NaCl. The changes over time of the measured absorbance of the cell suspension, together with the calculated corrected absorbance taking into account the effects of sample dilution and increased medium refractive index, are represented in Figure 3. During the first seconds after salt addition, one observed an extremely rapid increase in absorbance. Afterwards the absorbance steadily decreased, reaching after 10 minutes a stable value closed to the absorbance of the cell suspension prior to the salt addition. As no significant cell growth occurs during the 30 minutes following NaCl addition (Guillouet and Engasser, 1995a), the observed variation in absorbance are indicative of important water fluxes resulting in an initial cell shrinkage and a consecutive cell reswelling.

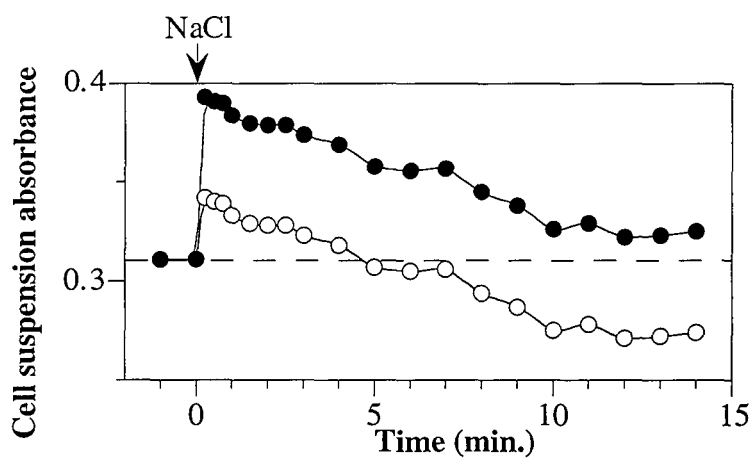


Figure 3 : Kinetics of absorbance changes in a *C. glutamicum* suspension submitted to an osmotic upshift from 0.4 to 1.5 osmol/kg by addition of NaCl (arrow) :
(○) measured values of absorbance, (●) corrected values for dilution and RI effects.

In order to investigate the changes in *C. glutamicum* volume upon a larger range of osmotic pressure variations, three additional experiments were carried out with osmotic upshifts from 0.4 to 2, 2.5 and 3.3 osmol/kg, respectively. Similar time variations of the absorbance of the cell suspension were measured showing an initial fast increase followed by a slower decrease. For higher osmotic pressures, however, one observed larger initial rises in the cell suspension absorbance as well as longer durations to recover the initial absorbance. For the four experiments the measured time variations in absorbance have been expressed in terms of the corresponding variations of the cell volume. As seen in Figure 4, the initial fast volume reduction upon salt addition reached 30% at the lowest osmotic pressure of 1.5 osmol/kg and 65% at the highest osmotic pressure of 3.3 osmol/kg. Moreover if 10 minutes were sufficient for the bacteria to

recover their initial volume at 1.5 osmol/kg, much longer time, around 30 minutes, seemed to be necessary at the highest osmolality.

The presently observed water movements in *Corynebacterium glutamicum* are qualitatively similar to those reported for other bacteria strains. Fast decreases in cell volume upon addition of osmolytes have been described in *Escherichia coli* (Matts and Knowles, 1971). The extent of volume reduction, however, seems to be species dependent. In *Bacillus subtilis*, for example, a saline osmotic upshift of 0.8 osmol/kg led to a 30 % drop of the cell volume (Whatmote *et al.*, 1990), whereas in the marine bacterium *Halomonas elongata* only a volume decrease of 20 % was observed for a shock of 2.2 osmol/kg (Miguelez and Gilmour, 1994).

Consecutive volume decrease and increase has also been reported in some bacteria as *Bacillus subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990) and *Halomonas elongata* (Miguelez and Gilmour, 1994) and in yeast (Berner, 1994).

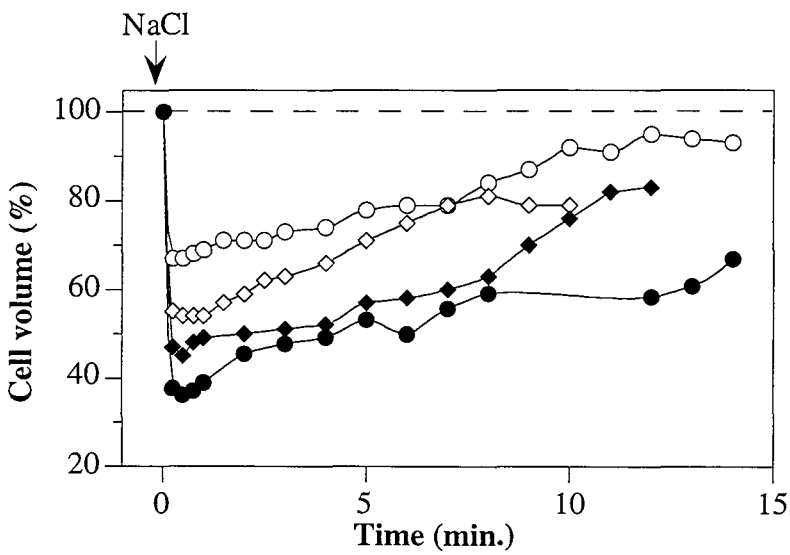


Figure 4 : Kinetics of cell volume changes of *C. glutamicum* upon an osmotic upshift from 0.4 to (○) 1.5, (◇) 2, (◆) 2.55 and (●) 3.3 osmol/kg by addition of NaCl (arrow).

REFERENCES

Berner, J.L. (1994) Ph. D. thesis, Dijon, France.
Guillouet, S. and Engasser, J.M. (1995a) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 315-320.
Guillouet, S. and Engasser, J.M. (1995b) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* In Press.
Koch A.L. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 51, 429-441.
Koch A.L. (1984) *J. Bacteriol.* 159(3), 919-924.
Matts, T.C. and Knowles C.J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 583-587.
Miguelez, E. and Gilmour, D.J. (1994) *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 363-365.
Whatmore, A.M., Chudek, J.A. and Reed, R.H. (1990) *J. Gen. Microbiol.* 136, 2527-2535.
Zimmermann, U. (1978) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 121-148.

I.2. Evolution des métabolites intracellulaires

I.2.1. Chocs osmotiques inférieurs à 2 osmol.kg^{-1}

Ce paragraphe est présenté sous forme d'une publication parue dans Applied Microbiology and Biotechnology.

Appl. Microbiol. Biotechnol. (1995) 43 : 315-320

ORIGINAL PAPER

S. Guillouet and J.M. Engasser

Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock

Received : 29 July 1994 / Received revision : 10 October 1994 / Accepted : 24 october 1994

Abstract : In order to understand the role of the medium osmolality on the metabolism of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*, the effects of saline osmotic upshocks from 0.4 to 2 osmol.kg^{-1} have been investigated on the growth kinetics and the intracellular content of the bacteria. Addition of a high concentration of NaCl after a few hours of batch culture results in a temporary interruption of the cellular growth. Cell growth resumes after about 1 hour but at a specific rate that decreases with increasing medium osmolality. Investigation of the intracellular content showed, during the first 30 min following the shock, a rapid but transient influx of sodium ions. This was followed by a strong accumulation of proline which rose from 5 to 110 mg/g dry weight at the end of the growth phase. A slight accumulation of intracellular glutamate from 60 to 75 mg/g dry weight was also observed. Accordingly, for *Corynebacterium glutamicum* an increased osmolality in the culture medium resulted in a higher specific rate of glutamate and proline synthesis during the growth phase.

Introduction

Glutamate, one of the major commercial amino acids with an annual production exceeding 600 000 tonns, is produced by fermentation using beet or cane molasses as carbon sources and *Corynebacteria* as microbial strains. Modern production processes are fed-batch fermentations consisting of an initial rapid growth of the bacteria followed by a phase when glutamate is extensively excreted, which is induced by the addition of surfactants altering the membrane permeability (Marquet et al. 1986).

For this fermentation the osmotic pressure of the medium has been reported to be an important operational parameter (Mondain-Monval, 1988). To reach a high glutamate productivity, the initial bacterial growth is performed on a high osmolality medium, usually exceeding 1 000 mosmol.kg^{-1}. Upon addition of the surfactants, the medium osmolality is further increased by the excretion of glutamate. But the exact mechanism of glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* is still not understood (Krämer et al, 1994).

The responses of bacteria to hyperosmotic environments have received increasing attention in recent years. Best studied are the osmotic responses of Gram-negative bacteria, notably *Escherichia coli*. (Csonka and Hanson 1991). The primary response of *Escherichia coli* to osmotic upshocks by addition of NaCl is the accumulation of K^+ ions with a concomitant increase of the glutamate intracellular content (Dinnbier et al. 1988). In a subsequent phase, these compounds are replaced by one or several neutral compatible solutes, such as trehalose (Dinnbier et al. 1988; Rod et al. 1988; Welsh et al. 1991), proline and betaine (Dinnbier et al. 1988; Ohwada and Sagisaka 1988).

The physiological response of Gram positive bacteria to a high-osmolality environment has been comparatively less studied. *Bacillus subtilis* has been reported to accumulate K^+ ions immediatly after an osmotic upshock. Proline is also synthesized, but is preferentially replaced by betaine when available in the medium (Whatmore et al. 1990). *Brevibacteria*, on the other hand, have been found to accumulate proline (Kawahara et al. 1989), glutamine (Frings et al. 1993) and ectoines (Bernard et al. 1993, Frings et al. 1993).

In this study, in order to gain a better understanding of the process of glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*, we investigated the influence of a high medium osmolality on the growth and physiology of the bacteria. A main objective was to determine the internal content of the bacteria during the initial growth phase before surfactants are added to the medium to induce the excretion of glutamate.

Materials and methods

Bacterial strain and medium composition

Corynebacterium glutamicum melassecola (strain ATCC 17965), given by ORSAN (Paris, France) was grown in the modified Basal Medium for *Corynebacterium* Growth, BMCG (Liebl et al. 1989). Catechol was replaced by a mixture containing nicotinic acid, myo-inositol, panthotenic acid, choline chloride and deferoxamine at a concentration of 3 mg/l each. Biotine and thiamine-HCl were used respectively at 30 µg/l and 2mg/l. Glucose at 20 g/l concentration was the sole carbon source.

Fermentation conditions

A 60 ml overnight culture of *Corynebacterium glutamicum* in BMCG was used to inoculate a 2 liters SGI (Toulouse, France) fermentor containing 1 liter of BMCG medium. The culture was grown at 35°C with an aeration rate of 50 l/h. The pH was regulated at 7.3.

Four batch cultures were performed under different osmolality conditions. All cultures were started at an osmolality of 0.4 osmol.kg-1. For the first culture no salt was added. For the three others, after 2 hours of fermentation, BMCG medium containing concentrated NaCl (5 M) was added to increase the medium osmolality up to 1, 1.5 and 2 osmol.kg-1, respectively.

Analyses

During the fermentation, samples were collected and centrifuged. The biomass concentration was determined by the dry cell weight method. Sugars and organic acids analyses were performed on the supernatant by HPLC (Waters model 712, St Quentin, France) using a Brownlee Polypore H column, operated at 65°C and with H_2SO_4 (0.02 M) elution, a UV detector and a refractometer as detectors.

For the determination of intracellular ions, samples were harvested by filtration through 0.45 µm Whatman filters (Maidstone, England) and rinsed with isotonic MOPS-Buffer, pH 7.3 (without Na^+ and K^+). Cells were resuspended in 4 ml $HClO_4$ 20% and extracted for 3 minutes. The biomass concentration in $HClO_4$ solution was constant at 2 g dry weight/L. A blank was realized under the same conditions without bacteria. Extracts were 100 fold diluted and analysed using a atomic absorption spectrometer (Varian Spectra AA-20, Les Ulis, France). Measurement were performed in triplicate and typically agreed to ± 10%.

For the extraction of intracellular metabolites, samples were first centrifuged for 2 minutes (6,000 x g, 4°C). Cell pellet was collected and extracted by suspending in cold distilled water for 15 minutes. The biomass concentration in cold water was set at 5 gdry weight/L. The suspension was then centrifuged for 2 minutes (7,000 x g, 0°C) and the analysis of intracellular metabolites performed on the supernatant. After derivatization with OPA and FMOC reagents, amino acids were analyzed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al. 1993). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 5% for proline and 15% for glutamate.

Free intracellular trehalose of the cell extract was measured following enzymatic hydrolysis to glucose by a purified trehalase (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). The reaction mixture containing trehalase ($4x10^{-3}$ U) and cell extract in 20mM phosphate buffer (pH 5.7) was

incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. Glucose was measured enzymatically by the glucose oxidase-peroxidase method (Sigma). A blank without trehalase was realized to evaluate the possible contamination with glucose from the culture medium or from the intracellular medium. The concentration of trehalose in the extract was calculated from a standard curve prepared with trehalose (Sigma). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 15%.

The osmotic pressure of the medium was measured with a cryoscopic osmometer Hermann Roebling (Berlin, Germany).

Results

Kinetics of growth and glucose consumption after an osmotic upshock

When *C. glutamicum* was cultivated during 2 h at an osmolality of 0.4 Osm.kg^{-1} and then subjected to an addition of NaCl so to increase the medium osmolality to 1.5 osmol.kg^{-1}, the observed fermentation kinetics are shown in Figure 1. The addition of NaCl first resulted in an arrest of cell growth and glucose consumption. After about 30 min however, cell growth was found to resume and to last until the total consumption of glucose. During the growth there was no secretion of amino acids by the bacteria. Only small quantities of organic acids, mainly succinate (20 mg/L) and 2-oxo-glutarate (5 mg/L), were found in the medium.

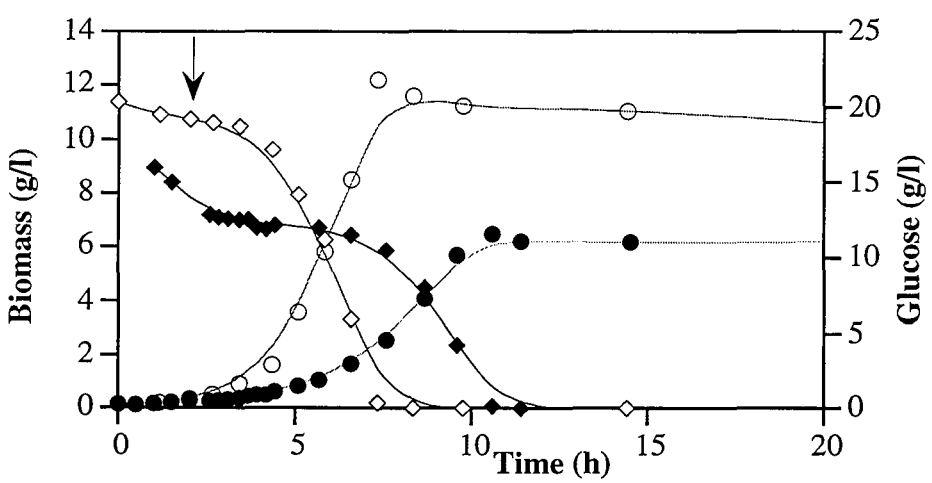


Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the growth and glucose consumption of *C. glutamicum* on a defined medium. ○ Biomass, ◇ glucose concentration for a standard fermentation at an initial osmotic pressure of 0.4 osmol.kg^{-1}. ● Biomass, ◆ glucose concentration when the fermentation was started at 0.4 osmol.kg^{-1} and NaCl added after 2 h of culture (arrow) to arise the osmotic pressure to 1.5 osmol.kg^{-1}.

Figure 2 compares the growth kinetics of bacteria not subjected to the addition of NaCl and of bacteria for which increasing amounts of NaCl were added after 2 h of culture so as to bring the medium osmolality to 1, 1.5 and 2 osmol.kg^{-1}. In all cases the addition of NaCl resulted both in a slower bacterial growth and a reduced maximal cell concentration. The corresponding calculated maximum specific growth rates, reported in Fig 3, decreased from a maximum of 0.75 h^{-1} at 0.4 osmol.kg^{-1} to a value of 0.25 h^{-1} at 2 osmol.kg^{-1}. Under the same conditions the maximal cell concentration decreased from 11 to 5 gdry weight/L. As the same amount of glucose was consumed in the four experiments, the addition of salt also resulted in a strong reduction of the glucose to biomass conversion yield from 0.6 to 0.3 gdry weight / g glucose.

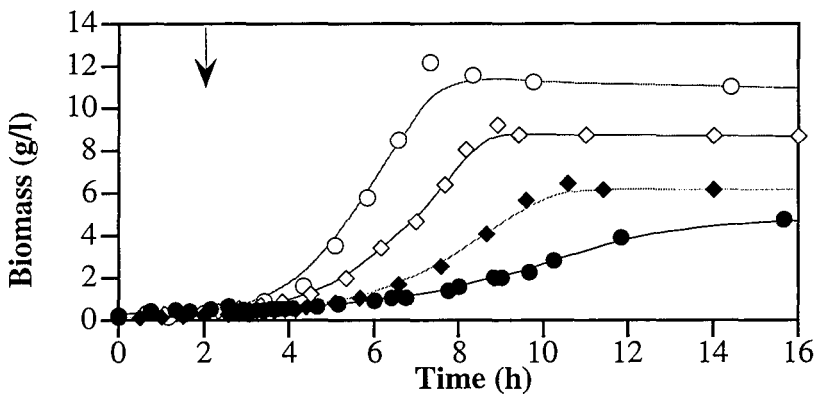


Fig. 2 : Growth of *C. glutamicum* on a defined medium at increasing osmolality obtained by adding NaCl after 2 hours of culture (as indicated by the arrow) :
0.4 osmol.kg^{-1} (○), 1 osmol.kg^{-1}(◇), 1.5 osmol.kg^{-1}(◆) and 2 osmol.kg^{-1} (●)

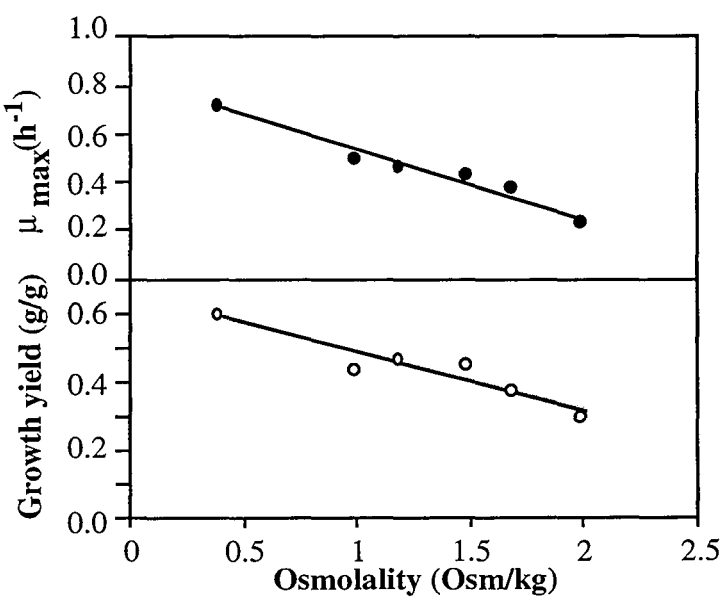


Fig. 3 : Effect of medium osmolality on the maximum growth rate and the glucose to biomass growth yield of *C. glutamicum* grown on a defined medium

Kinetics of cations uptake after an osmotic upshock

For a better understanding of the possible adaptation mechanisms of the bacteria to osmotic shocks, intracellular analyses were performed on the collected cells. The levels of intracellular Na^+ and K^+ were first determined on the cells grown at the medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1} (Figure 4). During the first 2 hours, when the medium contained 0.05 M K^+ and 0.09 M Na^+, the intracellular contents amounted to 25 mg K^+/g dry weight and 5 mg Na^+ /g dry weight. Accordingly potassium was the dominant intracellular cation prior to the osmotic shock. Upon addition of NaCl no significant variation of the intracellular content of potassium was observed. However, a fast uptake of Na^+ occured: the intracellular sodium level increased from 5 to 40 mg Na^+/g dry weight in about 30 mn. Afterwards the sodium level quickly decreased and came back to its initial level. Similar types of behaviours were observed when bacterial growth was carried out at 1 and 2 osmol.kg^{-1} (data not shown).

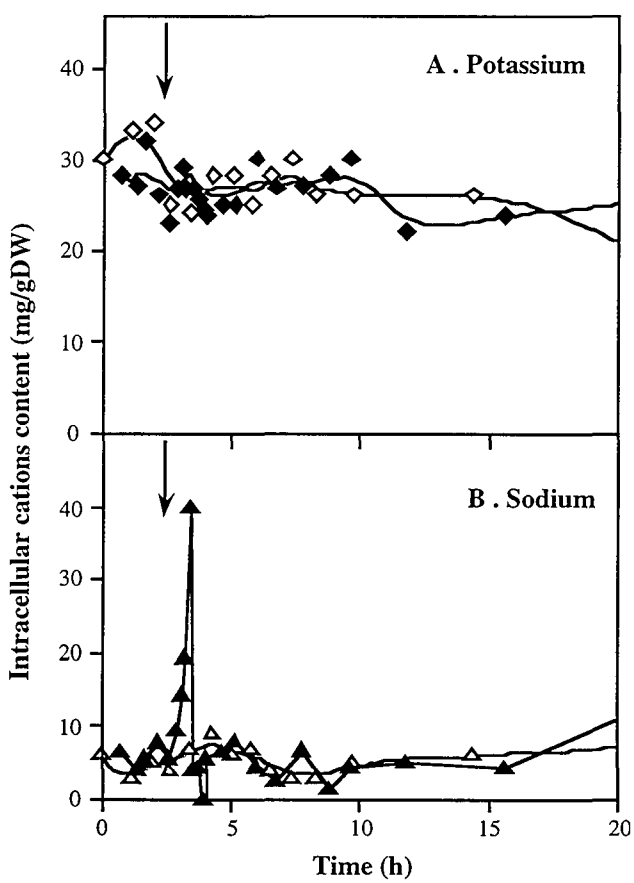


Fig. 4 : Effect of a saline upshock on the intracellular potassium (**A**) and sodium (**B**) ion content for *C. glutamicum* grown on a defined medium. ◇ △ The ionic content for a standard fermentation at an initial osmotic pressure of 0.4 osmol.kg^{-1}. ◆ ▲ The ionic content when the fermentation was started at 0.4 osmol.kg^{-1} and NaCl added after 2 hours of culture (arrow) to arise the osmotic pressure to 1.5 osmol.kg^{-1}.

Kinetics of amino acids and trehalose accumulation

For the different cultures, the variations with time of the intracellular amino acid and trehalose contents were also determined. When *Corynebacterium glutamicum* was grown at the lowest osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}, glutamate was found to be the major intracellular amino acid at a level around 55 mg/g dry weight, which corresponded to 85% of the total amino acid pool (Fig. 5).

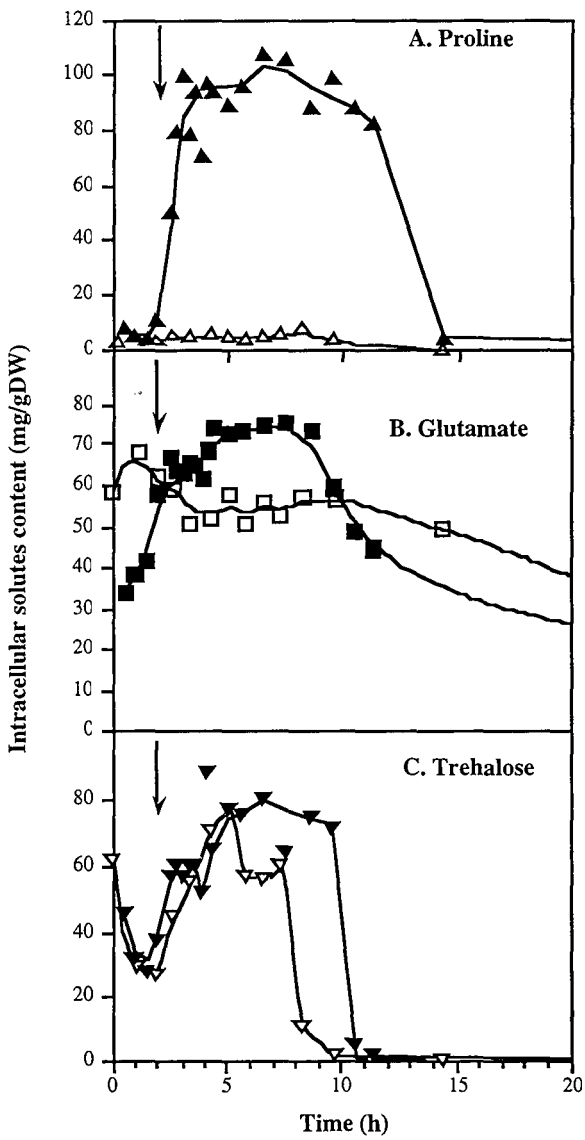


Fig. 5 : Effect of a saline upshock on the intracellular proline (**A**), glutamate (**B**) and trehalose (**C**) content for *C. glutamicum* grown on a defined medium. □ △ ▽ The metabolite content for a standard fermentation at an initial osmotic pressure of 0.4 osmol.kg^{-1}. ■ ▲ ▼ The metabolite content when the fermentation was started at 0.4 osmol.kg^{-1} and NaCl added after 2 hours of culture (arrow) to rise the osmotic pressure to 1.5 osmol.kg^{-1}.

The glutamate level remained relatively constant during the fermentation. Proline and other amino acids were present at much lower concentrations. The intracellular concentration of trehalose, on the other hand, was found to vary strongly. Starting from an initial level of 30 mg/gdry weight, it first increased during the growth phase, reaching a maximum level around 80 mg/g, then decreased once glucose was completely exhausted from the culture medium.

Addition of NaCl resulted in a strong increase in amino acids content. The concentration of glutamate increased from 60 to 75 mg/gdry weight in about 2 h. But it is the level of proline that showed the strongest increase, rising from 5 to 100 mg/gW in about 1 h. Under these conditions proline became the major intracellular amino acid, accounting for 60% of the total pool of cellular amino acids. The addition of salt, on the other hand, had no significant influence on the trehalose content.

Similar types of behaviors were observed when the cells were subjected to osmotic upshocks of 1 and 2 osmol.kg^{-1}. For the different experiments, the maximum amounts of accumulated proline, glutamate and trehalose measured at the end of the growth phase are reported in Fig. 6. As seen increasing the medium osmolality mainly increased the proline content which reached 130 mg/gdry weight at the highest salt concentration. It also resulted in a slight increase in glutamate level but did not have any effect on the maximum trehalose content.

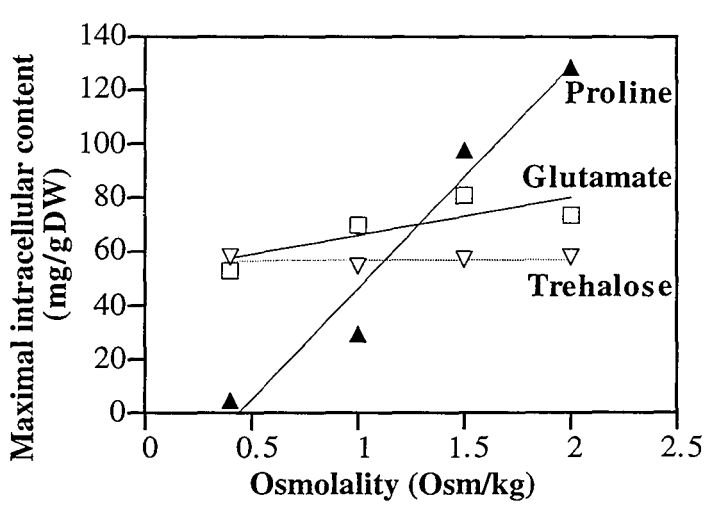


Fig. 6 : Effect of medium osmolality on the maximum intracellular content of proline (▲), glutamate (□) and trehalose (▽) of *C. glutamicum* grown on a defined medium.

Discussion

To understand better the influence of a high medium osmolality on the metabolism of glutamate-producing *Corynebacterium glutamicum*, the growth kinetics and intracellular content of the bacteria were examined in a defined medium following the addition of increasing quantities of NaCl.

Both a short and long term response were observed. Addition of a high salt concentration first resulted in a momentary interruption of cell growth, lasting for no more than 1 h. Upon adaptation, *Corynebacterium glutamicum* was found to grow over a wide range of salt concentrations, which may reach 3.5 osmol.kg^{-1}. Increasing the medium salinity, however, resulted in lower specific growth rates and reduced glucose to biomass conversion yields. Similar results of salt addition have been reported for other microbial strains (Walter et al. 1987; Bassit et al. 1993). The decrease of growth yields implies that bacteria are devoting an increased proportion of their carbon and energy source for osmotically induced processes, such as, for instance, the uptake of ions and the synthesis of amino acids.

Upon addition of high quantities of NaCl we also observed strong variations in the intracellular content, with a short-term accumulation of sodium and a longer-term increase in amino acids content. During the first 30 min after the osmotic upshock a transient sodium influx from the external medium was found, which raised the intracellular level from 5 to 40 mg/gdry weight. The potassium content, on the other hand, did not change. According to previous studies on the influence of NaCl upshocks, most bacteria, especially *E. coli*, have been found to accumulate potassium ions. Different responses have been reported for *Brevibacterium sp.*(Nagata et al. 1991), for eubacteria (Oren, 1986) and for yeasts (Larsson et al. 1990), which were observed to take up sodium cations.

In a second phase, when the level of sodium ions dropped to its initial low value, *C. glutamicum* was found to accumulate amino acids. There was a slight increase of the intracellular glutamate content, from 60 mg/g to 75 mg/g, when growing the cells at 1.5 osmol.kg^{-1}. This finding is in agreement with previously reported glutamate accumulation in bacteria, such as *Escherichia coli*, grown under high osmotic pressure (Dinnbier et al. 1988). But, most spectacular was the considerable accumulation of proline, rising in about 1 h from 5 mg/g to more than 100 mg/g. Proline accumulation was previously measured with several gram-positive-bacteria exposed to a saline upshock, for instance *Bacillus subtilis* (Whatmore et al. 1990) and

Streptomyces (Killham and Firestone 1984). An increased intracellular pool of proline was also reported when salt was added to *C. glutamicum* grown in shake flasks (Wojcik 1992).

In *Bacillus subtilis*, the intracellular concentrations of both K^+ and proline rose markedly after the osmotic upshock. K^+ influx from the medium was rapid (less than 1 h) but proline synthesis occured at a smaller rate, the maximum level being reached after 5 h. Proline synthesis appeared to be dependent on the prior accumulation of K^+ suggesting that K^+ may in some manner serve as a signal for increased proline synthesis.

Possible mechanisms for increased proline synthesis under high medium osmolality have been suggested. The increased proline production under high medium osmolality is likely to result from a more active metabolism of proline synthesis. Proline is produced from glutamate by a series of three enzyme reactions. In gram-negative-bacteria, the pathway seems to be regulated by an allosteric feed-back inhibition by proline on γ-glutamyl kinase, the first enzyme of the pathway. The enzyme was found to be strongly inhibited at relatively low 5 mM proline concentration (Krishna and Leisinger, 1979).

The regulation of the proline pathway may be different in gram-positive-bacteria. A purification of a γ-glutamyl kinase unaffected by proline has been reported from *Brevibacterium flavum* (Yoshinaga et al. 1975). On the other hand, in *Brevibacterium lactofermentum* Kawahara et al. (1989) have shown that the activity of the pyrroline-5 carboxylate reductase, the third enzyme of the pathway, was increased under osmotic upshock while the γ-glutamyl kinase activity was not modified. From their study with *Bacillus subtilis* Whatmore et al. (1990) suggested that the faster proline synthesis was due first to an activation of the existing enzymes of the proline pathway, and second to a *de novo* synthesis of the involved enzymes.

In conclusion, growing *C. glutamicum* in a high salt concentration medium was found to result in a higher activity of the glutamate and proline synthesis pathway, with, as a consequence, an intracellular accumulation of proline, the end product of the pathway. Additional studies are under way to investigate the effect of elevated salt concentrations on Corynebacteria metabolism when, as performed in industrial glutamate production processes, surfactants are added during the growth phase. This is expected to elucidate the respective role of osmotic pressure and of membrane permeability modifications on the selectivity of the amino acids secretion and, thus, to provide a more rational basis for the optimization of the glutamate production.

References

Bassit N, Cochet N, Lebeault JM (1993) Influence of water activity on *Streptococcus diacetylactis* metabolism. Appl Microbiol Biotechnol 40 : 399-401

Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y, Himdi-Kabbab S, Hamelin J, Blanco C (1993) Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens.* J Gen Microbiol 139 : 129-136

Csonka LN and Hanson AD (1991) Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. Annu. Rev. Microbiol. 45 : 569-606

Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R, Bakker EP (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. Arch Microbiol 150 : 348-357

Frings E, Kunte HJ, Galinski EA (1993) Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* : occurence of tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol Lett 109 : 25-32

Godel H, Seitz P, Verhoef M (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. LC-GC Intl 5, 2 : 44-49

Kawahara Y, Ohsumi T, Yoshihara Y, Ikeda S (1989) Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum.* Agric Biol Chem 53, 9 : 2475-2479

Killham K, Firestone MK (1984) Salt stress control ot intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous to saline soils. Appl Env Microbiol 47 : 301-306

Krämer R, de Graaf A, Eggeling L, Eikmanns B, Sahm H (1994) Biosynthesis and secretion of amino acids in coryneform bacteria. ECB6 : Proceedings of the 6th European Congress in Biotechnology, Elsevier Amsterdam pp 595-602

Krishna R. and Leisinger T. (1979) Biosynthesis of proline in *Pseudomonas aeruginosa.* Biochem. J. 181 : 215-222.

Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. J Bacteriol 172, 4 : 1769-1774

Liebl W, Klamer R, Schleifer KH (1989) Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Appl Microbiol Biotechnol 32 : 205-210

Marquet M, Uribelarrea JL, Huchenq A, Laneelle G, Goma G (1986) Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum* : a study of glutamate accumulation during a fermentation course. Appl Microbiol Biotechnol 25 : 220-223

Mondain-Monval F (1988) Ph D Thesis, INPL, Nancy

Nagata S, Ogawa Y, Mimura H (1991) Internal cation concentrations of the halotolerant bacterium *Brevibacterium sp.* in response to the concentrations and species of external salts. J. Gen. Appl. Microbiol. 37 : 403-414

Ohwada T and Sagisaka S (1988) The differential roles of K+, proline and betaine in osmoregulation of *Escherichia coli* B. Agric. Biol. Chem. 52, 2 : 313-319

Oren A (1986) Intracellular salt concentrations of the anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacterium halobius.* Can J. Microbiol. 32 : 4-9

Rod ML, Alam KY, Cunningham PR, Clark DP (1988) Accumulation of trehalose by *Escherichia coli* K-12 at high osmotic pressure depends on the presence of amber suppressors. J. Bacteriol. 170, 8 : 3601-3610

Walter RP, Morris JG, Kell DB (1987) The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum.* J Gen Microbiol 133 : 259-266

Welsh DT, Reed RH, Herbert RA (1991) The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484 : interaction of trehalose, K^+ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. J Gen Microbiol 137 : 745-750

Whatmore AM, Chudek JA, Reed RH (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solutes pools of *Bacillus subtilis.* J Gen Microbiol 136 : 2527-2535

Wojcik F (1992) Ph. D. Thesis, Orsay, Paris

Yoshinaga F, Tsuchida T, Okumura S (1975) Purification and properties of glutamyl kinases for L-proline and L-glutamine biosynthesis in *Brevibacterium flavum.* Agric Biol Chem 39 : 1269-1273

I.2.2. Chocs osmotiques au-delà de 2 osmol.kg^{-1}

Dans le but de compléter l'étude, nous avons réalisé des cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum* sur toute la gamme de pression osmotique que peut supporter la bactérie. Les cultures ont été effectuées à des osmolalités de 2,2 , 2,7 et 3 osmol.kg^{-1} de la manière décrite dans la publication précédente.

I.2.2.1. Influence d'une osmolarité élevée sur les paramètres de croissance et de consommation du glucose

Comme cela a été décrit précédemment, un ajout de NaCl dans le milieu de culture de *Corynebacterium glutamicum* en phase exponentielle de croissance entraîne une diminution de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) et du rendement de conversion du glucose en biomasse ($R_{X/S}$) (*cf* Figure n°III.1). Ainsi le μ_{max} chute d'un maximum de 0,67 h^{-1} (0,4 osmol.kg^{-1}) à une valeur de 0,08 h^{-1} (3 osmol.kg^{-1}). Le rendement de croissance diminue alors de 0,6 g/g (0,4 osmol.kg^{-1}) à une valeur de 0,27 g/g (3 osmol.kg^{-1}). *C. glutamicum* peut donc croître sur des milieux ayant des osmolalités légèrement supérieures à 3 osmol.kg^{-1}. Par extrapolation, l'osmolalité limite de croissance sur milieu BMCG est estimée à 3,25 osmol.kg^{-1}.

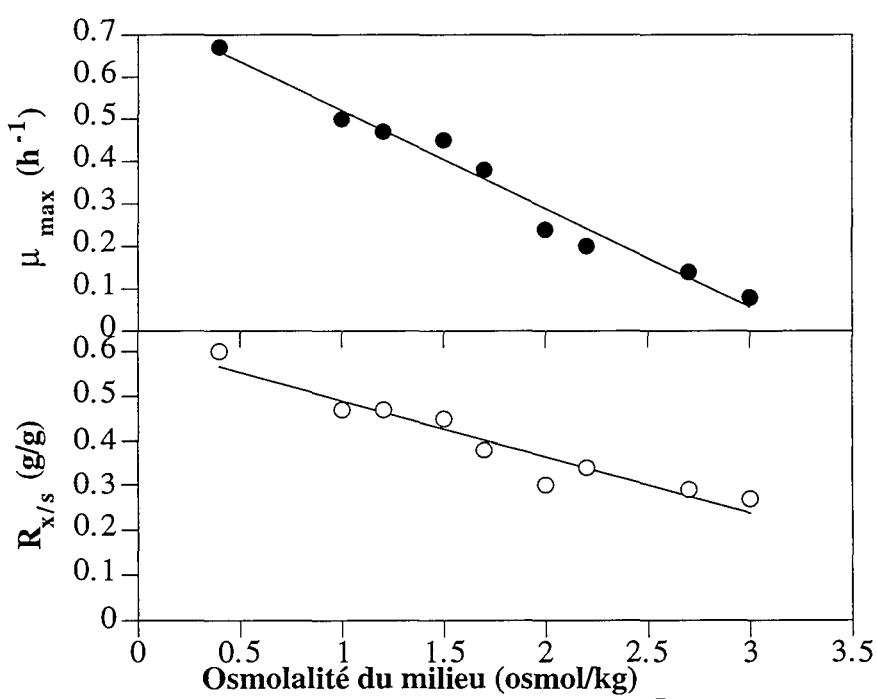


Figure III.1 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le taux maximum de croissance et le rendement de croissance sur glucose de *Corynebacterium glutamicum* cultivée en milieu BMCG.

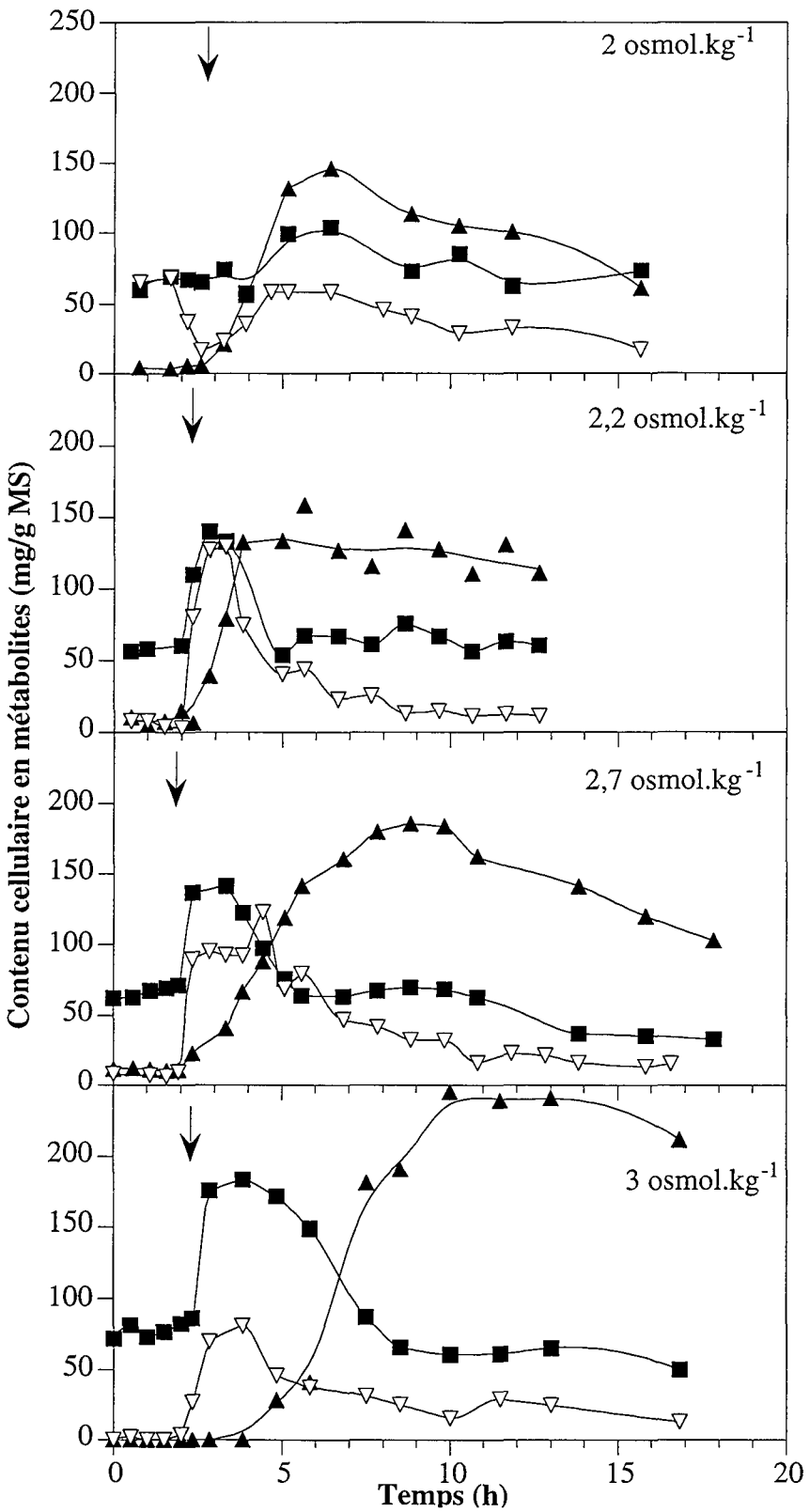


Figure n°III.2 : Effet d'un choc osmotique sur le contenu cellulaire en acide glutamique (■), proline (▲) et tréhalose (▽) de C. glutamicum ATCC 17965. La fermentation a débuté à 0,4 osmol.kg^{-1} puis du NaCl (flèche) a été ajouté au milieu de manière à élever l'osmolalité à 2, 2,2 , 2,7 et 3 osmol.kg^{-1}.

I.2.2.2. Cinétiques d'accumulation des acides aminés et tréhalose

Les cinétiques d'accumulation des acides aminés et du tréhalose de *Corynebacterium glutamicum* cultivée sur milieux à 2 , 2,2 , 2,7 et 3 osmol.kg^{-1} sont présentées Figure n°III.2. Après l'ajout de NaCl dans le milieu de culture, la teneur intracellulaire en proline augmente de manière importante pour atteindre un plateau de quelques heures. Ainsi à 3 osmol.kg^{-1}, la teneur intracellulaire en proline est de 240 mg/g matière sèche.
Jusqu'à des osmolalités de 2 osmol.kg^{-1}, aucune accumulation d'acide glutamique n'avait été observée chez *Corynebacterium glutamicum* après l'ajout de NaCl. Au-delà de cette pression osmotique, une accumulation transitoire de glutamate intracellulaire a lieu à la suite du choc osmotique. Ensuite la teneur intracellulaire en glutamate se stabilise à sa valeur initiale.

Une accumulation transitoire de tréhalose est également observée.

La Figure n°III.3 présente les valeurs maximales des pools intracellulaires en proline, acide glutamique et tréhalose en fonction de l'osmolarité du milieu de culture. Le pool maximal en proline augmente linéairement avec la pression osmotique du milieu. Celui d'acide glutamique reste constant jusqu'à 2 osmol.kg^{-1}, au-delà il augmente avec l'osmolarité croissante. Enfin, du fait de la disparité des contenus en tréhalose sur la Figure n°III.3, il est difficile de se prononcer sur une éventuelle relation entre l'osmolarité du milieu et le pool en tréhalose.

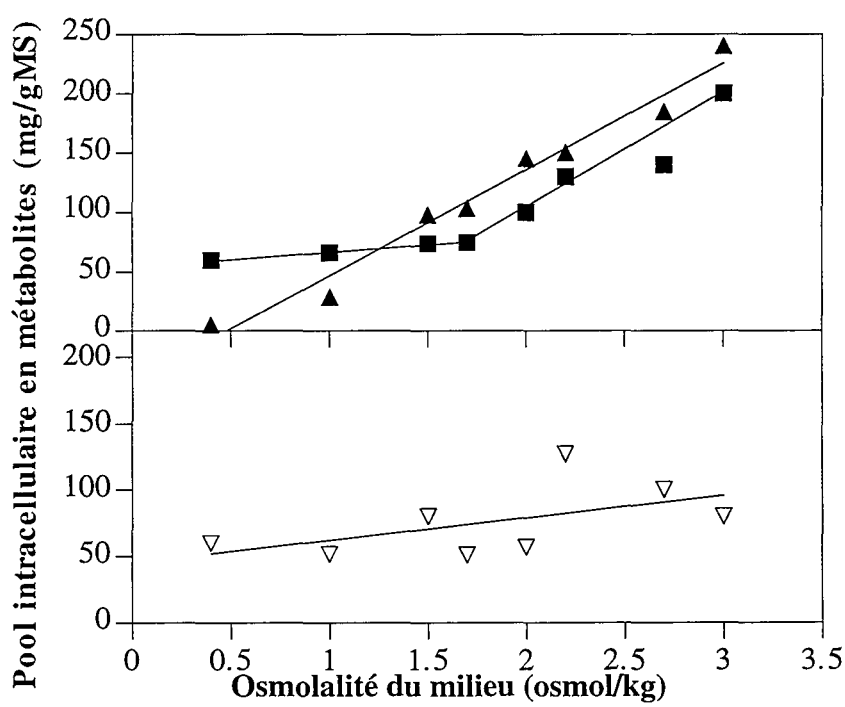


Figure n°III.3 : Effet de l'osmolalité du milieu sur le contenu cellulaire maximal en acide glutamique (■), proline (▲) et tréhalose (▽).

I.2.2.3. Influence de la pression osmotique sur les vitesses spécifiques d'accumulation des acides aminés

Les vitesses spécifiques maximales d'accumulation interne de proline et de glutamate sont présentées Figure n°III.4. La vitesse spécifique maximale d'accumulation de proline augmente avec l'osmolarité du milieu de culture jusqu'à 1,5 osmol.kg^{-1} puis elle reste proche d'une valeur de 70 mg/g.h pour des osmolarités allant de 1,5 à 3 osmol.kg^{-1}. A l'inverse, celle du glutamate est stabilisée à une valeur d'environ 45 mg/g.h chez les bactéries cultivées jusqu'à 2 osmol.kg^{-1}, puis augmente avec l'osmolarité du milieu.

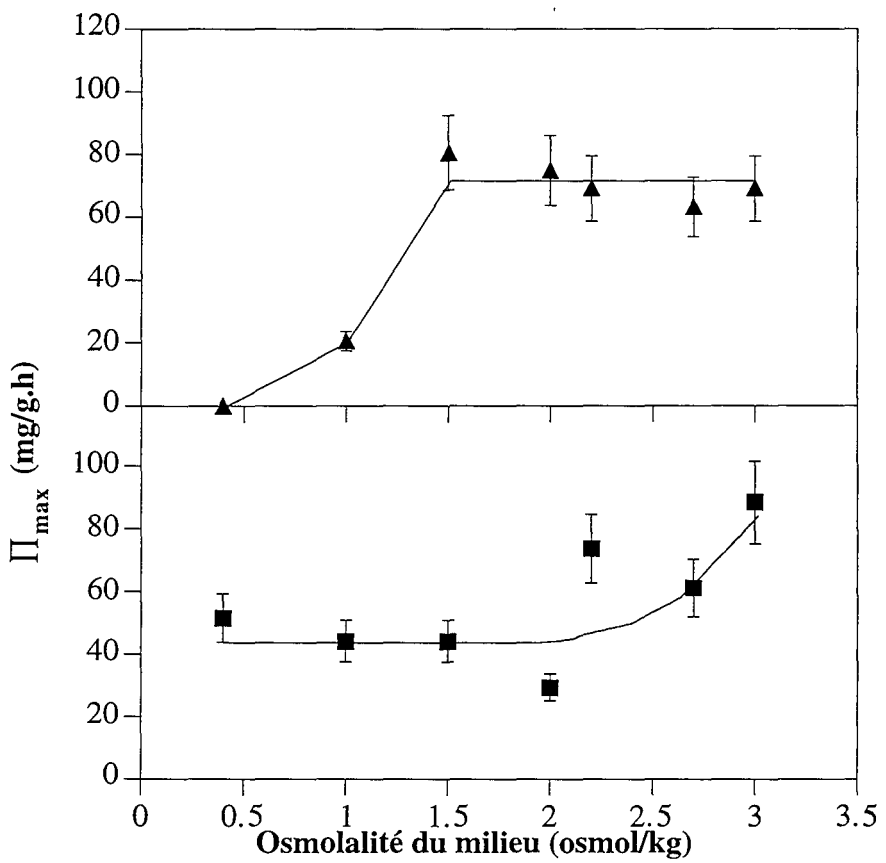


Figure n°III.4 : Effet de l'osmolalité du milieu sur les vitesses spécifiques maximale d'accumulation de proline (▲) et d'acide glutamique (■).

I.2.2.4. Influence du choc osmotique sur le niveau d'enzymes synthétisant le glutamate

Dans le but de mieux comprendre l'accumulation transitoire de glutamate aux très fortes pression osmotiques, le taux des enzymes pouvant synthétiser l'acide glutamique a été mesuré sur

une culture discontinue à 2,7 osmol.kg^{-1}. Les enzymes dosées, pouvant être responsable de la synthèse de glutamate, sont :

- la glutamate deshydrogénase (gdh)
- la glutamine amide 2 oxoglutarate amino transférase (gogat)
- l'aspartate transaminase

Ces activités enzymatiques *in vitro* ont été mesurées sur des bactéries prélevées une heure avant le choc osmotique, puis une heure et 9 heures après. Les résultats sont reportés dans le Tableau n°III.1.

Activités spécifiques (µmole/min.mg protéines)	Période de prélèvement des bactéries par rapport à l'ajout du NaCl		
	1 heure avant	1 heure après	9 heures après
gdh	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,5
gogat	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,1 ± 0,03
aspartate transaminase	1 ± 0,15	1± 0,15	1,2 ± 0,2

Tableau n°III.1 : Mesures des activités spécifiques enzymatiques au cours d'une culture discontinue de *C. glutamicum* ATCC 17965 soumise à un choc osmotique de 0,4 à 2,7 osmol.kg^{-1} après un ajout de NaCl. *Nombre de déterminations indépendantes : 4.*

Ces résultats montrent que la glutamate deshydrogénase est l'enzyme présente en plus grande quantité chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965. Par ailleurs il n'apparaît, au cours de la culture, aucune variation significative de la quantité des trois enzymes dosées.

I.2.2.5. Conclusion

Corynebacterium glutamicum ATCC 17965 peut croître sur milieu BMCG jusqu'à une pression osmotique de l'ordre de 3,2 osmol.kg^{-1}. Un ajout de NaCl dans le milieu de culture entraîne une diminution de la vitesse spécifique maximale de croissance et du rendement de croissance.

Au cours de la phase de croissance sous forte osmolarité, la bactérie accumule de manière importante de la proline. La teneur intracellulaire de proline passe alors de 5 à 240 mg/g biomasse

sèche pour des osmolalités respectives de 0,4 et 3 osmol.kg^{-1}. Le pool d'acide glutamique reste constant chez des bactéries cultivées jusqu'à 2 osmol.kg^{-1}, au-delà *C. glutamicum* accumule du glutamate de manière transitoire et dépendante de la pression osmotique du milieu.

Le dosage de la quantité intracellulaire de la glutamate deshydrogénase (gdh), de la glutamate synthase (gogat) et de l'aspartate transaminase au cours d'une culture discontinue à 2,7 osmol.kg^{-1} montre que cette accumulation transitoire d'acide glutamique n'est pas dûe à une synthèse accrue de ces enzymes.

II. Influence de la nature de l'osmolyte dépresseur sur la réponse osmotique de *C. glutamicum* ATCC 17965

Ce paragraphe est présenté sous forme de projet de publication.

S. Guillouet, F. Duperray and J.M. Engasser

Responses of *Corynebacterium glutamicum* to osmotic upshocks by NaCl, KCl, galactose, sorbitol and glycerol

Abstract : The growth of *Corynebacterium glutamicum* in batch cultures was investigated following an osmotic upshock from 0.4 to 1.5 osmol.kg^{-1} by NaCl, KCl, galactose, glycerol and sorbitol. In all cases the hyperosmotic stress resulted both in a lower specific growth rate and glucose-to-biomass conversion yield. But these reductions were less pronounced when the osmotic pressure was increased by the permeant osmolytes (glycerol, sorbitol) than by the non-permeant osmolytes (NaCl, KCl, galactose). The addition of NaCl, KCl or galactose resulted in a similar accumulation of proline from 5 to 100 mg/g of cell dry weight. On the contrary, there was no internal proline increase upon the addition of glycerol that diffuses freely inside the cells. After the osmotic stress by sorbitol, which was found to penetrate partly the cells, an intermediate proline accumulation of 50 mg/g cell dry weight was observed. When the osmotic pressure was increased to 1.5 osmol.kg^{-1} by mixtures of glycerol and NaCl, the internal proline content was found to linearly decrease with increasing external concentration of glycerol. Consequently, this comparative study on the influence of different osmotic stress on *C. glutamicum* clearly demonstrates that the growth reduction and the internal accumulation of proline mainly depends on the ability of the added osmolyte to be taken up by the cells.

Introduction

The osmoregulation of Corynebacteria has been receiving increasing attention with respect to the possible stimulating effect of high osmotic pressures on the synthesis of amino acids, namely proline and glutamate, or other metabolites, such as trehalose. In batch cultures of *C. glutamicum*, the addition of NaCl to the medium during the initial growth phase was reported to result in a decrease of both the specific growth rate and the glucose-to-biomass conversion yield

(Guillouet and Engasser, 1995 a). Moreover, the analysis of the intracellular pool indicated a transient uptake of Na^+ followed by a fast increase in the proline content. The level of glutamic acid remained relatively constant. An important accumulation of proline was also reported when *C. glutamicum* was exposed to hyperosmotic stress of NaCl in glucose-limited continuous cultures. Under these conditions there was a concommitant rise in trehalose content (Guillouet and Engasser, 1995 b).

The question may be addressed whether the osmotic response of *C. glutamicum* is or not dependent on the nature of the osmolyte added to the external medium. Previous studies have shown, for instance, that the growth of *Clostridium pasteurianum* was differently inhibited depending on the depressor osmolyte. At equal osmolarities, the permeant solutes glycerol and acetamide were less growth-inhibitory than non-permeant solutes, namely KCl and xylitol (Walter et *al.* 1987). Likewise the nature of the osmolyte was shown to affect the synthesis of compatible solutes sush as trehalose in *E. coli* (Welsh et *al.* 1991) and pipecolic acid in *Brevibacterium ammoniagenes* (Gouesbet et *al.* 1992); the addition of glycerol, for example, did not induce any synthesis of compatible solutes. Recently Skjerdal et *al.* (1995) reported similar reductions in growth rate, respiration rate, cytoplasmic and total cell volume in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*.

In this study the osmotic response of *C. glutamicum* was studied when the external osmotic pressure was raised by different permeant and non permeant osmolytes. In addition to the previously investigated NaCl, we studied the influence of another ionic species, KCl, because of the reported osmoregulation effects of potassium ions (Csonka and Hanson 1991). We also investigated the response of *C. glutamicum* upon the addition, in batch cultures, of a non-ionic impermeant osmolyte, namely galactose, and of two permeant osmolytes, glycerol and sorbitol. Glycerol was shown to be a freely permeant compound in Gram positive and Gram-negative bacteria, such as *E. coli* (Alemohammad and Knowles 1974), *Clostridium pasteurianum* (Walter et *al.* 1987) and *Brevibacterium ammoniagenes* (Gouesbet et *al.* 1992). Sorbitol, on the other hand, was reported to penetrate only the cell wall and the periplamic gel (Skjerdal et *al.* 1995). For the five investigated osmolytes the osmotic responses were characterized in terms of effects on the specific growth rate, on the glucose-to-biomass conversion yield and on the intracellular accumulation of compatible solutes.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and medium composition

Corynebacterium glutamicum melassecola (strain ATCC 17965), given by ORSAN (Paris, France) was grown in the modified basal medium for *Corynebacterium* growth (Liebl et al. 1989). Catechol was replaced by a mixture containing nicotinic acid, *myo*-inositol, panthotenic acid, choline chloride and deferoxamine at a concentration of 3 mg/l each. Biotin and thiamine hydrochloride were used respectively at 30 µg/l and 2 mg/l. Glucose at 20 g/l concentration was the sole energetic and carbon source.
No growth was observed on basal medium with glycerol, galactose or sorbitol as sole energetic and carbon source.

Fermentation conditions

Responses to hyperosmotic stress were determined in batch cultures. A 60 ml overnight culture of *Corynebacterium glutamicum* in basal medium was used to inoculate a 2 l SGI (Toulouse, France) fermentor containing 1 l of basal medium. The culture was grown at 35°C with an aeration rate of 50 l/h. The pH was regulated at 7.3 by adding NaOH 4N solution. All the batch cultures were started at an osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}. After 2 to 4 h of fermentation, the medium osmolality was increased to 1.5 osmol.kg^{-1} by the addition of either 40 g of NaCl, 50 g KCl, 180 g galactose, 85 g glycerol or 150 g sorbitol. For the different cultures the maximum specific growth rates were determined from the semi-logarithmic plot of the measured optical density versus time.
Five additional shake flasks cultures were carried out in which the osmotic pressure was raised from 0.4 to 1.5 osmol.kg^{-1} by addition of mixtures with different proportions (g/g) of glycerol and NaCl: 0/40, 23/29, 46/18, 69/7 and 85/0. The glycerol concentration in the medium weas respectively 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 0.92M.

Analyses

During the fermentation, samples were collected and centrifuged. The biomass concentration was determined by the dry cell weight method. Sugars analyses were performed on the supernatant by HPLC (Waters model 712, St Quentin, France) using a Brownlee Polypore H column, operated at 65°C and with H_2SO_4 (0.02 M) elution, a UV detector and a refractometer as detectors.

For the extraction of intracellular metabolites, cell samples were first centrifuged for 2 minutes (6000 g, 4°C). The cell pellet was collected and extracted by suspending in cold distilled water for 15 minutes followed by three freezing-thawing cycles. The biomass concentration in cold water was set at 5 g dry weight/l. The suspension was then centrifuged for 2 minutes (7000 g, 0°C) and the analysis of intracellular metabolites performed on the supernatant. After derivatization with *ortho*-phtaldialdehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) reagents, amino acids were analyzed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al. 1992). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 5% for proline and 15% for glutamate.
Free intracellular trehalose of the cell extract was measured following enzymatic hydrolysis to glucose by a purified trehalase (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). The reaction mixture containing trehalase ($4x10^{-3}$ U) and cell extract in 20 mM phosphate buffer (pH 5.7) was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. Glucose was measured enzymatically by the glucose oxidase/peroxidase method (Sigma). A blank without trehalase was realized to evaluate the possible contamination with glucose from the culture medium or from the intracellular medium. The concentration of trehalose

in the extract was calculated from a standard curve prepared with trehalose (Sigma). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 15%.

The water content of *C. glutamicum* needed to the calculation of the intracellular sorbitol concentration was determined by the method described by Larroche et al. (1993) and was found to 1.87 µl/g cell dry weight.

The osmotic pressure of the medium was measured with a cryoscopic osmometer Hermann Roebling (Berlin, Germany).

Uptake of labelled osmolytes

[U - ^{14}C]sorbitol (8 GBq.mmol^{-1}) and [U - ^{14}C]galactose (11.4 GBq.mmol^{-1}) (DuPont, Les Ullis, France) were used to examine the possible entry of sorbitol and galactose in *Corynebacterium glutamicum* . Cells used were grown during 5 hours, harvested by centrifugation (7000g, 3°C for 5 minutes) and concentrated to 24 g dry weight/l in fresh medium. For sorbitol diffusion, 0.4 ml of a concentrated sorbitol solution (70%, w/w), containing labelled sorbitol (1.7 x 10^4 d.p.m.), was added to 1.4 ml of the bacteria suspension. In these conditions the medium osmolality was 1.5 osmol.kg^{-1}. Similarly for galactose diffusion, 0.65 ml of a concentrated galactose solution (50%, w/w), containing labelled galactose (3.7 x 10^4 d.p.m.), was added to 1.1 ml of the bacteria suspension. These suspensions were kept at 35°C under agitation and samples (0.1 ml) were taken at intervals during 5 minutes and rapidly filtered on Whatman glass fiber filters (Maidstone, England). The filters were washed twice with 5 ml of basal medium containing 0.9 M sorbitol or 1.1 M galactose and introduced in scintillation vials containing 10 ml of liquid scintillation cocktail ReadySafe™ (Beckman, Fullerton, USA). Radioactivities were determined using a Beckman scintillation analyzer (Fullerton, USA).

RESULTS

Effect of osmotic upshocks on growth kinetics

When *C. glutamicum* was initially grown at an osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1} and then subjected to the addition of either NaCl, KCl, galactose, glycerol or sorbitol to increase the medium osmolality to 1.5 osmol.kg^{-1}, a reduction of the specific growth rate from the initial value of 0.67 h^{-1} was observed in all cases (Table 1). Strongest effects, namely a reduction to 0.44 h^{-1}, corresponded to the addition of NaCl, KCl, and galactose. At the same time, the conversion yield of glucose-to-biomass decreased from 0.65 g/g to 0.45 g/g. Reductions in both the specific growth rate and the conversion yield were less important when glycerol or sorbitol were added to increase the osmotic pressure.

Osmolyte	Medium osmolality ($osmol.kg^{-1}$)	Maximum growth rate (h^{-1})	Growth yield (g/g)
No osmolyte	0.4	0.67	0.65
NaCl	1.5	0.44	0.45
KCl	1.5	0.42	0.46
Galactose	1.5	0.45	0.43
Sorbitol	1.5	0.49	0.5
Glycerol	1.5	0.53	0.62

Table 1 : Maximum specific growth rate and glucose-to-biomass conversion yield for *Corynebacterium glutamicum* grown on a defined medium when the external osmotic pressure was raised to 1.5 $osmol.kg^{-1}$ by different osmolytes.

The uptake of added osmolytes

After a hyperosmotic stress, cells tend to increase their internal osmotic pressure either by the uptake of external solutes or by *de novo* synthesis of metabolites. Considering the uptake of solutes from the culture medium, the results are very different depending on the added osmolyte. Measurements of intracellular sodium upon a NaCl upshock showed a rapid but transient influx of sodium: the level that was initially at 5 mg/g rose in a few minutes to 40 mg/g and then came back to 5 mg/g. Similarly, in the case of KCl addition, the potassium level increased to 45 mg/g dry weight and subsequently returned to its initial level at 25 mg/g dry weight. No accumulation of either Na^+ or K^+ was observed when galactose, glycerol and sorbitol were used to increase the medium osmolality.

The extent of cellular uptake was very different for the non-ionic osmolytes. Glycerol is known to freely diffuse into the cells and reached then an equilibrium concentration between external and internal glycerol concentrations. According to the isotope distribution experiments, galactose was totally excluded by *C. glutamicum*. Sorbitol, on the other hand, was found to penetrate the bacteria: the internal content was found at 100 mg/g dry weight for an external concentration of $150g.l^{-1}$.

The synthesis of accumulated metabolites

In a second step we investigated the possible effects of hyperosmotic stress on the synthesis of intracellular metabolites, and thus measured the time variations of the intracellular content of glutamate, proline and trehalose (Figure 1). Similar trends were found for the three non-permeant osmolytes NaCl, KCl and galactose. Most important was the fast and strong increase of the proline content. Whereas it was very low, around 5 mg/g dry weight at 0.4 osmole.kg^{-1}, it quickly rose to 100 mg/g dry weight when the medium osmolality was increased to 1.5 osmole.kg^{-1}. At the same time the glutamic acid content, initially at 60 mg/g, increased up to around 80 mg/g dry weight. A slight increase was also observed for the trehalose content: it increased from 30 to 80 mg/g dry weight upon NaCl addition, and from 15 to 50 mg/g dry weight upon KCl or galactose addition.

After a hyperosmotic sorbitol stress, proline, glutamic acid and trehalose were also found to accumulate inside the cells, but to a lower extent than in the previous cases. Proline rose from 5 to 55 mg/g dry weight, glutamic acid from 60 to 80 mg/g dry weight, and trehalose from 20 to 40 mg/g dry weight

Different patterns of metabolites accumulation occured upon glycerol addition. Most interestingly, there was no increase in the proline level, which remained at a low 5 mg/g dry weight during the whole fermentation. Glutamic acid also stayed constant at 80 mg/g dry weight, whereas trehalose slightly decreased from 20 to 10 mg/g dry weight.

Effect of the addition of glycerol/NaCl mixtures on the proline accumulation.

In order to further investigate the strikingly different effects of NaCl and glycerol on metabolites synthesis, additional growth experiments were performed in shake flasks by simultaneously adding different proportions of the two solutes to raise the osmotic pressure from 0.4 to 1.5 osmol.kg^{-1}. Figure 2 indicates the resulting intracellular levels of proline, glutamic acid and trehalose measured four hours after the osmotic upshock, as a function of the glycerol concentration in the culture medium. As seen, proline decreased from 100 to 5 mg/g dry weight with increasing external glycerol concentration. On the other hand, the glutamic acid content remained constant, whereas the trehalose content decreased with increasing glycerol concentration. The lower trehalose content observed in these experiments may be due to differences in culture conditions between a controlled fermentor and shake flasks.

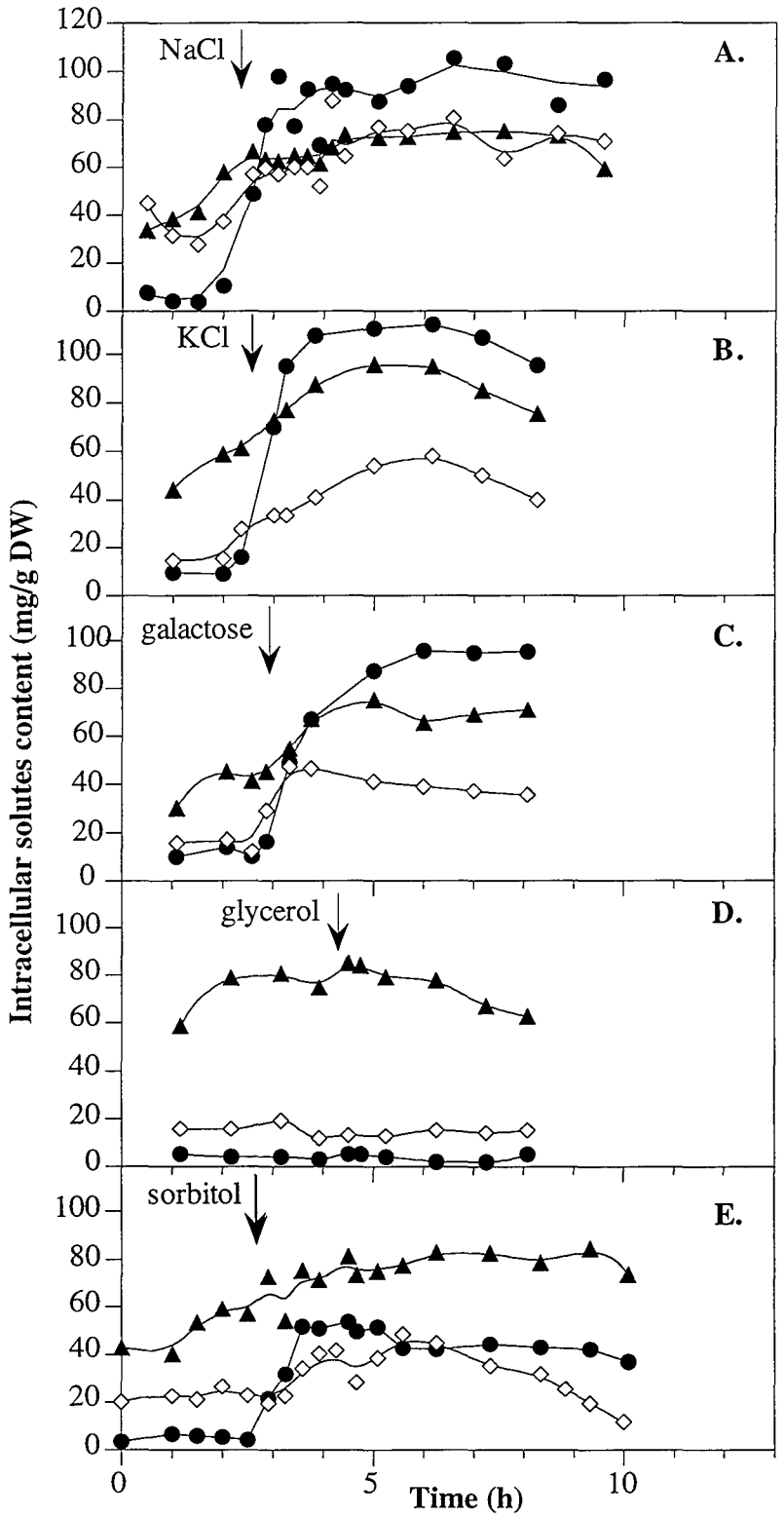


Fig. 1 : Effect of an osmotic upshock by NaCl (**A**), KCl (**B**), galactose (**C**), glycerol (**D**) or sorbitol (**E**) on the intracellular ▲ glutamic acid, ● proline and ◇ trehalose content of *C. glutamicum*. The fermentation was started at a medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1} and the osmolyte was added (*arrow*) to rise the osmotic pressure to 1.5 osmol.kg^{-1}.

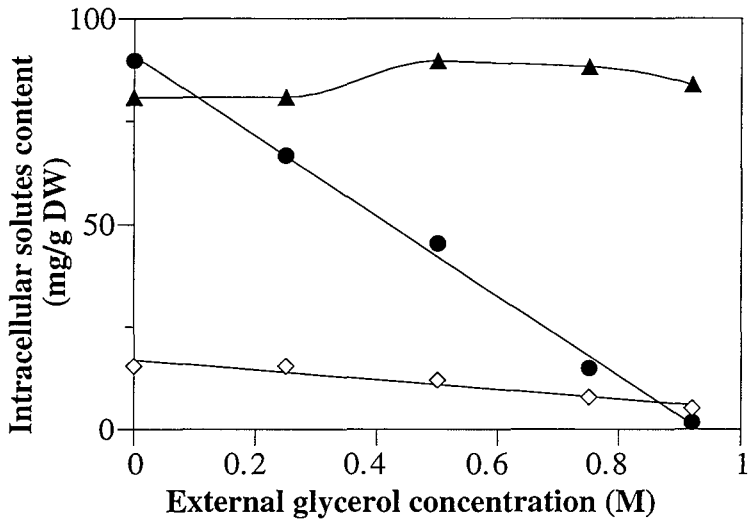


Fig. 2 : Effect of the external glycerol concentration on the intracellular ▲ glutamic acid, ● proline and ◇ trehalose content of *C. glutamicum*. The bacteria were grown at a medium osmolality of 1.5 osmol.kg^{-1} adjusted by the addition of a mixture of glycerol and NaCl.

DISCUSSION

This study on the growth of *C. glutamicum* following hyperosmotic stress by NaCl, KCl, galactose, glycerol and sorbitol clearly demonstrated that the bacteria response mainly depends on the ability of the added osmolyte to be taken up by the cells.

Strongest effects were obtained with the three non-permeant solutes: NaCl, KCl, and galactose. In the two hours following the osmotic shock, the major response of the bacteria was to increase its internal osmotic pressure by accumulating high levels of proline, up to 110 mg/g dry weight. The contents in glutamic acid and trehalose also increased, but to a lower extent. Globally the adaptation to osmotic stress resulted in a lower specific growth rate and a reduced glucose-to-biomass conversion yield. The similarities of effects obtained with these ionic and non-ionic osmolytes indicate that the bacteria response is the result of an increased osmotic pressure and not of a higher ionic strength of the culture medium. Moreover, in contrary to previously published results on enteric bacteria (Booth and Higgins 1990), Na^+ and K^+ do not appear to play a significant osmoregulatory role in *C. glutamicum*.

When the osmotic upshift was produced by glycerol, cells were able to increase their internal osmotic pressure by taking up glycerol. Under these conditions, a higher accumulation of

other compatible solutes, such as proline, glutamate or trehalose, was not necessary to raise the osmotic pressure, and their concentrations remained at their initial level.

After an hyperosmotic shock by sorbitol, *C. Glutamicum* accumulated 55 mg/g dry weight proline, which was intermediate between the results obtained for the non-permeant and the totally permeant osmolytes. This can be explained by the particular behaviour of sorbitol in terms of cellular uptake. If one assumes that sorbitol crosses the cytoplasmic membrane, the intracellular sorbitol concentration can be estimated around 0.3 M, which is lower than the 0.83 M sorbitol added in the medium. Interestingly, a similar accumulation of 55 mg proline/g dry weight was also observed when the osmotic shock was produced by a NaCl/glycerol mixture containing 0.35 M glycerol. On the other hand, if sorbitol is assumed to diffuse freely through the cell wall but not through the cytoplasmic membrane, assuming equilibrium between the external and internal concentrations one can calculate that cellular sorbitol occupies about 35% of the whole cell volume. This seems to correspond to the bacterial non-cytoplasmic volume occupied by the cell wall and the periplasmic gel (Skjerdal et *al.* 1995). In all cases, the observed intermediary accumulation of proline appears to be related to a limited penetration of sorbitol into the bacteria.

An additional finding of the study was that the reduction in growth rate following a hyperosmotic shock was less pronounced when the osmotic pressure was increased by a permeant than by a non-permeant osmolyte. These results are consistent with previously reported observations of lower reductions in growth rate and cytoplasmic volumes in *C. glutamicum* and *Brevibacterium lactofermentum* under glutamic acid or betaine stress than under NaCl stress (Skjerdal et *al.* 1995). Identical observations were also reported in *Clostridium pasteurianum* (Walter et *al.* 1987), *Brevibacterium ammoniagenes* (Gouesbet et *al.* 1992).

In conclusion, this comparative study of the effect of various osmotic stress on *C. glutamicum*, together with previous investigations, provides a comprehensive understanding of the osmoregulatory processes of the bacteria. After a hyperosmotic shock, the short-term response of the bacteria to balance the increased outer osmotic pressure is a fast water efflux, causing a reduction in cell and cytoplamic volume. The second step in adaptation to hyperosmotic stress, which may run for several hours after shock, is the internal accumulation of low molecular weight components. The preference for the cell is to take up osmoprotective compounds present in the medium, such as glycerol and betaine. If such substances are not available, cells can trigger the synthesis of several compatible osmolytes. Whereas proline appears as the preferentially produced osmoprotectant in *C. glutamicum*, significant quantities of

trehalose can also be accumulated when, for genetic or environmental reasons, the synthesis of proline is impaired. All these osmoregulatory mechanisms allow *C. glutamicum* to grow at relatively high osmotic pressures.

ACKNOWLEDGMENT

This research was sponsored by the CNRS Groupement de Recherche 1157 on Corynebacteria and by the Orsan Company.

REFERENCES

Alemohammad MM, Knowles CJ (1974) Osmotically induce volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol into the cell. J Gen Microbiol 82 : 125-142

Booth IR, Higgins CF (1990) Enteric bacteria and osmotic stress : intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress ? FEMS Microbiol Rev 75 : 239-246

Collins MD (1987) Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes*. Int J Syst Bacteriol 37 : 442-443

Csonka LN and Hanson AD (1991) Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. Ann Rev Microbiol 45 : 569-606

Godel H, Seitz P, Verhoef M (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. LC-GC Int 5, 2 : 44-49

Gouesbet G, Blanco C, Hamelin J and Bernard T (1992) Osmotic adjustment in *Brevibacterium ammoniagenes* : pipecolic acid accumulation at elevated osmolalities. J Gen Microbiol 138 : 959-965

Guillouet S, Engasser JM (1995 a) Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. Appl Microbiol Biotechnol 43 : 315-320

Guillouet S, Engasser JM (1995 b) Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose Appl Microbiol Biotechnol In Press.

Larroche C, Besson I, Dussap CG, Bourrust F, Gros JB (1993) Characterization of water distribution in cell pellets using nonlabeled sodium thiosulfate as an interstitial space marker. Biotechnol Progress 9 : 214-217

Liebl W, Klamer R, Schleifer KH (1989) Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Appl Microbiol Biotechnol 32 : 205-210

Skjerdal OT, Sletta H, Flenstad SG, Josefsen KD, Levine DW and Ellingsen TE (1995) Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol 43 : 1099-1106

Walter RP, Morris JG, Kell DB (1987) The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. J Gen Microbiol 133 : 259-266

Welsh DT, Reed RH, Herbert RA (1991) The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484 : interaction of trehalose, K^+ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. J Gen Microbiol 137 : 745-750

III. Etude de la réponse osmotique de *C. glutamicum* ATCC 14752

Une étude a été réalisée sur une autre souche de *Corynebacterium glutamicum* : ATCC 14752. Cette bactérie est, en effet, la souche mère des souches recombinées étudiées dans la suite de ce travail. L'effet d'un choc hyperosmotique par ajout de NaCl a été étudié sur les cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites chez la souche ATCC 14752.

III.1. Etude de la réponse osmotique de la souche ATCC 14752 en milieu BMCG

III.1.1. Cinétiques de croissance et de consommation de glucose de la souche ATCC 14752 après un choc osmotique

Les cinétiques de croissance et de consommation de glucose au cours d'une culture de la souche ATCC 14752 sont présentées Figure n°III.5. Elle a été réalisée, d'une part, sur milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}, et d'autre part, avec un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} par addition de NaCl dans le milieu. Cet ajout de NaCl entraîne un arrêt momentané de la croissance qui reprend ensuite jusqu'à consommation totale du glucose. La vitesse spécifique maximale de croissance diminue d'une valeur de 0,44 h^{-1} (à 0,4 osmol.kg^{-1}) à une valeur de 0,2 h^{-1} (à 1,5 osmol.kg^{-1}).

III.1.2. Cinétiques d'accumulation des métabolites

Après l'ajout de NaCl dans le milieu, le contenu intracellulaire en sodium augmente très rapidement tandis que celui de potassium ne varie pas (cinétiques non montrées). Cette accumulation est transitoire comme il a été précédemment observé chez la souche ATCC 17965.

Une accumulation de proline intracellulaire est observée chez la souche ATCC 14752 en réponse au choc osmotique (cf Figure n°III.5). Le pool intracellulaire de proline atteint une valeur de 50 mg/g biomasse sèche. La vitesse spécifique maximale d'accumulation de proline est alors de 25 mg/g.h.

Le pool intracellulaire en acide glutamique augmente rapidement et de manière transitoire, suite à l'addition de NaCl dans le milieu, jusqu'à une valeur de 140 mg/g matière sèche puis revient à sa valeur initiale.

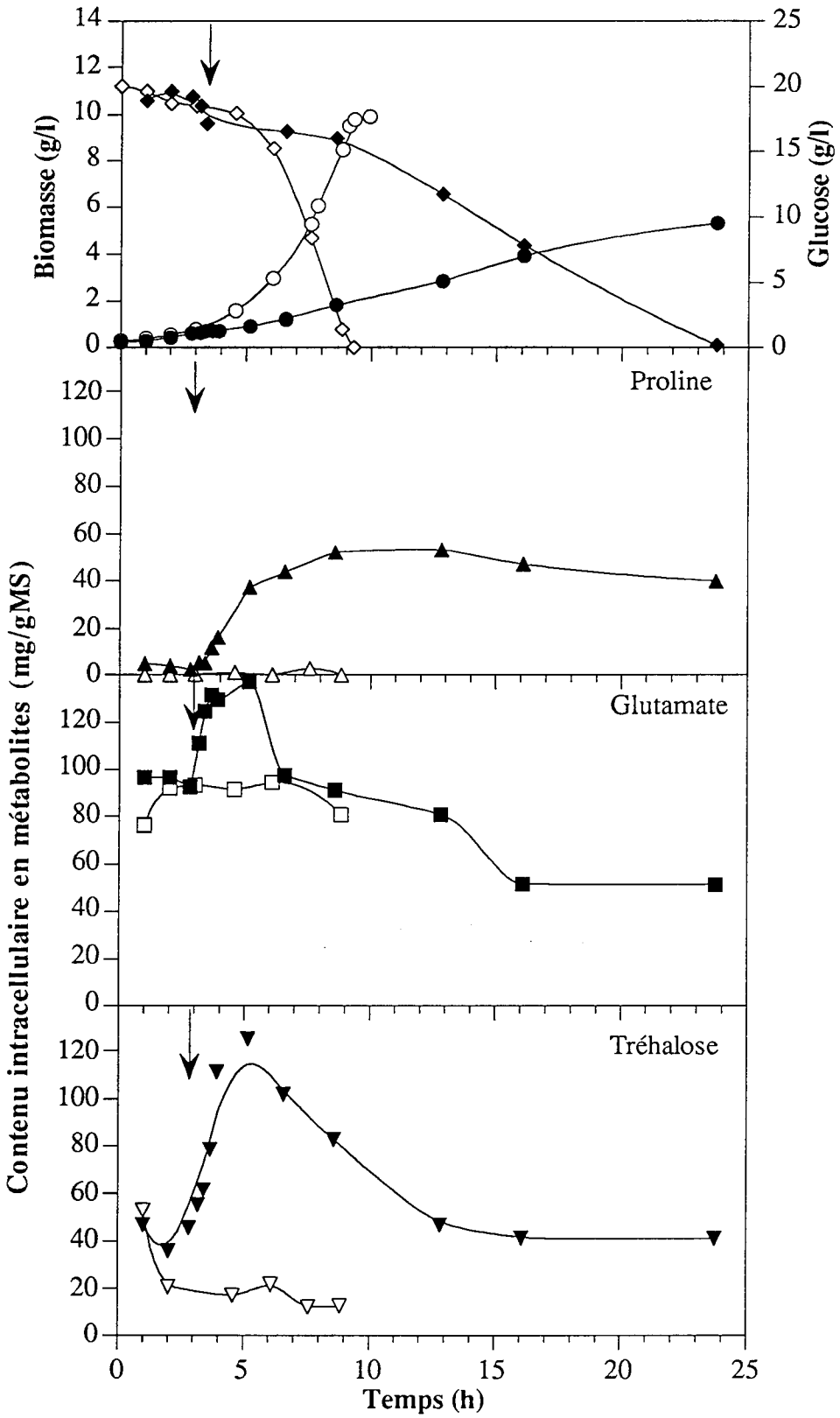


Figure n°III.5 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites sur une culture de *C. glutamicum* ATCC 14752 à 0,4 osmol.kg^{-1} (blanc) et à 1,5 osmol.kg^{-1} (noir) après addition de NaCl (flèche) : Biomasse (●○), glucose (◆◇)

Une accumulation de tréhalose est observée de 40 mg/g matière sèche à 120 mg/g matière sèche à la suite du choc osmotique, puis le pool diminue jusqu'à sa valeur initiale.

III.1.3. Comparaison avec la souche ATCC 17965

A titre de comparaison, les paramètres de croissance ainsi que les contenus intracellulaires en métabolites sont regroupés dans le Tableau n°III.2 pour les deux souches.

Corynebacterium glutamicum ATCC 14752 possède un taux de croissance maximal sur milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1} (0,44 h^{-1}) inférieur à celui de la souche ATCC 17965 (0,67 h^{-1}) (*cf* Figure n°III.6). Cette observation est également valable pour des cultures à osmolarité élevée. Par extrapolation, l'osmolalité limite de croissance de la souche ATCC 14752 est de l'ordre de 2,5 osmol.kg^{-1}, alors qu'elle est de 3,2 osmol.kg^{-1} pour l'autre souche. De même les rendements de conversion du glucose en biomasse sont inférieurs chez la souche ATCC 14752 à osmolarité équivalente par rapport à l'autre souche.

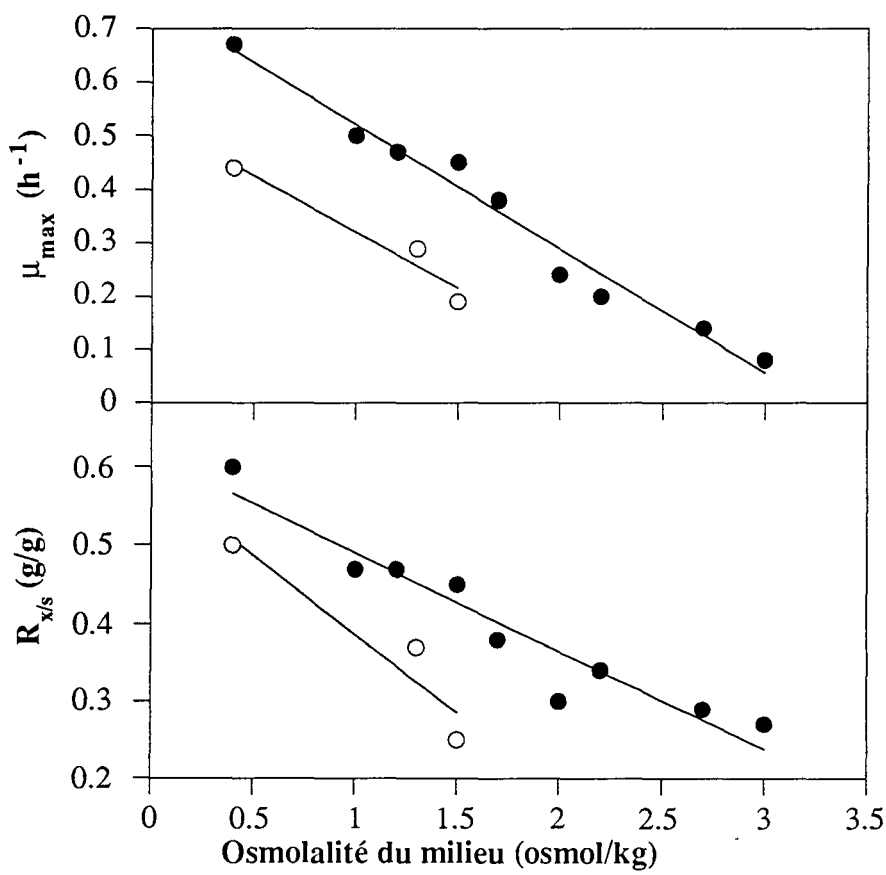


Figure n°III.6 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le taux maximum de croissance et le rendement de croissance sur glucose chez *C. glutamicum* ATCC 17965 (●) et 14752 (○).

		ATCC 17965		ATCC 14752	
		0,4 Osm	1,5 Osm	0,4 Osm	1,5 Osm
	μ_{max} (h^{-1})	0,67	0,44	0,44	0,2
	$R_{x/s}$ (g/g)	0,6	0,45	0,45	0,25
Pool intracellulaire (mg/g MS)	Proline	5	100	1	55
	Glutamate	60	75	90	90
	tréhalose	60	80	20	40

Tableau n°III.2 : Récapitulation des paramètres de croissance et des contenus intracellulaires en métabolites de *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.

Des différences, entre les souches, sont également observées sur les pools intracellulaires en métabolites (*cf* Figure n°III.7). Notamment le pool maximal en proline chez la souche ATCC 14752 est nettement inférieur à celui de l'ATCC 17965 cultivé à osmolarité équivalente (différence d'un facteur deux à 1,5 osmol.kg^{-1}), à l'inverse son pool maximal en acide glutamique est supérieur. Il est intéressant de noter l'apparition du pic d'acide glutamique pour une osmolalité comprise entre 1,3 et 1,5 osmol.kg^{-1} chez l'ATCC 14752, alors qu'il n'apparaît qu'au-delà de 2 osmol.kg^{-1} chez *C. glutamicum* ATCC 17965.

III.1.4. Conclusion

La souche *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 possède qualitativement le même comportement vis-à-vis d'une élévation de la pression osmotique du milieu de culture que la souche précédemment étudiée (ATCC 17965). Notamment un choc hyperosmotique par ajout de NaCl entraîne une diminution des paramètres de croissance et de consommation du glucose, une accumulation rapide et transitoire d'ions sodium, une accumulation de proline, de glutamate et à un niveau moindre de tréhalose.

Les différences observées entre les deux souches concernent leur résistance à la pression osmotique. La souche ATCC 14752 possède une moins bonne résistance vis-à-vis d'un ajout de

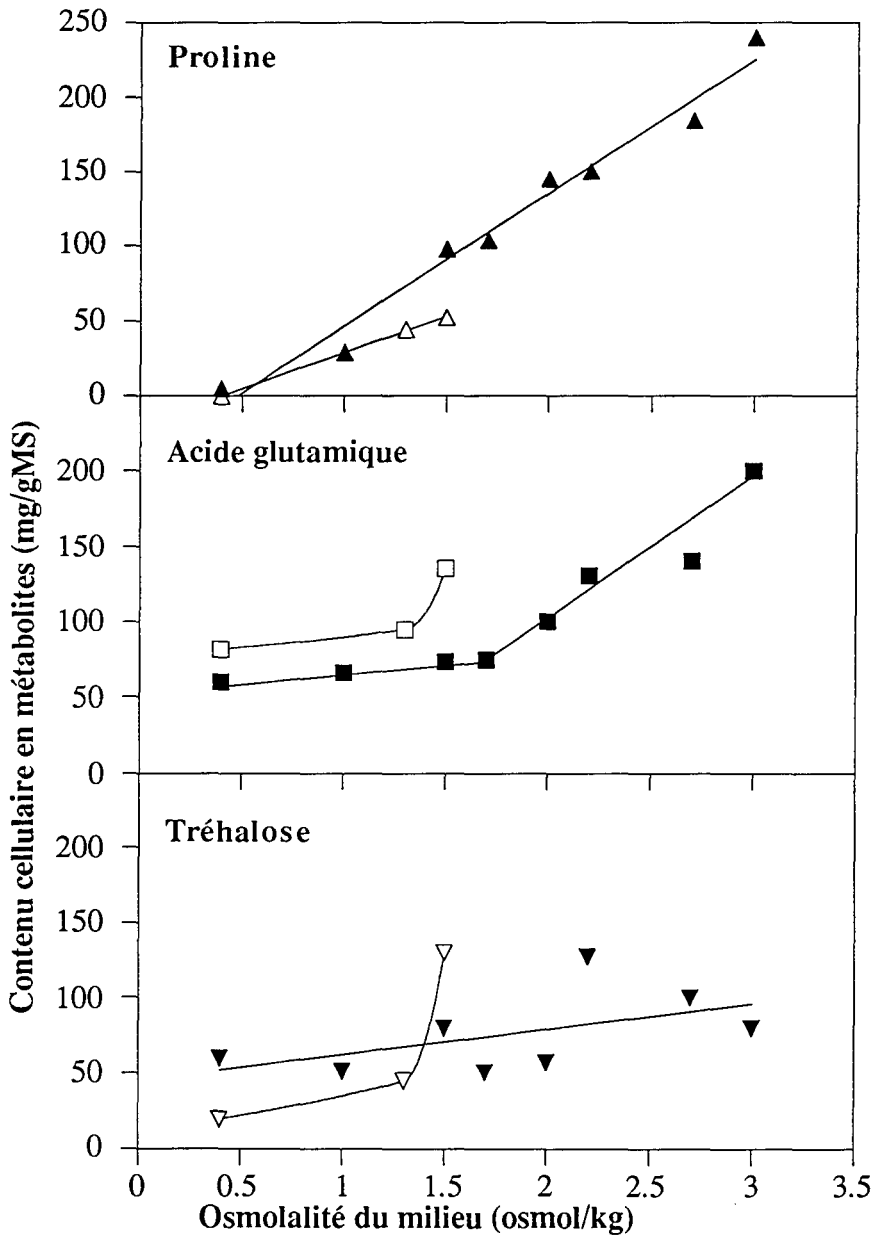


Figure n°III.7 : Influence de l'osmolalité du milieu sur le contenu cellulaire maximal en proline, acide glutamique et tréhalose chez *C. glutamicum* ATCC17965 (noir) et 14752 (blanc).

NaCl. Ainsi un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} entraîne chez cette souche une diminution de 55% du taux maximum de croissance et seulement de 35% chez l'ATCC 17965.

Cette différence de comportement se retrouve également au niveau des accumulations de métabolites. En culture à 1,5 osmol.kg^{-1}, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 possède un pool en proline deux fois inférieur à celui de l'ATCC 17965, ainsi qu'une vitesse spécifique maximale d'accumulation de proline inférieure. De plus, l'apparition du pic d'acide glutamique, observée à une osmolarité inférieure chez l'ATCC 14752 par rapport à l'ATCC 17965, suggère une différence importante au niveau de la capacité de la voie de biosynthèse de la proline. Comparativement à la souche 17965, *C. glutamicum* ATCC 14752 pourrait être considérée comme bradytrophe pour la proline. Cette caractéristique peut expliquer la moins bonne résistance de la souche ATCC 14752 à une élévation de la pression osmotique du milieu.

III.2. Etude de la réponse osmotique de *C. Glutamicum* ATCC 14752 en présence de proline

Dans le but de vérifier l'hypothèse précédente selon laquelle *C.glutamicum* ATCC 14752 serait "bradytrophe" pour la proline, les cinétiques de croissance et d'accumulation des acides aminés et tréhalose ont été réalisées chez cette souche cultivée sur un milieu de culture complémenté en proline. Un choc osmotique par addition de NaCl a été éffectué sur les bactéries en phase exponentielle de croissance.

III.2.1. Culture discontinue en présence de 1,2 g/l de proline

Une première culture de *C. glutamicum* ATCC 14752 a été réalisée en fermenteur sur milieu BMCG-glucose complémenté avec de la proline (1,2 g/l). La vitesse spécifique maximale de croissance de la souche est alors de 0,52 h^{-1}. Lors de la phase exponentielle de croissance des bactéries, du NaCl a été ajouté dans le milieu de culture de manière à élever la pression osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1}. Après un arrêt transitoire de la croissance, la bactérie reprend une croissance exponentielle avant d'entrer dans une phase de croissance linéaire (Figure n°III.8). L'apparition de la croissance linéaire coïncide avec l'épuisement de la proline dans le milieu.

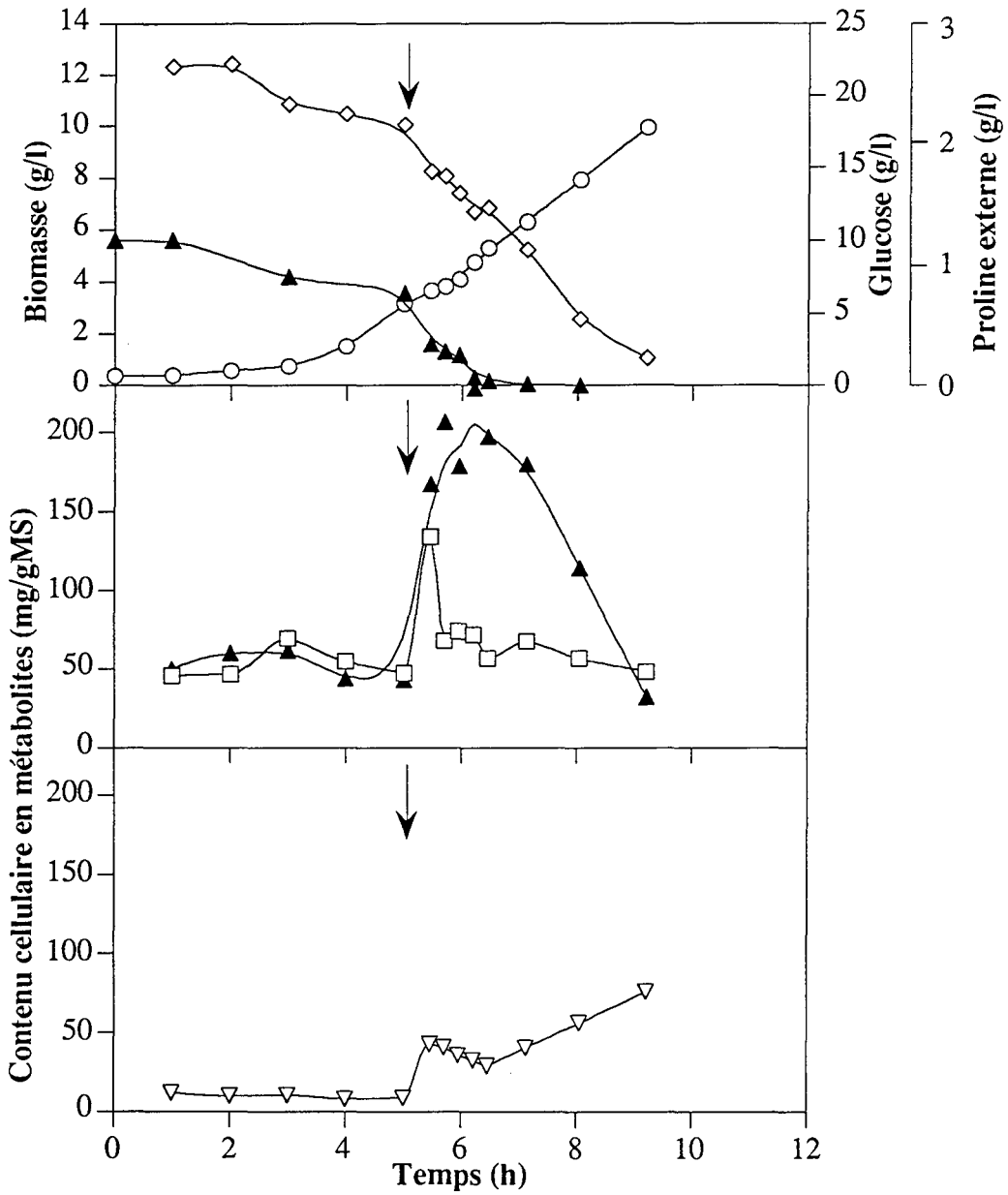


Figure n°III.8 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de proline et d'accumulation de métabolites chez *C. glutamicum* ATCC 14752 cultivée en présence de 1,2 g/l de proline : Biomasse (○), Glucose (◇), Proline (▲), Acide glutamique (□) et Tréhalose (▽). La flèche indique le moment où le NaCl a été ajouté pour augmenter l'osmolalité du milieu de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1}.

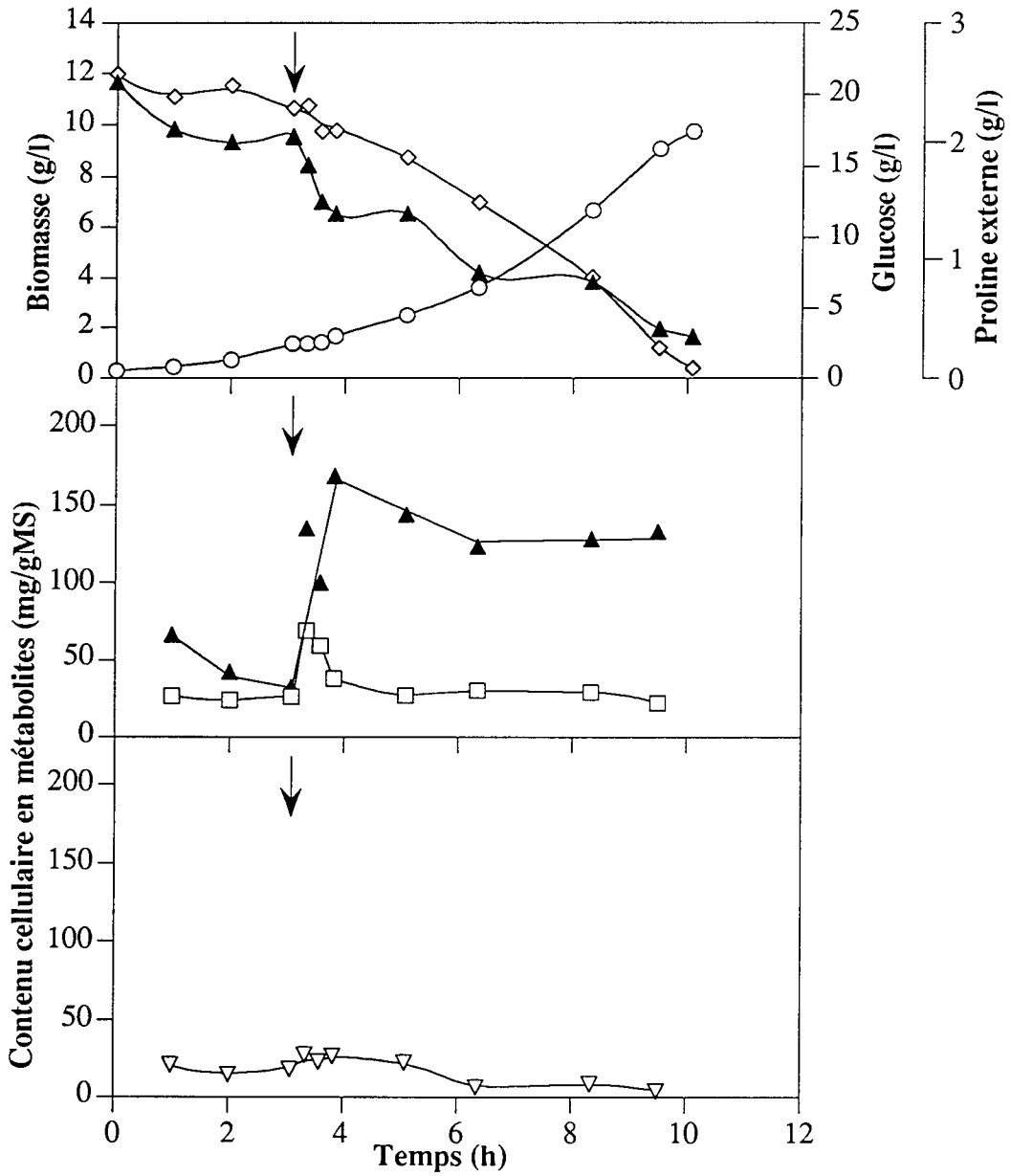


Figure n°III.9 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de proline et d'accumulation de métabolites chez *C. glutamicum* ATCC 14752 cultivée en présence de 2,5 g/l de proline : Biomasse (○), Glucose (◇), Proline (▲), Acide glutamique (□) et Tréhalose (▽). La flèche indique le moment où le NaCl a été ajouté pour augmenter l'osmolalité du milieu de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1}.

A la suite du choc osmotique, *C. glutamicum* accumule de manière importante de la proline jusqu'à 200 mg/g matière sèche. Lorsque la proline a été entièrement consommée, le pool intracellulaire en proline chute rapidement pour atteindre, en fin de culture, une valeur de 25 mg/g matière sèche. Le contenu cellulaire d'acide glutamique présente un pic transitoire consécutif à l'ajout de NaCl. Enfin, l'addition du NaCl dans le milieu entraîne une légère accumulation de tréhalose de 15 à 50 mg/g matière sèche. Par la suite, le contenu intracellulaire en tréhalose tend à diminuer jusqu'au moment où la proline devient limitante. Une accumulation plus importante de tréhalose est alors observée (de 30 à 75 mg/g matière sèche).

III.2.2. Culture discontinue en présence de 2,5 g/l de proline

Une seconde culture de *Corynebacterium glutamicum* a été réalisée dans les mêmes conditions mais avec une concentration en proline exogène plus élevée (2,5 g/l). Dans ce cas, la culture n'est pas limitée par la concentration en proline. Le glucose est, en effet, entièrement consommé contrairement à la proline (Figure n°III.9).
Après le choc osmotique, la bactérie reprend une croissance exponentielle avec une vitesse spécifique maximale de croissance de 0,28 h^{-1} et un rendement de conversion du glucose en biomasse de 0,47 g/g.

En réponse au choc osmotique, le pool intracellulaire de proline augmente de 30 à 160 mg/g matière sèche puis se stabilise autour de 125 mg/g matière sèche. Un bilan matière sur le réacteur nous indique que la quantité de proline accumulée au niveau intracellulaire par les bactéries est de l'ordre de 1,25 g, alors que celle consommée réellement est de 2,25 g. La bactérie accumule de l'acide glutamique de manière transitoire après l'addition de NaCl tandis que le pool de tréhalose ne varie pas et reste à une valeur faible inférieure à 20 mg/g matière sèche.

A titre de comparaison, des cultures de la souche ATCC 17965 réalisées sur milieu BMCG-glucose complémenté ou non avec de la proline (2,5 g/l) possèdent la même vitesse spécifique maximale de croissance (0,65 h^{-1}).

III.2.3. Discussion - conclusion

La présence de proline exogène en milieu BMCG-glucose à faible osmolarité améliore sensiblement la vitesse de croissance de la souche ATCC 14752, alors qu'elle n'a aucun effet sur la souche ATCC 17965. Cette observation va dans le sens de notre hypothèse précédente. *C. glutamicum* ATCC 14752 serait une souche bradytrophe pour la proline, dans le sens où sa

voie de biosynthèse ne lui permet pas de synthétiser suffisamment de proline pour une croissance maximale.

A la suite d'un ajout de NaCl dans le milieu, l'élévation de l'osmolarité du milieu de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} entraîne, chez la souche ATCC 14752 cultivée en présence de proline, une diminution du μ_{max} de 45%, alors qu'en absence de proline la chute du μ_{max} est de 55%. La proline est connue comme étant un osmoprotecteur chez de nombreuses bactéries, notamment chez *E. coli* (Csonka et Hanson, 1991). Chez *Brevibacterium linens*, la proline est, également, un osmoprotecteur efficace puisque l'ajout de1,5 M NaCl dans le milieu entraîne une chute du μ_{max} de 38% en absence de proline exogène, mais n'entraîne aucun changement sur le μ_{max} en présence de 0,1 g/l de proline (Jebbar et *al.*, 1995).

Chez la souche ATCC 17965, la présence de proline dans le milieu de culture n'entraîne pas de différence sur la vitesse spécifique maximale de croissance contrairement à l'ATCC 14752. Cette observation va dans le sens d'une dépendance vis-à-vis de la proline chez *C. glutamicum* ATCC 14752.

A la suite du choc osmotique, la bactérie accumule de manière importante la proline vraisemblablement par simple transport de la proline exogène. Le contenu intracellulaire de proline en présence de proline exogène atteint alors une valeur 2,5 fois supérieure à celle mesurée en absence de proline (125 contre 50 mg/g matière sèche) pour une même osmolalité de 1,5 osmol.kg^{-1}. Un bilan matière sur le réacteur indique que 55% de la proline consommée par la bactérie se retrouve au niveau intracellulaire. Une partie de la proline accumulée serait alors métabolisée par la bactérie.

Chez *C. glutamicum* ATCC 14752, la proline semble donc se comporter comme un osmoprotecteur dans le sens où :

- ❑ elle entraîne une meilleure croissance sous forte osmolarité
- ❑ elle est accumulée en forte quantité et participe ainsi au rétablissement d'une pression de turgescence positive
- ❑ elle abolit la synthèse des autres solutés compatibles tels que le tréhalose.

IV. Etude de la réponse osmotique de *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752 en présence de bétaïne.

L'étude de la réponse osmotique de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 a été réalisée en présence de bétaïne dans le milieu de culture. Ce composé est un constituant de la mélasse dont la présence est, semble-t-il, essentielle pour la production d'acide glutamique. De manière à étudier l'effet de la bétaïne sur la réponse osmotique de la bactérie, les cinétiques de croissance et d'accumulation des acides aminés et du tréhalose ont été réalisées sur milieu BMCG-glucose en présence de ce composé. Les bactéries en phase exponentielle de croissance ont été soumises à un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} après ajout de NaCl dans le milieu de culture.

IV.1. Influence sur la croissance

Les cultures de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 ont été réalisées sur le milieu BMCG-glucose classique (0,4 osmol.kg^{-1}) dans lequel a été rajouté 14 g/l de bétaïne. Cet acide aminé est présent à cette concentration dans le milieu de culture utilisé pour la production d'acide glutamique au laboratoire.

Souche	Sans bétaïne		Avec bétaïne	
	μ_{max} (h^{-1})		μ_{max} (h^{-1})	
	0,4 Osm	1,5 Osm	0,4 Osm	1,5 Osm
ATCC 17965	0,67 *(4)*	0,44 *(2)*	0,38 *(2)*	0,36 *(2)*
ATCC 14752	0,44 *(2)*	0,19 *(2)*	0,29 *(2)*	0,25 *(2)*

Tableau n°III.3 : Valeurs de μ_{max} de *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivées en absence et en présence de bétaïne à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}. *Entre parenthèses, le nombre de détermination indépendantes.*

La bétaïne en forte concentration dans le milieu de culture à 0,4 osmol.kg^{-1} entraîne une dimimution de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) de l'ordre de 43% pour l'ATCC 17965 et de 34% pour l'ATCC 14752 (Tableau n°III.3).

Pendant la phase exponentielle de croissance (5 à 7 heures après l'inoculation), du NaCl a été ajouté au milieu de culture de manière à augmenter la pression osmotique à 1,5 osmol.kg^{-1}. La présence de bétaïne dans le milieu de la souche ATCC 14752 permet une meilleure croissance à 1,5 osmol.kg^{-1} (amélioration de 30% sur le μ_{max}) (Tableau n°III.2). A l'inverse, la souche ATCC 17965 possède un μ_{max} inférieur (0,36 h^{-1}) en présence de bétaïne à 1,5 osmol.kg^{-1} à celui obtenu en absence de bétaïne (0,44 h^{-1}) à osmolarité équivalente.
Par contre, la diminution du μ_{max}, suite au choc osmotique, est amoindrie (5 et 13% pour l'ATCC 17965 et 14752 respectivement) en présence de bétaïne dans le milieu de culture.

IV.2. Influence sur le contenu cellulaire en métabolites

Les cinétiques de croissance et d'accumulation des acides aminés et du tréhalose ont été réalisées pour les deux souches. Elles sont présentées Figure n°III.10 et III.11.
Des réponses au choc osmotique identiques ont été observées sur les deux souches, à savoir :

- ❑ une très faible accumulation de proline intracellulaire (de 5 à 20 mg/g matière sèche)
- ❑ un pool constant d'acide glutamique de l'ordre de 40-50 mg/g matière sèche
- ❑ un contenu faible en tréhalose inférieur à 20 mg/g matière sèche
- ❑ une forte accumulation de bétaïne intracellulaire (de 50 à 270 mg/gMS)

Un bilan matière sur la totalité de la culture de *C. glutamicum* ATCC 14752 nous indique que la quantité de bétaïne dosée au niveau intracellulaire en fin de culture est de l'ordre de 1,8 g alors que la diminution de la quantité de bétaïne du milieu de culture est de 2 g. La bétaïne consommée se retrouve alors à 90% au niveau intracellulaire. De la même manière, chez la souche ATCC 17965, 75% de la bétaïne consommée se retrouve dans le pool intracellulaire mesuré.

IV.3. Discussion - conclusion

Le rôle de la bétaïne sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en condition de forte pression osmotique du milieu a été étudiée sur les souches ATCC 17965 et 14752.
Les faibles valeurs de μ_{max} obtenues avec les deux souches de *C. glutamicum* sur le milieu BMCG-glucose classique à 0,4 osmol.kg^{-1} semblent provenir d'un effet inhibiteur de la bétaïne. La concentration en bétaïne de 14 g/l (120 mM) est, en effet, élevée par rapport à celle généralement utilisée dans les études d'osmoprotection (de 1 à 10 mM) (Wojcik, 1992 ; Jebbar et *al.*, 1995). Mais cette concentration est celle du milieu de culture utilisé pour la production d'acide glutamique optimisé au laboratoire.

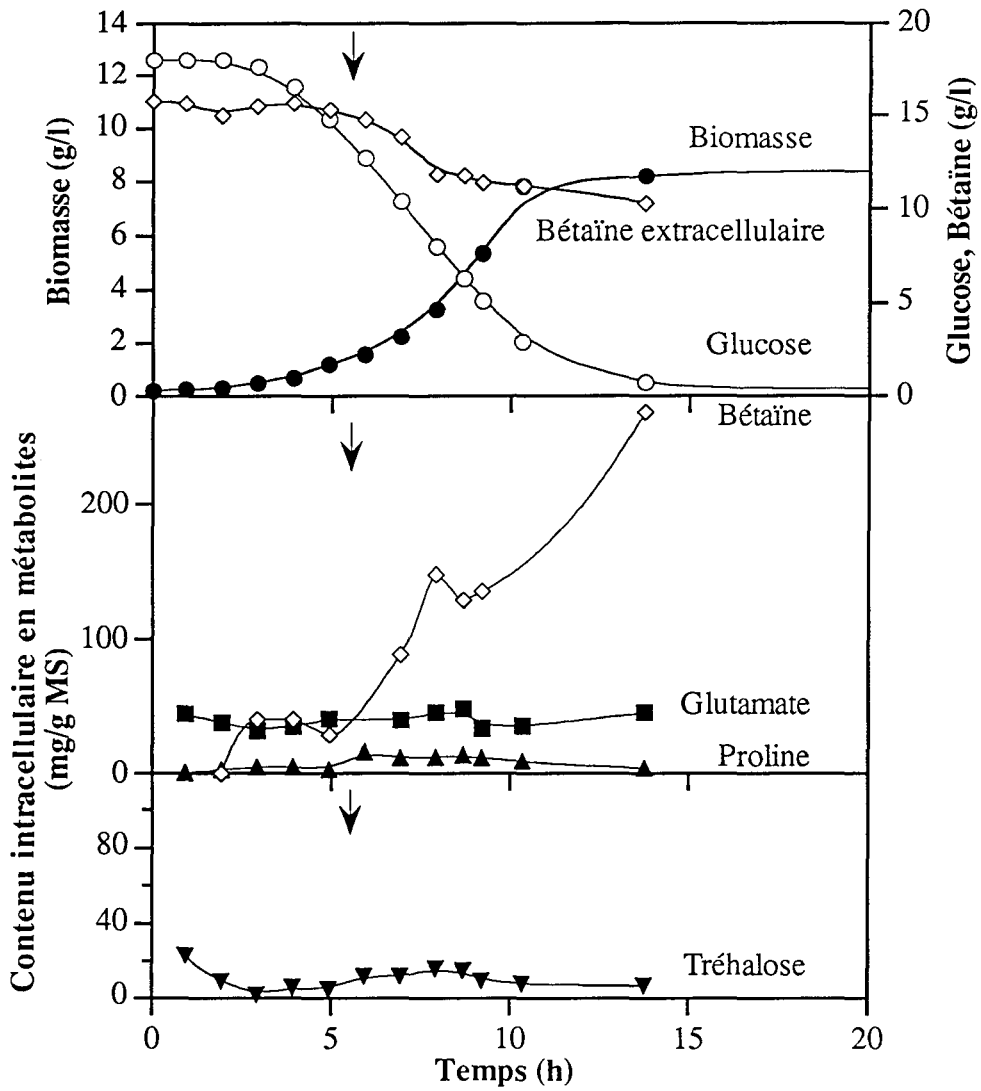


Figure n°III.10 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de bétaïne et d'accumulation de métabolites chez *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée en présence de 14 g/l de bétaïne : Biomasse (●), Glucose (○), Bétaïne (◇), Proline (▲), Acide glutamique (■) et Tréhalose (▼). La flèche indique le moment où le NaCl a été ajouté pour augmenter l'osmolalité du milieu de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1}.

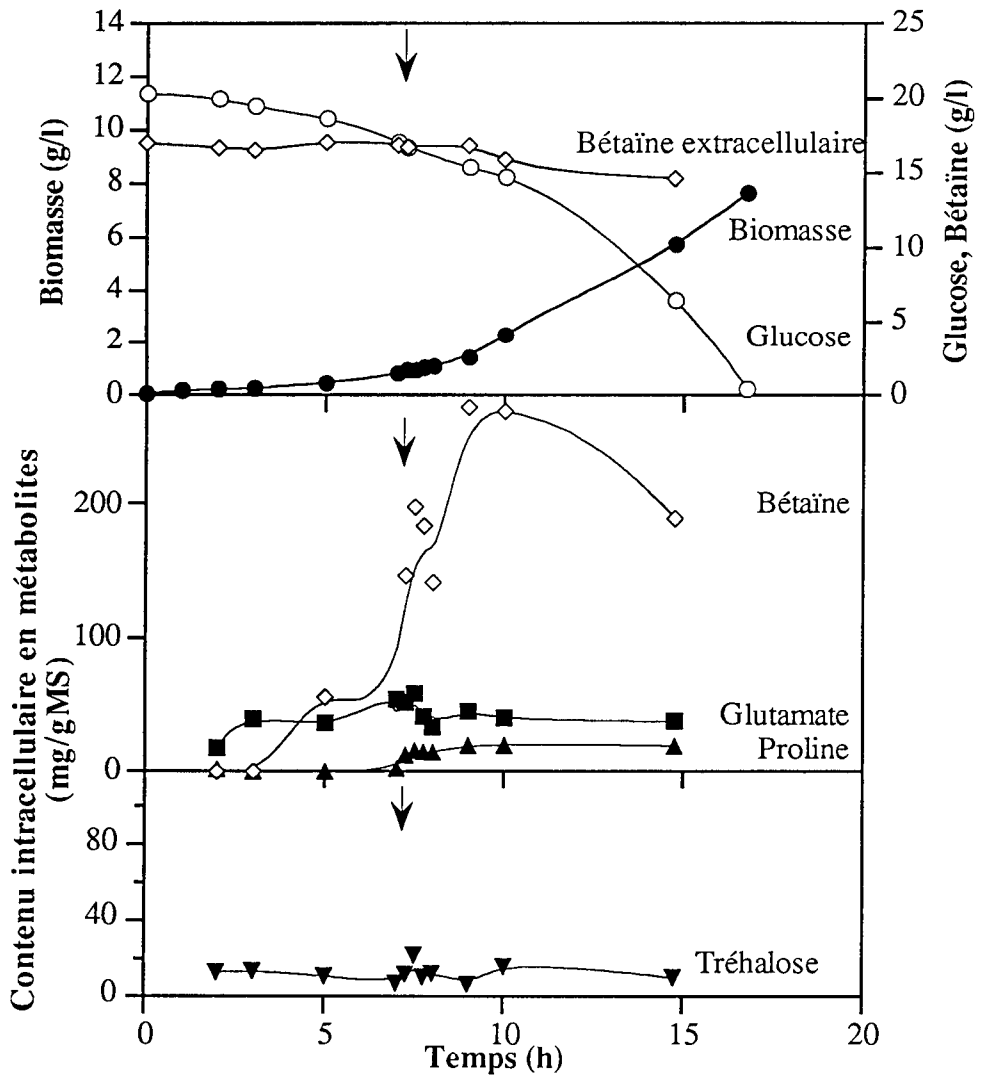


Figure n°III.11 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de bétaïne et d'accumulation de métabolites chez *C. glutamicum* ATCC 14752 cultivée en présence de 14 g/l de bétaïne : Biomasse (●), Glucose (○), Bétaïne (◇), Proline (▲), Acide glutamique (■) et Tréhalose (▼). La flèche indique le moment où le NaCl a été ajouté pour augmenter l'osmolalité du milieu de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1}.

La présence de bétaïne dans le milieu de culture au moment du choc osmotique permet à la bactérie de limiter la diminution de sa vitesse spécifique maximale de croissance. De plus, la croissance de *C. glutamicum* ATCC 14752 est plus rapide en présence de bétaïne lorsque la pression osmotique du milieu de culture est élevée (1,5 osmol.kg^{-1}). Ces observations montrent l'effet osmoprotecteur de la bétaïne sur la souche ATCC 14752. Par contre, cela n'est pas vérifié dans le cas de la souche ATCC 17965. En effet, la vitesse spécifique maximale de croissance de cette souche est meilleure en absence de bétaïne à 1,5 osmol.kg^{-1}.
L'effet osmoprotecteur de la bétaïne a été décrit chez de nombreuses bactéries telles que *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Csonka et Hanson, 1991), *Bacillus subtilis* (Whatmore et *al.*, 1990) et *Brevibacterium linens* (Jebbar et *al.*, 1995).

En présence de bétaïne dans le milieu de culture, le pool intracellulaire en proline augmente faiblement après l'ajout de NaCl pour atteindre un maximum de 20 mg/g matière sèche. Wojcik (1992) a également montré chez *C. glutamicum* ATCC 17965 qu'à la suite d'un choc osmotique l'accumulation de proline était affectée en présence de bétaïne sans être complètement inhibée.

Le pool intracellulaire en tréhalose est très faible (inférieur à 20 mg/g matière sèche) et ne varie pas à la suite de l'addition de NaCl dans le milieu. De même, chez *Escherichia coli*, aucune accumulation de tréhalose n'a été observée, à la suite d'un choc osmotique, en présence de bétaïne (Dinnbier et *al.*, 1988).

Le pool intracellulaire en bétaïne augmente après le choc osmotique. A partir d'un bilan matière, il a été montré que 75% (ATCC 17965) et 90% (ATCC 14752) de la bétaïne consommée se retrouve dans le pool intracellulaire dosé. Cette observation suggère que la bétaïne est accumulée par les deux souches et n'est pas métabolisée chez la souche ATCC 14752. Chez *Brevibacterium linens*, la bétaïne agit comme un véritable osmoprotecteur puisqu'elle est accumulée, non métabolisée et elle abolit la synthèse du principal soluté compatible (Jebbar et *al.*, 1995). Chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 la bétaïne semble donc se comporter comme un véritable osmoprotecteur ; chez la souche ATCC 17965 l'effet inhibiteur de la bétaïne sur la croissance semble prédominant sur l'effet osmoprotecteur.

V. Récapitulation des résultats

1 - La première réponse à une élévation de la pression osmotique, par addition de NaCl dans le milieu, est une chute brutale du volume cellulaire de *C. glutamicum* due au phénomène d'osmose. Par la suite, la bactérie tend à restaurer son volume initial en quelques minutes, cette période dépend de l'amplitude du choc osmotique effectué.

2 - Un ajout de NaCl dans le milieu entraîne une inhibition de la croissance et une diminution du rendement de conversion du glucose en biomasse. Le taux maximal de croissance et le rendement de croissance diminuent linéairement avec l'osmolarité du milieu.

3 - Il a été observé en réponse à un choc hyperosmotique :

- ❑ un influx transitoire de sodium (après ajout de NaCl) ou de potassium (ajout de KCl)
- ❑ une accumulation importante de proline dépendante de l'osmolarité du milieu
- ❑ une accumulation transitoire de glutamate aux très fortes pressions osmotiques (>2 Osm)
- ❑ une accumulation transitoire de tréhalose

4 - L'étude sur l'influence de la nature de l'osmolyte dépresseur a montré que:

- ❑ l'influx de cations (Na^+ ou K^+) dépend fortement de l'osmolyte dépresseur utilisé
- ❑ les évènements décrits précédemment répondent à l'augmentation de la pression osmotique et non pas de la force ionique
- ❑ un choc osmotique par addition d'osmolyte pénétrant est moins drastique pour la bactérie.

5 - La bétaïne se comporte comme un véritable osmoprotecteur chez la souche ATCC 14752 dans le sens où, en sa présence, un ajout de NaCl n'entraîne pas d'inhibition de la croissance. Chez la souche ATCC 17965, la bétaïne à la concentration testée semble avoir un effet inhibiteur sur la croissance et masque ainsi un éventuel effet osmoprotecteur.

L'effet osmoprotecteur de la proline chez la souche ATCC 14752 est particulier puisque la proline semble être métabolisée. De plus contrairement à la bétaïne, elle ne lève pas entièrement l'inhibition de croissance due à l'addition de NaCl dans le milieu.

CHAPITRE IV

Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture continue

Chapitre IV : Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture continue

I. Etude de la réponse osmotique de C glutamicum ATCC 17965 en culture continue sous limitation glucose 138

II. Etude de la réponse osmotique de C. glutamicum ATCC 17965 en culture continue sous limitation ammonium et potassium 148

III. Etude de l'accumulation de tréhalose en culture continue 160

III.1. Sous limitation glucose 160

III.2. Sous limitation ammonium et potassium 161

III.3. Discussion - conclusion 163

IV. Récapitulation des résultats 164

Etude cinétique et physiologique de Corynebacterium glutamicum soumise à un choc hyperosmotique en culture continue

Nous décrirons, dans ce chapitre, le comportement de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 cultivée en culture continue sur milieu synthétique et soumise à un choc osmotique par addition de NaCl. Le mode continu a été choisi de manière à étudier l'influence du taux de croissance et de limitations nutritionnelles sur la réponse osmotique de *C. glutamicum*.

Nous avons vu, dans la partie précédente, que la croissance de la bactérie sous forte osmolarité peut dépendre de sa capacité à accumuler des solutés compatibles et notamment de la proline. L'étude de l'influence du taux de croissance en culture continue sur la réponse osmotique nous permettra de vérifier si le pool cellulaire en proline est réellement lié à la vitesse de croissance de la bactérie sous forte osmolarité.

L'analyse de la réponse osmotique en culture continue sous limitation ammonium et potassium a été réalisée de manière à affecter la synthèse des acides aminés afin de mettre en évidence des métabolites osmorégulateurs autres que la proline. Cette étude pourra notamment nous apporter des informations supplémentaires sur le rôle du tréhalose chez *Corynebacterium glutamicum*.

Cette partie fait l'objet de deux publications, la première acceptée et la seconde soumise à Applied Microbiology and Biotechnology.

I. Etude de la réponse osmotique de *C glutamicum* ATCC 17965 en culture continue sous limitation glucose

Ce paragraphe est présenté sous forme d'une publication parue dans Applied Microbiology and Biotechnology.

Appl. Microbiol. Biotechnol. (1995) 44 : 496-500

ORIGINAL PAPER

S. Guillouet and J.M. Engasser

Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose

Received: 9 January 1995 / Received revision: 4 May 1995 / Accepted: 5 May 1995

Abstract : In order to determine the response of *Corynebacterium glutamicum* to osmotic stress under different growth conditions, the bacteria were grown in glucose-limited continuous cultures at osmotic pressures from 0.4-2.4 osmol.kg^{-1} by addition of NaCl to the culture medium. Steady-state continuous cultures were obtained for all investigated osmotic pressures. Increasing the medium osmolality resulted in a higher specific glucose-uptake rate, a lower glucose-to-biomass conversion yield, as well as important changes in the cellular content. A short-term response to the addition of NaCl to a continuous culture was the rapid but transient uptake of Na^+ ions. At steady state a higher osmotic pressure resulted in a strong increase of the intracellular concentrations of proline, from 5 to 125 mg/g dry weight, and of trehalose from 20 to 60 mg/g dry weight. The level of glutamate, which was the dominant intracellular amino acid at low osmotic pressure at 55 mg/g dry weight, was not affected by the addition of NaCl. The influence of the specific growth rate, between 0.1 and 0.4 h^{-1}, on the intracellular metabolite concentration was also determined. The level of proline was found to increase strongly with the growth rate, whereas the trehalose content decreased slightly and the glutamate content did not change. The observed net increase in accumulated metabolites may be related to a requirement of a higher turgor pressure for rapid cell growth.

Introduction

The osmotic pressure of the culture medium represents one of the major operational parameter for an efficient production of glutamate by *Corynebacterium glutamicum* (Mondain-Monval, 1988). In current industrial processes bacteria are first grown at a high osmotic pressure before the secretion of glutamate is induced by the addition of surfactants which increase the membrane permeability (Marquet et al., 1986). The mechanism by which the combination of a high osmotic pressure and surfactant addition results in an overproduction of glutamate is still not understood (Krämer et al, 1994).

In a previous study, we investigated the effects of an increased osmotic pressure, caused by the addition of NaCl, on the growth kinetics and intracellular content of *Corynebacterium glutamicum* during batch cultures (Guillouet and Engasser, 1995). An initial finding, when increasing the osmolality of the culture medium from 0.4 osmol.kg^{-1} to 2 osmol.kg^{-1}, was the reduction of both the maximal specific growth rate, from 0.7 h^{-1} to 0.2 h^{-1}, and the glucose-to-biomass conversion yield, from 0.6 g/g to 0.3 g/g. The addition of salt at the beginning of the growth phase also resulted in a rapid but transient influx of sodium ions. During the remaining growth phase *Corynebacterium glutamicum* responded to the osmotic upshock by a strong increase in proline content, from 5 up to 130 mg/g dry weight, whereas the two other major intracellular metabolites, glutamate and trehalose, remained at relatively constant levels of 70 mg/g dry weight and 60 mg/g dry weight, respectively.

Optimal amino acid production is generally achieved under fed-batch operation when cells are grown at a reduced rate. In order to characterise the response of corynebacteria to osmotic stress in a wide range of growth conditions, in this study we examined the kinetics and intracellular content of the bacteria grown in continuous cultures under glucose-limiting conditions. The more precise objective was to evaluate the differences in cellular kinetics between batch and continuous cultures and to determine the possible effect of the specific growth rate on the accumulation of osmoprotective metabolites.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and medium composition

Corynebacterium glutamicum melassecola (strain ATCC 17965), given by ORSAN (Paris, France) was grown in the modified basal medium for *Corynebacterium* growth (Liebl et al. 1989). Catechol was replaced by a mixture containing nicotinic acid, myo-inositol, panthotenic acid, choline chloride and deferoxamine at a concentration of 3 mg/l each. Biotin and thiamine hydrochloride were used respectively at 30 µg/l and 2 mg/l. Glucose at 20 g/l concentration was the sole carbon source.

Fermentation conditions

A 60 ml overnight culture of Corynebacterium glutamicum in basal medium was used to inoculate a 2 l SGI (Toulouse, France) fermentor containing 1 l of basal medium. The culture was grown at 35°C with an aeration rate of 50 l/h. The pH was regulated at 7.3.

Four continuous cultures were performed under different osmolality conditions. At the end of the batch phase at 0.4 osmol.kg^{-1}, all continuous cultures were started by feeding with fresh basal medium and by drawing the culture broth with a peristaltic pump (Ismatec, Zürich, Switzerland). The dilution rate was fixed by the feeding and drawing rate of the pump. It was changed by varying the flow rate of the pump once the steady-state was reached.
For the first culture no salt was added. For the three others, after the steady-state at 0.4 osmol.kg^{-1} was reached, basal medium containing 5 M NaCl was added to increase the medium osmolality to 0.85, 1.2, 1.5 and 2.4 osmol.kg^{-1}, respectively.

Analyses

During the fermentation, samples were collected and centrifuged for 2 minutes (6000 g, 4°C). The biomass concentration was determined by the dry cell weight method. Sugars and organic acids analyses were performed on the supernatant by HPLC (Waters model 712, St Quentin, France) using a Brownlee Polypore H column, operated at 65°C and with H_2SO_4 (0.02 M) elution, an UV detector and a refractometer as detectors.

For the determination of intracellular ions, samples were harvested by filtration through 0.45-µm Whatman filters (Maidstone, England). Filtered cells were rinsed with 3-morpholinopropane-sulfonic acid (MOPS) buffer at pH 7.3, consisting of 50 mM MOPS and 0.8 M NH_4OH. The osmotic pressure of the buffer, which did not contain Na^+ or K^+, was adjusted to the osmotic pressure of the culture medium by addition of $(NH_4)_2SO_4$. Cells were resuspended in 4 ml $HClO_4$ 20% and extracted for 3 minutes. The biomass concentration in $HClO_4$ solution was constant at 2 g dry weight/l. A blank was carried out under the same conditions without bacteria. Extracts were 100-fold diluted and analysed using an atomic absorption spectrometer (Varian Spectra AA-20, Les Ulis, France). Measurements were performed in triplicate and typically agreed to ± 10%.

For the extraction of intracellular metabolites, samples were first centrifuged for 2 minutes (6000 g, 4°C). The cell pellet was collected and extracted by suspending in cold distilled water for 15 minutes. The biomass concentration in cold water was set at 5 g dry weight/l. The suspension was then centrifuged for 2 minutes (7000 g, 0°C) and the analysis of intracellular metabolites performed on the supernatant. After derivatization with *ortho*-phtaldialdehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) reagents, amino acids were analysed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al. 1992). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 5% for proline and 15% for glutamate and glutamine.

Free intracellular trehalose of the cell extract was measured following enzymatic hydrolysis to glucose by trehalase (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). The reaction mixture containing trehalase ($4x10^{-3}$ U) and cell extract in phosphate-citrate buffer (120 mM disodium phosphate - 40 mM citric acid, pH 5.7) was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. Glucose was measured enzymatically by the glucose oxidase/peroxidase kit (Sigma). A blank without trehalase was realised to evaluate the possible contamination with glucose from the culture medium or from the intracellular medium. The concentration of trehalose in the extract was calculated from a standard curve prepared with trehalose (Sigma). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 15%.

The osmotic pressure of the medium was measured with a cryoscopic osmometer Hermann Roebling (Berlin, Germany).

Results

Dynamics of a glucose-limited continuous culture following an osmotic saline upshock

Corynebacterium glutamicum was first grown in a continuous culture at a low medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1} and a dilution rate of 0.25 h^{-1}. As shown in Fig. 1, for a feed glucose concentration of 12 g/l a steady-state level of 7.5 g/l biomass and less than 0.5 g/l glucose was reached. The addition of NaCl both in the reactor and in the feed reservoir, so as to increase the medium osmolality to 1.2 osmol.kg^{-1}, resulted in a decrease of the cellular biomass to a new steady-state level of 5.5 g/l. The glucose concentration remained very low and no secretion of amino acids or organic acids was detected in the medium.

The measured time evolution of the intracellular accumulation of salts, amino acids and trehalose, are also reported in Fig. 1. At 0.4 osmol.kg^{-1}, for a feed medium containing 0.05 M K^+ and 0.09 M Na^+, the internal pools of potassium and sodium amounted to 25 mg K^+/g dry weight and 5 mg Na^+ /g dry weight, respectively. Upon addition of NaCl no significant variation of the intracellular content of potassium was observed, whereas a fast uptake of Na^+ occurred from 5 to 35 mg/g dry weight in about 30 min. Afterwards the sodium level decreased again to reach a stable level around 15 mg/g dry weight.

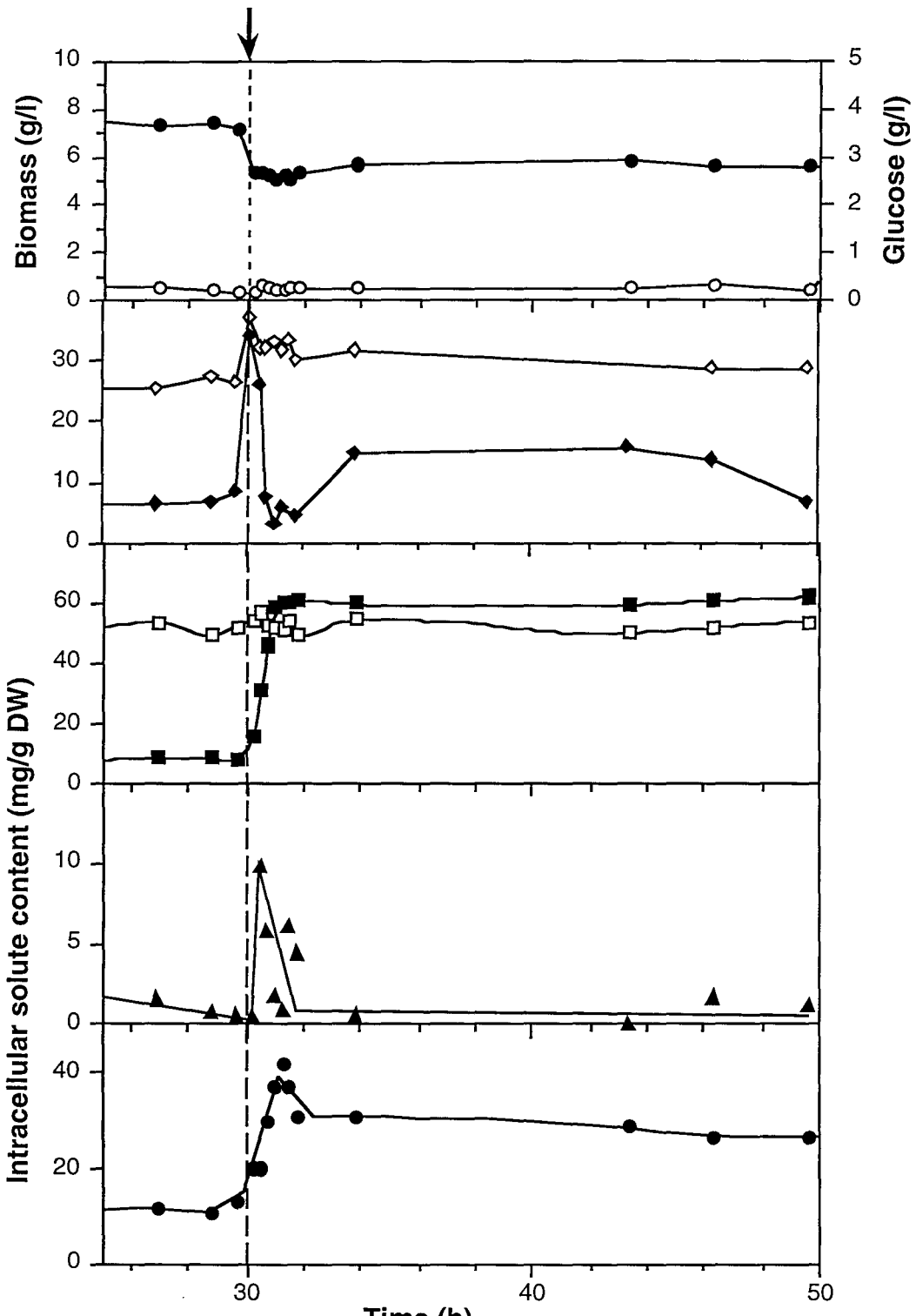


Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of *C. glutamicum* on a defined medium. ● Biomass, ○ glucose concentration ; ◇ Potassium, ◆ sodium, ■ proline , □ glutamate, ▲ glutamine ,● trehalose intracellular concentration when the fermentation was started at a medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}and when NaCl was added (*arrow*) to rise the osmotic pressure to 1.2 osmol.kg^{-1}.

With respect to the intracellular pool of amino acids, for a medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}, glutamic acid was the major intracellular component at 50 mg/g dry weight. The concentrations of proline and trehalose were much lower. Addition of NaCl resulted in a strong increase in intracellular proline which rose from 5 to 60 mg/g dry weight in about an hour, whereas the glutamic acid content increased only slightly. One also observed a transient accumulation of glutamine for a few hours. Simultaneously the intracellular concentration of trehalose was found to increase from 10 to 40 mg/g dry weight in about one hour, and then decreased slightly to a stable level of 30 mg/g dry weight. Accumulation of proline and trehalose thus represented the major response of *Corynebacterium glutamicum* to an osmotic upshock in the glucose limited continuous culture.

Influence of cellular growth rate on the steady-state intracellular content

To investigate the possible effect of growth rate on the osmotic response, continuous cultures were performed at different dilution rates between 0.09 h^{-1} and 0.4 h^{-1} and at osmotic pressures between 0.4 osmol.kg^{-1} and 2.4 osmol.kg^{-1}. At steady-state, when the specific growth rate became equal to the dilution rate, the intracellular concentrations of glutamate, proline and trehalose were measured. At the two highest investigated medium osmolalities (1.5 and 2.4 osmol.kg^{-1}), steady-state continuous culture could only be established up to a dilution rate of 0.4 and 0.2 h^{-1}, respectively. This was due to a reduction of the maximal growth rate at elevated osmotic pressures, which resulted in culture wash-out at dilution rates exceeding the maximal specific growth rate.

As reported in Fig. 2, the intracellular glutamate content remained essentially constant, independent of the medium osmolality and the cell growth rate. Proline level was always found to increase with growth rate, with for example an increase from 60 mg/g dry weight at 0.08 h^{-1} to 125 mg/g dry weight at 0.2 h^{-1} at an osmolality of 2.4 osmol.kg^{-1}. For trehalose, we observed an accumulation increasing with growth rate at the lower osmolalities, but on the contrary a decreasing accumulation with growth rate at the higher osmolalities.

The comparison at a given growth rate of the different intracellular levels shows that at the lowest medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}, glutamic acid was the dominant accumulated metabolite around 50 mg/g dry weight. At the higher osmolalities, on the contrary, proline became the major intracellular compound, with a maximal level of 130 mg/g. Glutamate remained constant around 50 mg/g dry weight, whereas the level of trehalose increased to a maximum of 60 mg/g dry weight.

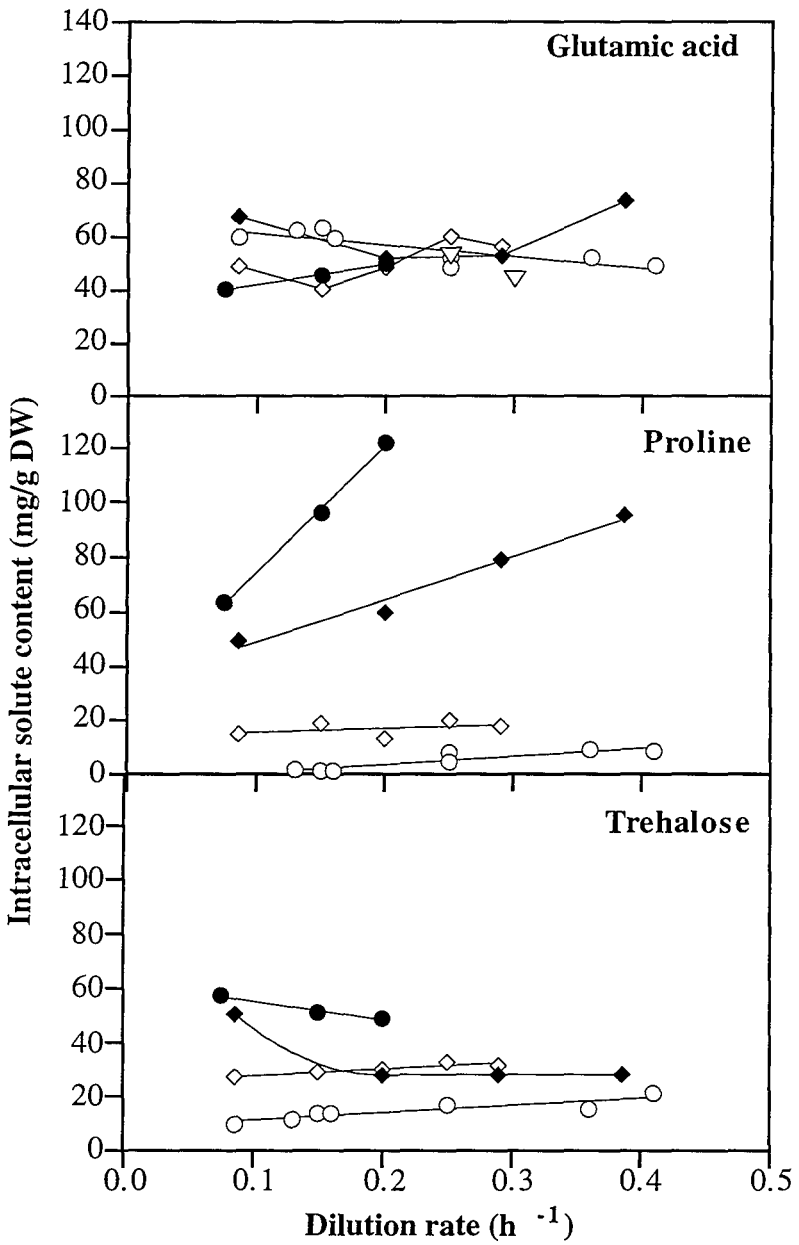


Fig. 2 : Effect of growth rate on the steady-state glutamate, proline and trehalose content of *C. glutamicum* grown in continuous culture at different osmolalities : ○ 0.4 osmol.kg^{-1}, ◇ 0.85 osmol.kg^{-1}, ◆ 1.5 osmol.kg^{-1}, ● 2.4 osmol.kg^{-1}.

Influence of growth rate and medium osmolality on the glucose uptake rate

At steady-states glucose specific uptake rates were measured from a glucose mass balance on the continuous fermentor. The results are reported as a function of growth rate and medium osmolality in Fig. 3. As seen, at a given growth rate, glucose uptake rate slightly increased with osmotic pressure. On the other hand, at a given medium osmolality, the glucose consumption rate was found to increase proportionally to the specific growth rate. From the slope of the observed straight lines we determined the glucose-to-biomass conversion yield at the different osmotic pressures. The obtained values, decreasing from 0.56 g/g at 0.4 osmol.kg^{-1} to 0.3 g/g at 2.4 osmol.kg^{-1}, were similar to the values for the conversion yields previouly reported with the same strain and culture medium in batch cultures (Guillouet and Engasser, 1995).

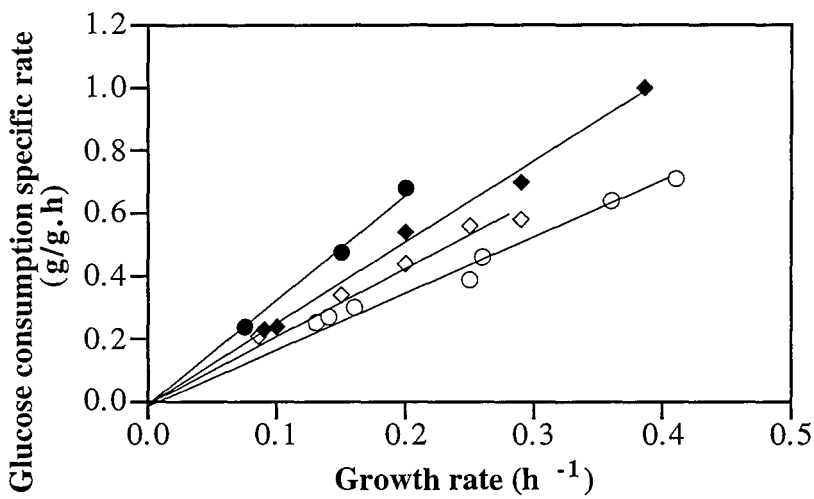


Fig. 3 : Effect of growth rate on the glucose-specific consumption rate of *C. glutamicum* grown in glucose-limited continuous culture at different osmolalities :
○ 0.4 osmol.kg^{-1}, ◇ 0.85 osmol.kg^{-1}, ◆ 1.5 osmol.kg^{-1}, ● 2.4 osmol.kg^{-1}.

Discussion

In this study we investigated the kinetics and intracellular content of *Corynebacterium glutamicum* grown in continuous cultures under increasing medium osmolalities in order to acquire a better understanding of the response mechanism of the bacteria to high osmotic pressure as encountered in industrial glutamic acid production processes. The results here obtained in continuous culture showed many similarities with those previously reported for the growth of the bacteria in batch cultures (Guillouet and Engasser, 1995).

A first finding is the increased specific glucose uptake rate and the reduced glucose-to-biomass conversion yield when the bacteria were exposed to high medium osmolalities. This can be interpreted as the necessity for the cells to devote an increased proportion of their carbon and energy sources to osmoregulation processes. Upon the addition of NaCl, an observed short term response of *Corynebacterium glutamicum* was the rapid uptake of Na^+ by the bacteria. The intracellular level of Na^+ was found to rise in less than one hour from 5 to 35 mg/g dry weight when rising the osmolality to 1.2 osmol.kg^{-1}, but came back to its original level at later times.

The results obtained with *Corynebacterium glutamicum* grown in glucose-limited continuous cultures also confirmed the importance of amino acids as osmoregulating compounds. As previously reported in batch cultures, it was the intracellular level of proline which showed the largest increase, from 5 to 125 mg/g dry weight, when rising the medium osmolality from 0.4 to 2.4 osmol.kg^{-1}. The level of glutamate, on the contrary, remained constant near 55 mg/g dry weight.

A major difference between batch and continuous cultures concerned the level of trehalose. When growing *Corynebacterium glutamicum* in batch cultures, the intracellular trehalose level was relatively constant at 60 mg/g dry weight, independently of the osmotic pressure. It quickly dropped at the end of the culture when glucose was exhausted from the medium. In the presently studied continuous cultures we observed a lower and osmotic pressure dependent level of intracellular trehalose, between 10 and 60 mg/g dry weight. This may be related to the fact that under the imposed glucose limiting conditions, the concentrations of glucose in the medium was maintained at sufficient low levels to reduce the trehalose synthesis capacity of the bacteria

An additional finding of the study was , at elevated medium osmolality, the strong increase with growth rate of the steady-state intracellular level of proline. This may be related to the necessity for the bacteria to increase their turgor pressure, i.e. the difference between the intracellular and extracellular osmotic pressure, in order to reach higher specific growth rates. A similar tendency of growing cells to increase their intracellular content with increasing growth rates has been reported for the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (Larsson et al. 1990). In glucose limited continuous culture and at salt concentrations higher than 0.7 M NaCl, increasing the growth rate was found to result in higher intracellular glycerol concentrations.

Data of this study on the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum* in growth limited continuous cultures have been obtained for glucose as the growth limiting substrate. The analysis of the osmoregulation mechanisms is presently being extended to other growth limiting conditions, for instance under the limitations of the nitrogen substrate or of potassium. In

addition, to achieve a more rationale framework for the optimisation of the glutamate production process, the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum* will also be investigated after the addition of surfactants which induce the excretion of metabolites by a modification of the permeability of the external membrane.

REFERENCES

Godel H, Seitz P, Verhoef M (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. LC GC Int. 5, 2 : 44-49

Guillouet S and Engasser JM (1995) Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. Appl. Microbiol. Biotechnol. In press

Krämer R, de Graaf A, Eggeling L, Eikmanns B, Sahm H (1994) Biosynthesis and secretion of amino acids in coryneform bacteria. ECB6 : Proceedings of the 6th European Congress in Biotechnology, Alberghina L (Eds) Elsevier Amsterdam pp 595-602

Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. J Bacteriol 172, 4 : 1769-1774

Liebl W, Klamer R, Schleifer KH (1989) Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Appl Microbiol Biotechnol 32 : 205-210

Marquet M, Uribelarrea JL, Huchenq A, Laneelle G, Goma G (1986) Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum* : a study of glutamate accumulation during a fermentation course. Appl Microbiol Biotechnol 25 : 220-223

Mondain-Monval F (1988) Cinétiques, modélisation et développement d'estimateurs de la fermentation glutamique. Ph D Thesis, INPL, Nancy

II. Etude de la réponse osmotique de *C. glutamicum* ATCC 17965 en culture continue sous limitation ammonium et potassium

Ce paragraphe est présenté sous forme d'une publication soumise à Applied Microbiology and Biotechnology.

S. Guillouet and J.M. Engasser

Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium and potassium-limited continuous cultures under high osmotic pressure.

Abstract : In order to determine the possible effect of nutrient limitations on the response of *Corynebacterium glutamicum* to a saline osmotic upshock, the bacteria were grown in continuous cultures, at osmotic pressure of 0.4 and 1.2 osmol.kg^{-1}, under ammonia and potassium limitations. At the low osmolality of 0.4 osmol/kg, the glutamate and proline levels of 15 and 5 mg/g dry weight respectively, were lower than previously reported in glucose-limited continuous cultures (50 and 10 mg/g dry weight, respectively). On the other hand, the internal trehalose pool was much higher at 40 mg/g dry weight. When increasing the medium osmolality to 1.2 osmol.kg^{-1} by NaCl addition, under ammonia limitation the proline content rose from 5 mg/g to 20 mg/g dry weight, the trehalose content from 40 to 70 mg/g dry weight, whereas the intracellular pool of glutamate remained essentially constant. An increase in the internal sodium content was also observed. Similar results were found for the internal pool of glutamate, proline and trehalose when growing *C. glutamicum* under potassium limitations at an osmolality of 1.2 osmol.kg^{-1}. There was also a higher level of sodium ions, of glutamine and alanine. According to the present results, whereas proline was previously reported as the dominantly accumulated osmoprotectant in *C. glutamicum* grown under glucose limitations, under ammonia and potassium limitations trehalose represented the dominantly synthesized metabolite.

Introduction

The osmotic pressure of the culture medium represents a critical parameter for an efficient production of glutamate by *Corynebacterium glutamicum.* (Mondain-Monval, 1988). In current fed-batch processes, *C. glutamicum* is first grown on a relatively high osmolality medium, usually

exceeding 1 osmol.kg^{-1}. In a second phase, one or several surfactants are added to trigger the excretion of glutamate and of other metabolites, such as trehalose and alanine.

Bacteria grown under high osmotic pressure can accumulate several compatible solutes, depending on the strain and the culture conditions (Csonka and Hanson 1991). *Brevibacteria* have been reported to synthesize proline (Kawahara et al. 1989), glutamine (Frings et al. 1993) and ectoines (Bernard et al. 1993, Frings et al. 1993), and *Corynebacteria* to accumulate proline (Wojcik, 1992) and glutamine (Frings et al. 1993). For *C. glutamicum* ATCC 17965, the addition in batch cultures of NaCl to the culture medium was reported to result in a decrease in the growth rate and in the glucose-to-biomass conversion yield, a transient uptake of Na^+, and a strong increase in proline intracellular content. The syntheses of the two other major intracellular metabolites, glutamate and trehalose, were not affected by osmotic upshock (Guillouet and Engasser 1995a). A similar intracellular accumulation of proline was reported when *C. glutamicum* was grown in glucose-limited continuous cultures upon salt addition. Under these conditions a concomitant rise in trehalose content was observed (Guillouet and Engasser 1995b).

As the levels of ammonia and potassium ions in the culture medium have also been shown to affect the metabolism of *C. glutamicum* (Mondain-Monval 1988), in the present study the osmotic response of the bacteria was further investigated under the conditions of ammonia and potassium limitations. NaCl additions were performed on ammonia and potassium-limited continuous cultures, respectively, and the accumulations of glutamate, proline and trehalose determined.

Materials and Methods

Bacterial strain and medium composition

Corynebacterium glutamicum melassecola (strain ATCC 17965), given by Orsan (Paris, France) was grown in the modified basal medium for *Corynebacterium* growth (Liebl et al. 1989). Catechol was replaced by a mixture containing nicotinic acid, *myo*-inositol, pantothenic acid, choline chloride and deferoxamine at a concentration of 3 mg/l each. Biotin and thiamine hydrochloride were used respectively at 30 µg/l and 2 mg/l. In ammonia-limited continuous cultures, ammonia concentration in the medium was reduced from 2.5 g/l to 0.7 g/l and glucose concentration was increased to 25 g/l. In potassium-limited continuous cultures, the medium contained no potassium and the glucose concentration was increased to 25 g/l.

Fermentation conditions

For the cultures performed under ammonia and potassium limitations, a 60 mL overnight culture of *Corynebacterium glutamicum* in basal medium was used to inoculate a 2 L SGI (Toulouse, France) fermentor containing 1 L of basal medium. After an initial batch growth at 0.4 osmol.kg^{-1}

, continuous cultures were started by feeding fresh medium and by withdrawing the culture broth through a peristaltic pump (Ismatec, Zürich, Switzerland). The dilution rate was fixed at 0.25 h^{-1}. When reaching steady state, the medium osmolality was increased to 1.2 osmol.kg^{-1} by addition of 25 g/l NaCl both to the culture and feed medium. Fermentations were performed at a controlled temperature of 35 °C, pH of 7.3, and an aeration rate with air of 50 l/h.

Analyses

During the fermentation, samples were collected and centrifuged for 2 minutes (6000 g, 4°C). The biomass concentration was determined by the dry cell weight method. Sugars and organic acids analyses were performed on the supernatant by HPLC (Waters model 712, St Quentin, France) using a Brownlee Polypore H column, operated at 65°C and with H_2SO_4 (0.02 M) elution, an UV detector and a refractometer for detection.

For the determination of intracellular ions, samples were harvested by filtration through 0.45-µm Whatman filters (Maidstone, England). Filtered cells were rinsed with 3-morpholinepropane-sulphonic acid (MOPS) cold buffer at pH 7.3, consisting of 50 mM MOPS and 800 mM NH_4OH. The osmotic pressure of the cold buffer, which did not contain Na^+ or K^+, was adjusted to the osmotic pressure of the culture medium by addition of $(NH_4)_2SO_4$ in order to avoid a possible cations efflux. Cells were resuspended in 4 ml $HClO_4$ 20% and extracted by three freezing-thawing cycles. The biomass concentration in $HClO_4$ solution was constant at 2 g dry weight/l. A blank was carried out under the same conditions without bacteria. Extracts were 100-fold diluted and analysed using an atomic absorption spectrometer (Varian Spectra AA-20, Les Ulis, France). Measurements were performed in triplicate and typically agreed to ± 10%.

For the extraction of intracellular metabolites, samples were first centrifuged for 2 minutes (6000 g, 4°C). The cell pellet was collected and extracted by suspending in cold distilled water for 15 minutes followed by three freezing-thawing cycles. This method of metabolite extraction was found to give identical results when compared to alternative published techniques, such as extraction in boiling water or with perchloric acid. The biomass concentration in cold water was set at 5 g dry weight/l. The suspension was then centrifuged for 2 minutes (7000 g, 0°C) and the analysis of intracellular metabolites performed on the supernatant. After derivatization with *ortho*-phthaldialdehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) reagents, amino acids were analysed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al. 1992). The reproducibility within a given 5-fold determination was typically ± 5% for proline and 15% for glutamate, glutamine and alanine.

Free intracellular trehalose of the cell extract was measured following enzymatic hydrolysis to glucose by trehalase (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). The reaction mixture containing trehalase (4 mU) and cell extract in phosphate-citrate buffer (120 mM disodium phosphate - 40 mM citric acid, pH 5.7) was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. Glucose was measured enzymatically by the glucose oxidase/peroxidase kit (Sigma). A blank without trehalase was prepared to evaluate the possible contamination with glucose from the culture medium or from the intracellular medium. The concentration of trehalose in the extract was calculated from a standard curve prepared with trehalose (Sigma). The reproducibility within a given fivefold determination was typically ± 15%. The osmotic pressure of the medium was measured with a cryoscopic osmometer Hermann Roebling (Berlin, Germany).

Results

Response of an ammonia-limited continuous culture to an osmotic saline upshock

C. glutamicum was grown in a continuous culture at a dilution rate of 0.25 h^{-1}, with a feed medium containing 25 g/l glucose and 0.7 g/l ammonia. At an initial osmolarity of 0.4 osmol.kg^{-1} a steady-state level of 6.2 g/l biomass and less than 2 mg/l ammonia was reached (Fig. 1). When the osmotic pressure of the culture and feed medium was increased to 1.2 osmol.kg^{-1} by NaCl addition, one observed a reduction of biomass level to 3.5 g/l, together with a slight increase, at steady-state, of the intracellular level of Na^+ to 15 mg/g dry weight and of K^+ to 25 mg/g dry weight. The osmotic upshock also resulted in a strong increase in intracellular proline which first rose from 5 mg/g to 65 mg/g dry weight in about one hour. Afterwards, the proline intracellular content decreased to 20 mg/g dry weight. The intracellular concentration of glutamic acid, which was initially 20 mg/g dry weight, increased only slightly after the salt addition. Most interestingly, under ammonia limitation trehalose was found as the dominant intracellular metabolite. It first increased from 35 to 80 mg/g dry weight and then decreased to a stable level of 70 mg/g dry weight. In addition, the osmotic shock produced a slight accumulation of glutamine and alanine.

To further evaluate the influence of the bacterial growth rate on the intracellular accumulation, an osmotic saline upshock from 0.4 to 1.2 osmol.kg^{-1} was also performed on a continuous culture operated at a lower dilution rate of 0.1 h^{-1}. At high osmotic pressure the measured steady-state levels of intracellular metabolites are indicated in Table 1. As seen, lowering the dilution rate had no significant effect on the proline, glutamate and trehalose contents.

		Intracellular content (mg/g dry weight)		
Growth rate	Osmolality	Glutamic acid	Proline	Trehalose
0.1 h^{-1}	0.4 osmol.kg^{-1}	25	5	35
0.1 h^{-1}	1.2 osmol.kg^{-1}	30	15	70
0.25 h^{-1}	0.4 osmol.kg^{-1}	25	5	35
0.25 h^{-1}	1.2 osmol.kg^{-1}	25	20	65

Table 1 : Effect of the growth rate on the steady-state intracellular content of *C. glutamicum* grown in ammonia-limited continuous culture at osmolalities of 0.4 and 1.2 osmol.kg^{-1}.

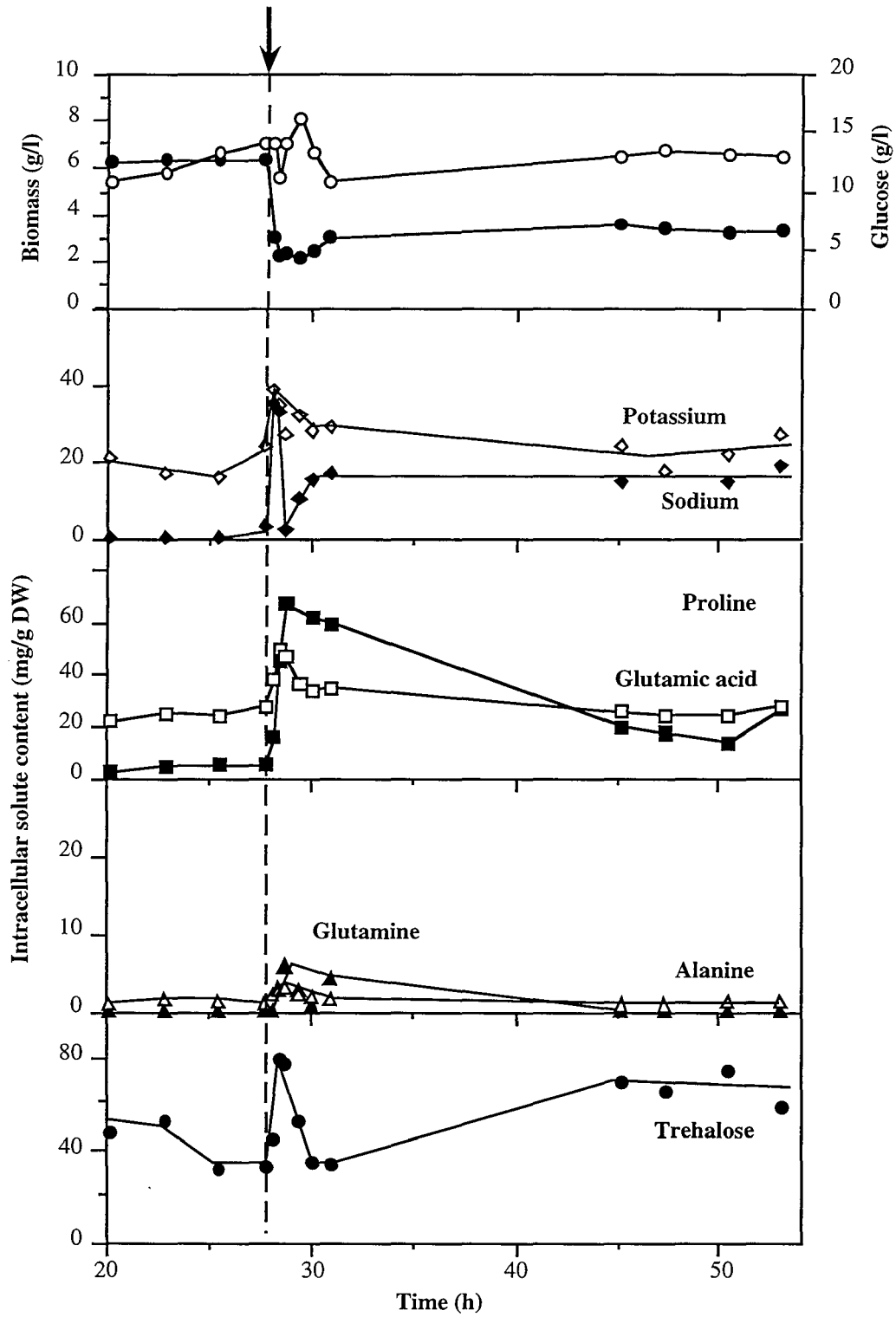


Fig. 1 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of *C. glutamicum* grown in an ammonia-limited continuous culture at a dilution rate of 0.25 h^{-1}. ● Biomass, ○ glucose concentration ; ◇ Potassium, ◆ sodium, ■ proline , □ glutamate, ▲ glutamine , △ alanine, ● trehalose intracellular concentration. The fermentation was started at a medium osmolality of 0.4 $osmol.kg^{-1}$, and NaCl was added (*arrow*) to rise the osmotic pressure to 1.2 $osmol.kg^{-1}$.

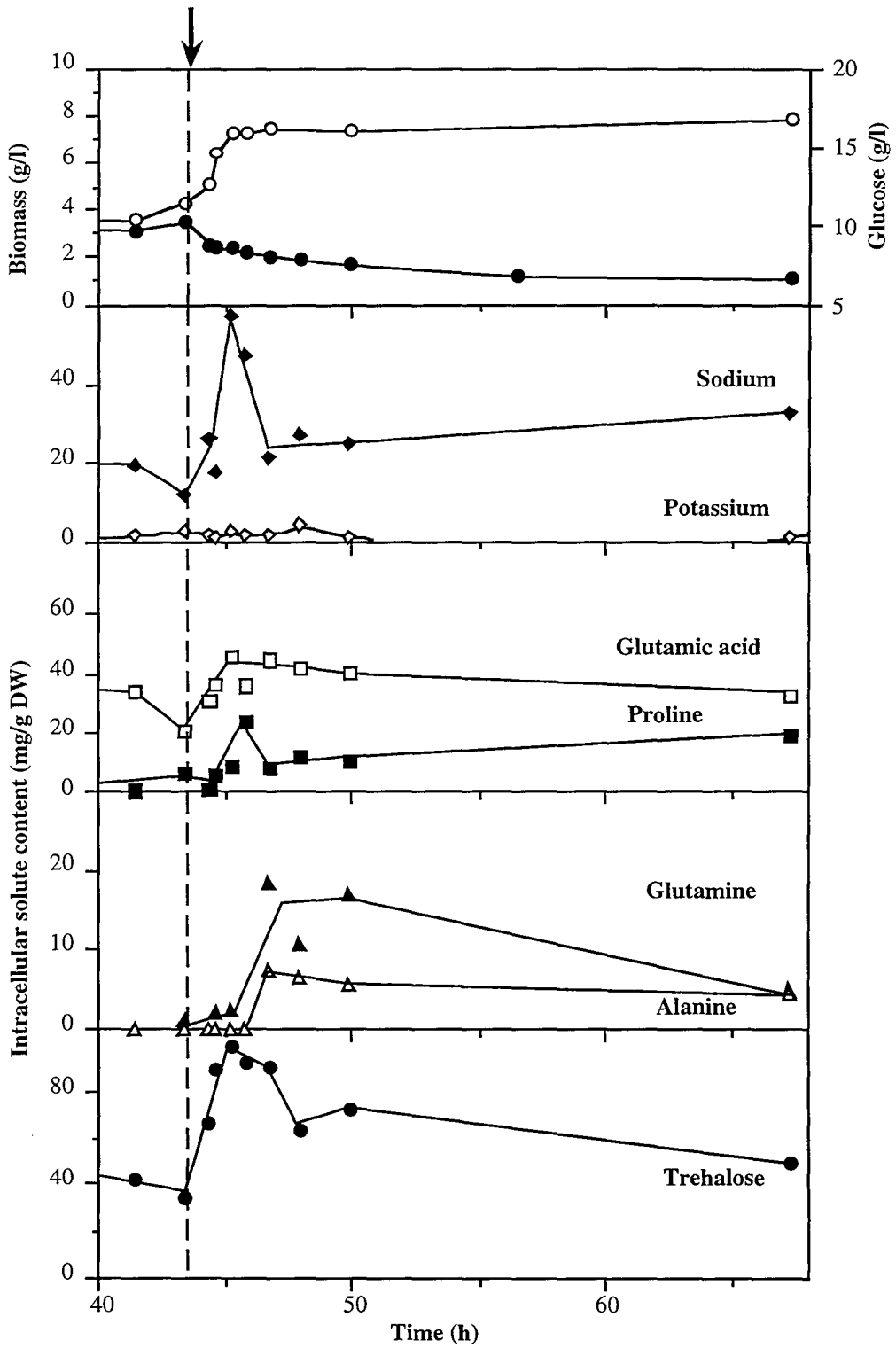


Fig. 2 : Effect of a saline upshock on the intracellular solute content of *C. glutamicum* grown in a potassium-limited continuous culture at a dilution rate of 0.1 h^{-1}. ● Biomass, ○ glucose concentration ; ◇ Potassium, ◆ sodium, ■ proline , □ glutamate, ▲ glutamine , △ alanine, ● trehalose intracellular concentration. The fermentation was started at a medium osmolality of 0.4 osmol.kg^{-1}, and NaCl was added (*arrow*) to rise the osmotic pressure to 1.2 osmol.kg^{-1}.

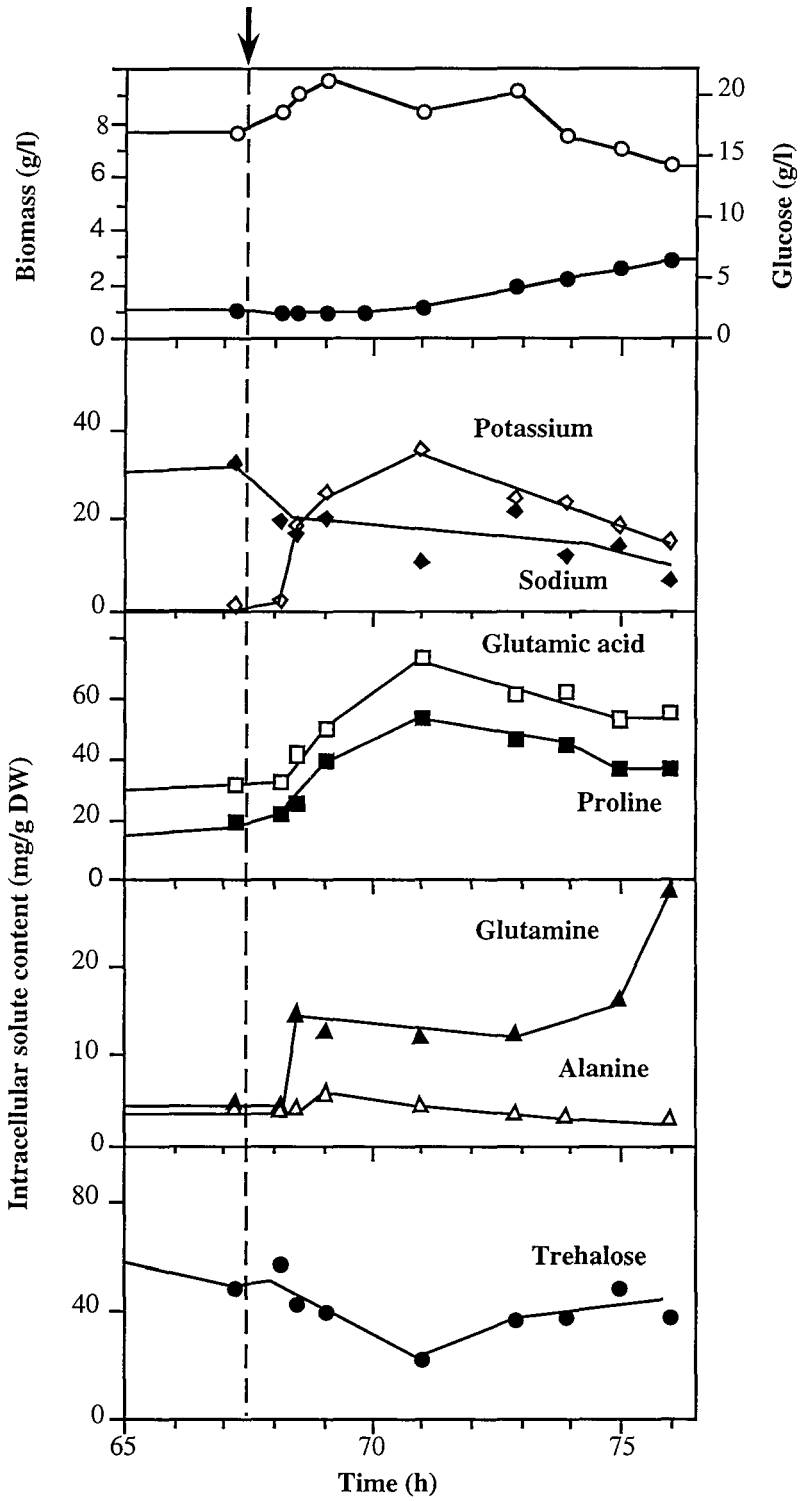


Fig. 3 : Effect of a pulse of potassium on the intracellular solute content of *C. glutamicum* grown in a potassium-limited continuous culture at a medium osmolality of 1.2 osmol.kg^{-1} and at a dilution rate of 0.1 h^{-1}. ● Biomass, ○ glucose concentration ; ◇ potassium, ◆ sodium, ■ proline , □ glutamate, ▲ glutamine , △ alanine, ● trehalose intracellular concentration. The fermentation was initially at steady state and 0.1 g of KCl was added (*arrow*) in the reactor.

Response of a potassium-limited continuous culture to an osmotic saline upshock

To investigate the osmotic response of *C. glutamicum* under potassium limitation, a continuous culture was operated with a feed medium depleted of potassium ions. Under these conditions, because of a strong reduction in the maximal specific growth rate, continuous cultures of *Corynebacterium glutamicum* could only be established at the lower dilution rate of 0.1 h^{-1}. Increasing the osmotic pressure from 0.4 to 1.2 osmol.kg^{-1} by NaCl addition resulted in a decreased steady-state biomass level from 3 g/l to 1 g/l, and an increase in the steady-state Na+ level from 20 to 30 mg/g dry weight (Fig. 2). The level of trehalose, the major intracellular metabolite at the low osmolality, strongly increased from 40 mg/g to 100 mg/g dry weight, and then decreased to a level of 60 mg/g dry weight. Both glutamic acid and proline remained at relatively low levels around 20-35 mg/g dry weight. At elevated osmolalities one also observed an accumulation of glutamine and alanine; their levels first rose during two hours to 20 and 8 mg/g dry weight, then further decreased to 5 mg/g dry weight.

In order to confirm the finding that potassium limitations strongly shift the bacteria metabolism towards trehalose synthesis, when reaching steady-state at 1.2 osmol.kg^{-1}, 0.1 g of KCl was injected in the reactor (Fig. 3). This produced a potassium uptake during the 4 first hours, with a concomitant rise in the glutamate and proline content to 75 mg/g and 55 mg/g dry weight respectively, and a strong decrease in the trehalose content from 60 to 20 mg/g dry weight. When potassium was further diluted out the culture medium, one observed a reduced accumulation of glutamic acid and proline content but an increased accumulation of trehalose.

Discussion

The results of this study on the accumulation of glutamate, proline and trehalose by *C. glutamicum* grown in continuous under ammonia and potassium limitations can be compared to the results previously reported for saline upshocks on glucose-limited continuous cultures (Guillouet and Engasser 1995b). In all cases the addition of NaCl resulted in a decreased sugar to biomass conversion yield. Different culture conditions, however, led to differences in the accumulation of compatible solutes, as shown in Figure 4, which compares, at the same dilution rate of 0.1 h^{-1}, the steady-state intracellular pools of proline, glutamate and trehalose for the three continuous cultures.

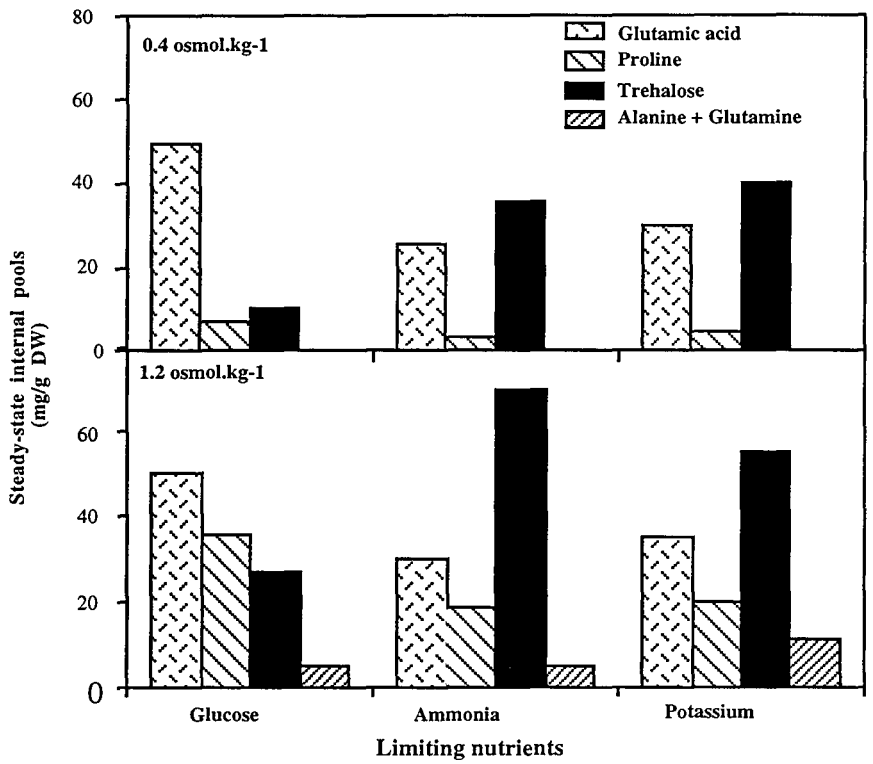


Fig . 4 : Effect of nutrient limitation on the steady-state intracellular content of *C. glutamicum* grown in continuous culture at osmolalities of 0.4 and 1.2 osmol.kg^{-1} and a dilution rate of 0.1 h^{-1}:
glutamic acid, proline, trehalose, glutamine plus alanine.

A first difference is the lower intracellular pool of glutamate under ammonia and potassium limitations as compared to internal pool of cells grown in glucose-limited culture. This effect of ammonia and potassium limitations on glutamate biosynthesis has been reported with other strains. In enteric microorganisms, for instance, glutamate dehydrogenase, the main enzyme of the glutamate biosynthesis pathway, was observed to function only with sufficient ammonia in the growth medium (Rosenfeld and Brenchley 1983). In *Brevibacterium flavum,* the *in-vitro* glutamate dehydrogenase activity was found significantly reduced at low ammonia concentration (Shiio and Ozaki 1970). On the other hand, an increased glutamate dehydrogenase *in-vitro* activity was observed at high potassium concentrations in *Brevibacterium flavum* (Shiio and Ozaki 1970), *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (Measures 1975).

A similar environmental effect is obtained for the accumulation of proline, which was found reduced under ammonia and potassium limitations. Such an influence of potassium ions on the intracellular pool of proline has previously been reported with *C. glutamicum* grown in shake flasks (Wojcik 1992) and with *Bacillus subtilis.* (Whatmore et al. 1990). On the other hand, under

ammonia and potassium limitations *C. glutamicum* was shown to accumulate much higher trehalose levels, up to 70 mg/g dry weight, than under glucose limitations. Strong accumulations of trehalose have previously been reported in *E. coli* strains defective in the potassium transport (Dinnbier et al. 1988). Trehalose is also well known to accumulate in bakers yeast under nitrogen limitations (Pearce et al. 1989).

Comparing the intracellular contents, at low and high osmolarities, for the glucose, ammonia and potassium limited continuous cultures shows that in all cases the osmotic response of *C. glutamicum* consisted in increased contents of proline, trehalose, alanine and glutamine. After the addition NaCl to the medium, C. glutamicum also accumulated a higher level of ions (Fig.5). In glucose and ammonia-limited cultures, both Na^+ and K^+ contributed to the intracellular ionic pool, with K^+ being the dominant ion at a level of 25 mg/g dry weight. In the potassium-limited culture, on the contrary, there was no accumulation of K^+, and the internal pool of Na^+ increased up to 30 mg/g dry weight.

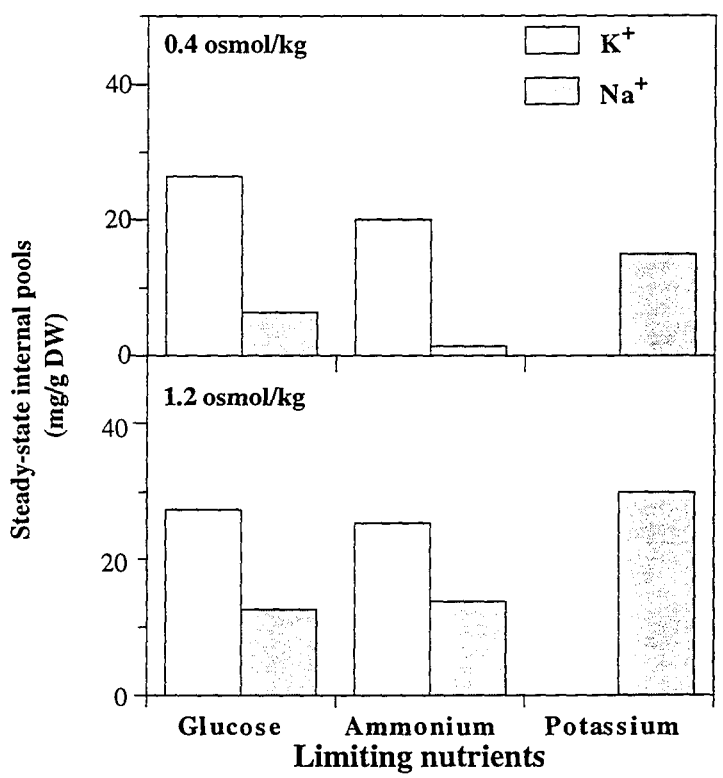


Fig . 5 : Effect of the nutrient limitation on the steady-state intracellular ionic content of *C. glutamicum* grown in continuous cultures at an osmolality of 0.4 and 1.2 osmol.kg^{-1} and a dilution rate of 0.1 h^{-1}:
□ sodium and □ potassium.

The accumulation of compatible solutes and ionic species allows the cells to increase their osmotic pressure, and thus to maintain a positive turgor, in response to a hyperosmotic environment (Csonka and Hanson 1991). To give an idea of the respective contributions of the different solutes and ions to the internal osmotic pressure, in Figure 6 the cumulative intracellular pools, expressed in mmole/g dry weight of cells, are indicated for the three continuous cultures at the external osmotic pressure of 1.2 osmol.kg^{-1}. As seen, although the composition of the cytoplamic pool was significantly altered by the culture conditions, the total amount of osmolytes was only slightly affected. It can also be noticed that sodium and potassium ions had a major contribution to the internal osmotic pressure.

In conclusion, results obtained with *C. glutamicum* on grown continuous cultures indicate that, in response to a saline upshock, the bacteria restore turgor simultaneously by taking up salts from the medium and by stimulating the biosynthesis of mainly proline or trehalose, depending on the nature of the nutrient limitation. The more precise mechanisms of the osmotic regulation of the bacteria still remain to be investigated.

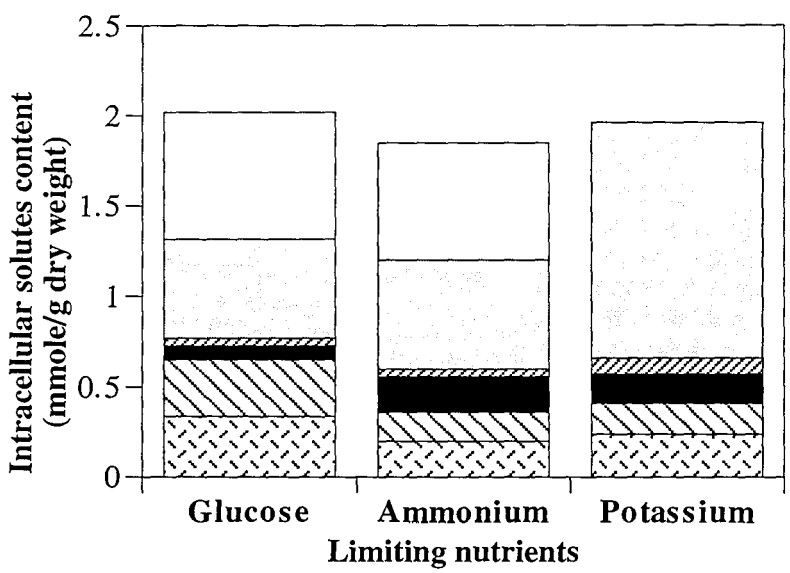


Fig . 6 : Comparison between the steady-state intracellular content of *C. glutamicum* grown in continuous culture under the different nutrient limitation at an osmolality of 1.2 osmol.kg^{-1} and a dilution rate of 0.1 h^{-1}:
glutamic acid, proline, trehalose, glutamine plus alanine, sodium and potassium.

ACKNOWLEDGMENT

This research was sponsored by the CNRS Groupement de Recherche 1157 on Corynebacteria and by the Orsan Company

REFERENCES

Bernard, T., Jebbar, M., Rassouli, Y., Himdi-Kabbab, S., Hamelin, J., Blanco, C. 1993 Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. J. Gen. Microbiol. 139 : 129-136.

Csonka, L.N., Hanson, A.D. 1991 Procaryotic osmoregulation : genetics and physiology. Annu. Rev. Microbiol. 45 : 569-606.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., Bakker, E.P. 1988 Transient accumulation of K^+-glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *E. coli* K12 to elevated NaCl concentrations. Arch. Microbiol. 150 : 348-357.

Frings, E., Kunte, H.J., Galinski, E.A. 1993 Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* : occurence of the tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol. Lett. 109 : 25-32.

Godel, H., Seitz, P., Verhoef, M. 1992 Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. LC GC Int. 5 (2) : 44-49.

Guillouet, S., Engasser, J.M. 1995a Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : 315-320.

Guillouet, S., Engasser, J.M. 1995b Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. Appl. Microbiol. Biotechnol. In press.

Kawahara Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y., Ikeda, S. 1989 Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. 53 (9) : 2475-2479.

Krämer, R., de Graaf, A., Eggeling, L., Eikmanns, B., Sahm H. 1994 Biosynthesis and secretion of amino acids in coryneform bacteria. pp 595-602. In: L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (eds), Proceedings of the 6th European Congress in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam.

Liebl, W., Klamer, R., Schleifer, K.H. 1989 Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 205-210.

Measures, J.C. 1975 Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature 257 : 398-400.

Mondain-Monval, F. 1988 Cinétiques, modélisation et développement d'estimateurs de la fermentation glutamique. Ph. D. thesis, INPL, Nancy, France.

Pearce, D.A., Rose, A.H., Wright, I.P. 1989 Trehalose and trehalase in active dried yeast. 7th international symposium on yeasts. J Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Rosenfeld, S.A., Brenchley, J.E. 1983 Regulation of glutamate and glutamine biosynthesis. pp1-49. In: R.L. Someville (ed), Amino acids : biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley, Reading.

Shiio, I,. Ozaki, H. 1970 Regulation of NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate producing bacterium. J. Biochem. 68 : 633-647.

Whatmore, A.M., Chudek, J.A., Reed, R.H. 1990 The effects of osmotic upshock on the intracellular solutes pools of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 136 : 2527-2535.

Wojcik, F. 1992 Réponse osmotique chez *Corynebacterium glutamicum* : aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires. Ph. D. thesis, Orsay, Paris.

III. Etude de l'accumulation de tréhalose en culture continue

Nous avons vu, au cours de ce chapitre, que, contrairement à ce qui a été observé en culture discontinue, la bactérie accumule du tréhalose en culture continue en réponse à un choc osmotique. Nous allons essayer de trouver une explication à ce phénomène. Pour cela, l'analyse des vitesses spécifiques d'accumulation de tréhalose devrait nous apporter des informations supplémentaires à celle des pools intracellulaires.

III.1. Sous limitation glucose

Il a été observé précédemment qu'à l'état stationnaire la vitesse spécifique de consommation du glucose (v_{Glc}) augmentait avec le taux de dilution mais également avec l'osmolarité du milieu (Figure n°3, publi). De manière à déterminer l'influence de cette augmentation sur l'accumulation de la proline et du tréhalose, les vitesses spécifiques d'accumulation interne de ces composés ont été calculées à l'état stationnaire et représentées en fonction de v_{Glc} (*cf* Figure n°IV.1).

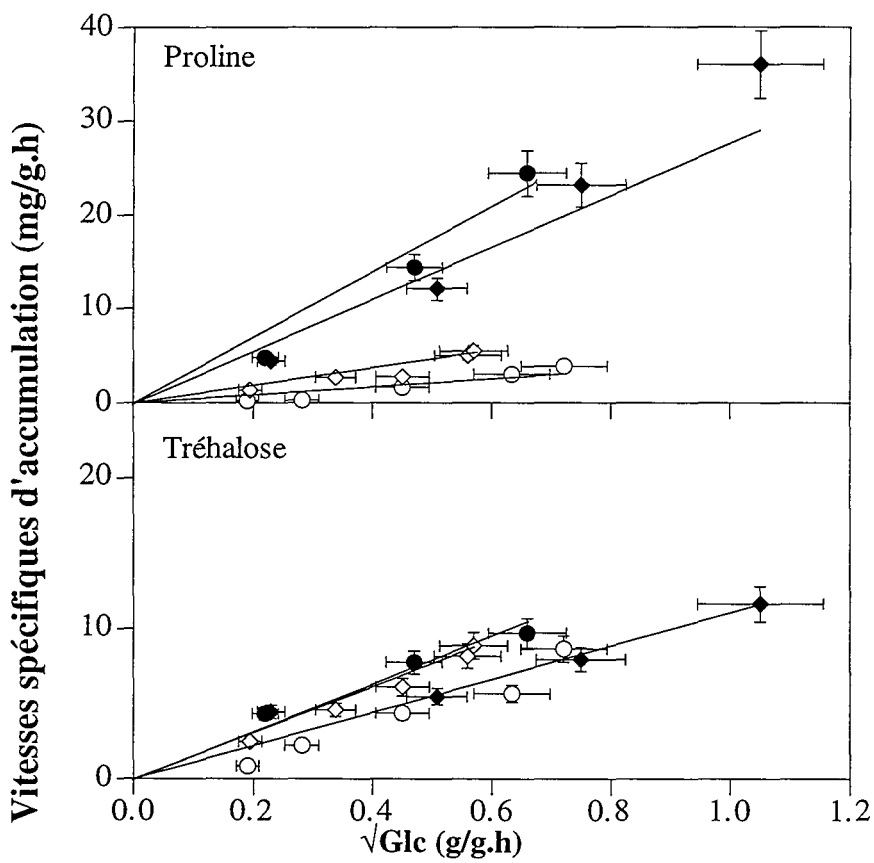


Figure n°IV.1 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de proline et de tréhalose. Les vitesses ont été calculées à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 sous limitation glucose et à différentes osmolalités : 0,4 (○), 0,85 (◇), 1,5 (◆) et 2,4 (●) osmol.kg^{-1}.

La vitesse spécifique d'accumulation de proline augmente linéairement avec v_{Glc} et également avec l'osmolarité du milieu de culture. Par contre la vitesse spécifique d'accumulation de tréhalose ($\Pi_{tré}$) évolue simplement en fonction du v_{Glc}. L'élévation de la vitesse spécifique de consommation du glucose s'accompagne d'une augmentation du flux carboné au sein du métabolisme ce qui peut expliquer l'augmentation des vitesses spécifiques d'accumulation des métabolites.

III.2. Sous limitation ammonium et potassium

Les vitesses spécifiques d'accumulation interne de tréhalose ($\Pi_{tré}$) ont été également calculées à l'état stationnaire sous limitation ammonium et potassium. Les vitesses calculées à l'état stationnaire à 1,2 osmol.kg^{-1} sont représentées en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose (Figure n°IV.2).

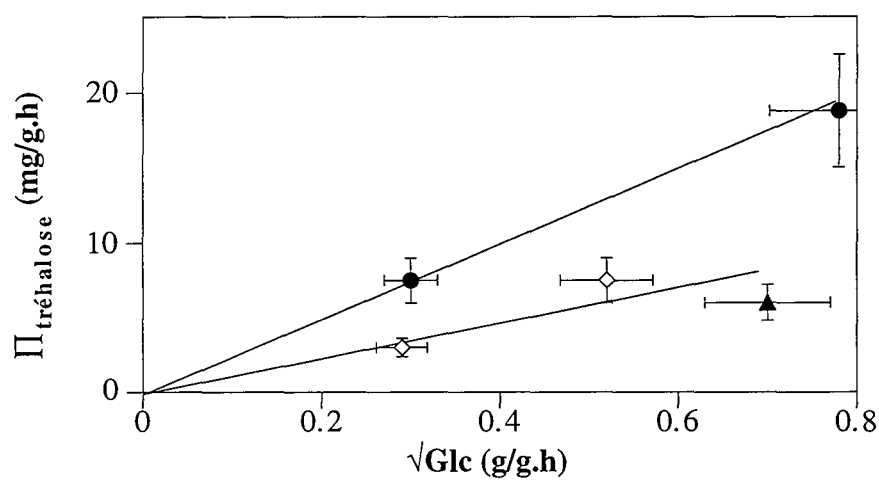


Figure n°IV.2 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de tréhalose. Les vitesses ont été calculées à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 à 1,2 osmol.kg^{-1} sous limitation: glucose (◇), potassium (▲) et ammonium (●).

La vitesse spécifique d'accumulation de tréhalose varie linéairement avec celle de consommation de glucose. A partir des droites obtenues, on peut observer qu'à v_{Glc} équivalent, le $\Pi_{tré}$ est plus élevé sous limitation ammonium que sous limitation glucose. A l'inverse, les vitesses spécifiques d'accumulation de tréhalose sont équivalentes sous limitation potassium et glucose.

De manière à vérifier l'effet de l'augmentation de la pression osmotique sur l'accumulation de tréhalose, les $\Pi_{tré}$,et Π_{pro} calculées à l'état stationnaire à 0,4 et 1,2 osmol.kg^{-1} sous limitation ammonium et potassium, ont été reportées en fonction du v_{Glc} (Figure n°IV.3).

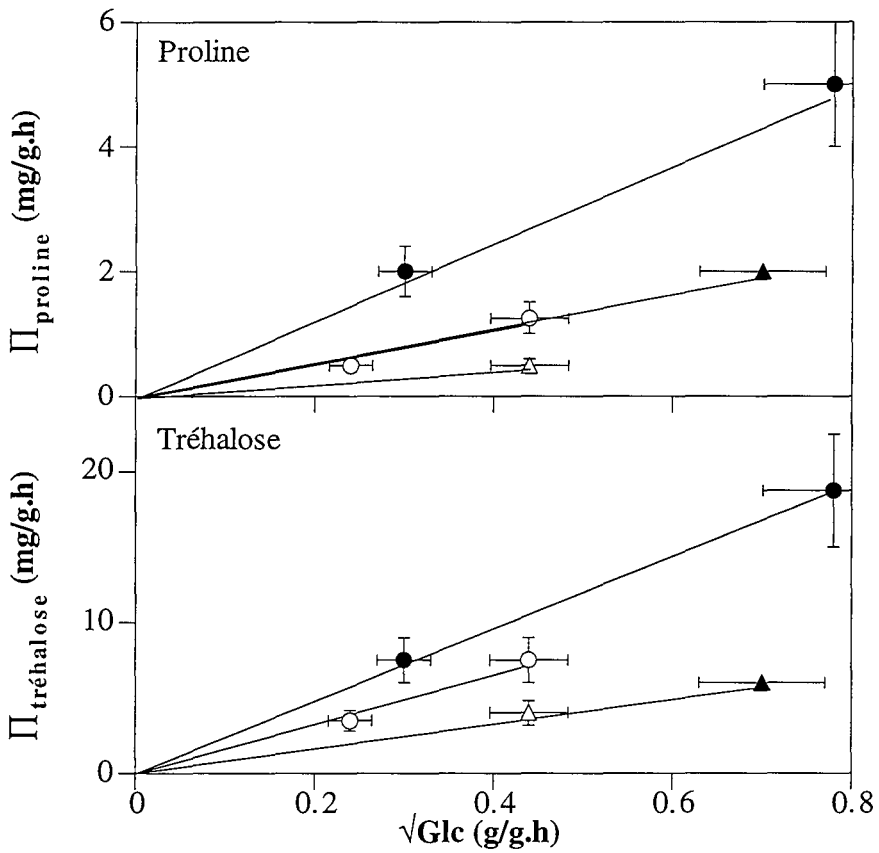


Figure n°IV.3 : Influence de la vitesse spécifique de consommation de glucose sur les vitesses spécifiques d'accumulation de proline et de tréhalose. Les vitesses ont été calculées à l'état stationnaire de cultures continues de C. glutamicum ATCC 17965 à 0,4 (blanc) et 1,2 (noir) osmol.kg^{-1} sous limitation potassium (▲△) et ammonium (●○).

Contrairement à la proline où l'effet de la pression osmotique sur la vitesse spécifique d'accumulation est net, il est moins évident pour le tréhalose. Sous limitation potassium, la vitesse d'accumulation de tréhalose ne semble pas varier avec l'osmolarité du milieu de culture mais avec la vitesse spécifique de consommation du glucose. Par contre, sous limitation ammonium, la différence de pente entre les droites obtenues montre qu'à v_{Glc} équivalent, les $\Pi_{tré}$ sont légèrement plus fortes sous osmolarité élevées. L'effet stimulant de la pression osmotique sur l'accumulation de tréhalose sous limitation ammonium reste, malgré tout, faible.

III.3. Discussion - conclusion

A partir de l'analyse des vitesses spécifiques d'accumulation de proline et de tréhalose, nous avons observé une augmentation de ces vitesses avec la vitesse spécifique de consommation de glucose (v_{Glc}) pouvant s'expliquer aisément par la répercussion de l'augmentation du flux carboné au sein du métabolisme. Néanmoins une différence a été constatée entre la proline et le tréhalose.

Les résultats obtenus avec la proline montrent que son accumulation est bien liée à l'élévation de la pression osmotique. Par contre, l'accumulation de tréhalose semble répondre à l'élévation du v_{Glc} plutôt qu'à celle de l'osmolarité. Le tréhalose ne serait pas un osmorégulateur en soi puisque sa synthèse n'est pas directement stimulée par le choc osmotique.
Le pool intracellulaire de tréhalose de *C. glutamicum* en culture continue sous limitation glucose est inférieur à celui mesuré en culture discontinue. Outre l'effet de la limitation en glucose, l'influence de la vitesse spécifique de consommation du glucose pourrait être une explication à ce phénomène. En effet, les valeurs de v_{Glc} sont transitoirement plus élevées lors d'une culture discontinue que lors d'une culture continue.

Enfin la même analyse sur les autres cultures continues indique que, sous limitation potassium, la teneur intracellulaire élevée en tréhalose résulte uniquement de l'augmentation de la vitesse de consommation de glucose. A l'inverse, sous limitation ammonium, l'augmentation de la pression osmotique du milieu et de la vitesse de consommation de glucose semblent responsables de l'accumulation élevée de tréhalose.

IV. Récapitulation des résultats

1 - L'étude cinétique de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en culture continue sous limitation glucose confirme les résultats obtenus en culture discontinue. Notamment les phénomènes observés à la suite d'un ajout de NaCl dans le milieu sont :

- ❑ une accumulation transitoire d'ions sodium
- ❑ une synthèse importante de proline dépendante de l'osmolarité du milieu
- ❑ un pool relativement constant d'acide glutamique quelque soit l'osmolarité du milieu

2 - L'étude en culture continue a mis en évidence l'influence de la vitesse spécifique de croissance sur l'accumulation intracellulaire de proline. A osmolarité constante, le pool de proline est d'autant plus élevé que le taux de croissance est fort.

3 - L'augmentation de la pression osmotique du milieu entraîne une élévation de la vitesse spécifique de consommation du glucose. L'accumulation de tréhalose observée est d'avantage liée à cette variation de vitesse de consommation de glucose qu'à l'osmolarité.

4 - L'étude sur l'influence de limitations nutritionnelles en culture continue a montré l'importance de la proline dans la lutte contre une élévation de la pression osmotique. En culture continue limitée en ammonium ou en potassium, le pool intracellulaire de glutamate et de proline est amoindri, tandis que celui de tréhalose augmente. La production de biomasse est, dans ce cas, plus affectée après l'ajout de NaCl.

5 - L'augmentation de la vitesse de consommation du glucose, suite au choc osmotique, semble responsable du contenu cellulaire en tréhalose élevé observé sous limitation potassium. Sous limitation ammonium, l'accumulation de tréhalose semble en plus activée par l'ajout de NaCl.

CHAPITRE V

Etude de souches mutées dans la voie de biosynthèse de l'acide glutamique et de la proline : répercussions sur la réponse osmotique

Chapitre V : Etude de souches mutées dans la voie de biosynthèse de l'acide glutamique et de la proline : répercussion sur la réponse osmotique

I. Etude cinétique et physiologique d'un mutant gdhA 166

I.1. Présentation de la souche mutante gdhA 166

I.2. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites 166

I.3. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752 168

I.4. Discussion - conclusion 168

II. Etude cinétique et physiologique des mutants proA et proC 170

II.1. Présentation des mutants proA etproC 170

II.2. Etude du mutant proA 170

II.2.1. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites. 170

II.2.2. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752 172

II.3. Etude du mutant proC 173

II.3.1. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites 173

II.3.2. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752 173

II.4. Discussion - conclusion 175

III. Récapitulation des résultats 176

Etude de souches mutées dans la voie de biosynthèse de l'acide glutamique et de la proline : répercussion sur la réponse osmotique

Ce chapitre est consacré à l'étude cinétique de trois souches recombinées de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 cultivées en culture discontinue en milieu synthétique et soumises à un choc osmotique par addition de NaCl. Les souches recombinées nous ont été fournies par l'Institut de Génétique et de Microbiologie de l'Université d'Orsay et concernent des mutants de la voie de biosynthèse du glutamate et de la proline.

L'étude d'une souche déficiente en glutamate deshydrogénase a été motivée par la volonté de mieux comprendre l'accumulation transitoire d'acide glutamique observée précédemment chez la souche ATCC 14752.

Les études précédentes font apparaître le rôle important de la proline dans les phénomènes de résistance à la pression osmotique. L'étude des souches génétiquement modifiées dans la voie de biosynthèse de la proline a été réalisée de manière à confirmer sans ambiguité l'importance de la proline dans la réponse osmotique de *C. glutamicum*.

Nous nous sommes donc appliqués à déterminer les répercussions de ces mutations sur la croissance et sur la réponse osmotique de la bactérie.

I. Etude cinétique et physiologique d'un mutant *gdhA*

I.1. Présentation de la souche mutante *gdhA*

Le mutant *gdhA* est une souche de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 mutée dans la voie de biosynthèse de l'acide glutamique. Elle est déficiente en glutamate deshydrogénase, enzyme qui catalyse le passage de l'α-cétoglutarate en glutamate. Le gène GdhA codant pour la synthèse de l'enzyme a été inactivé par insertion de cassette.

Activité spécifique (µmole/min.mg protéine)	ATCC 14752	*gdhA*
glutamate deshydrogénase	3,4 ± 0,7	0
gogat	0,3 ± 0,09	0,4 ± 0,12
aspartate transaminase	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,25

Tableau n°V.1 : Activités spécifiques mésurées chez *C. glutamicum* ATCC 14752 et *gdhA*. *Intervalles de confiance calculés avec 4 déterminations indépendantes*

Le dosage des activités spécifiques sur la souche *gdhA* confirme l'absence de la glutamate deshydrogénase. Par ailleurs, la quantité de gogat et d'aspartate transaminase est identique chez les deux souches.

I.2. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites

La souche *gdhA* a été cultivée en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1} en culture discontinue. Sa vitesse spécifique maximale de croissance est alors de 0,37 h^{-1} et le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,45 g/g. Lorsque la souche est soumise à un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} par addition de NaCl dans le milieu, le μ_{max} chute à une valeur de 0,2 h^{-1} et le rendement de croissance sur glucose à 0,3 g/g.

A la suite du choc osmotique, le contenu intracellulaire en proline augmente de 5 à 70 mg/g matière sèche tandis que le pool de glutamate fluctue entre 40 et 60 mg/g matière sèche (Figure n°V.1). On peut remarquer l'absence de pic transitoire d'acide glutamique chez cette souche. La teneur interne en tréhalose augmente rapidement après l'ajout de NaCl de 50 à 120 mg/g matière sèche puis se stabilise autour de 80 mg/g matière sèche.

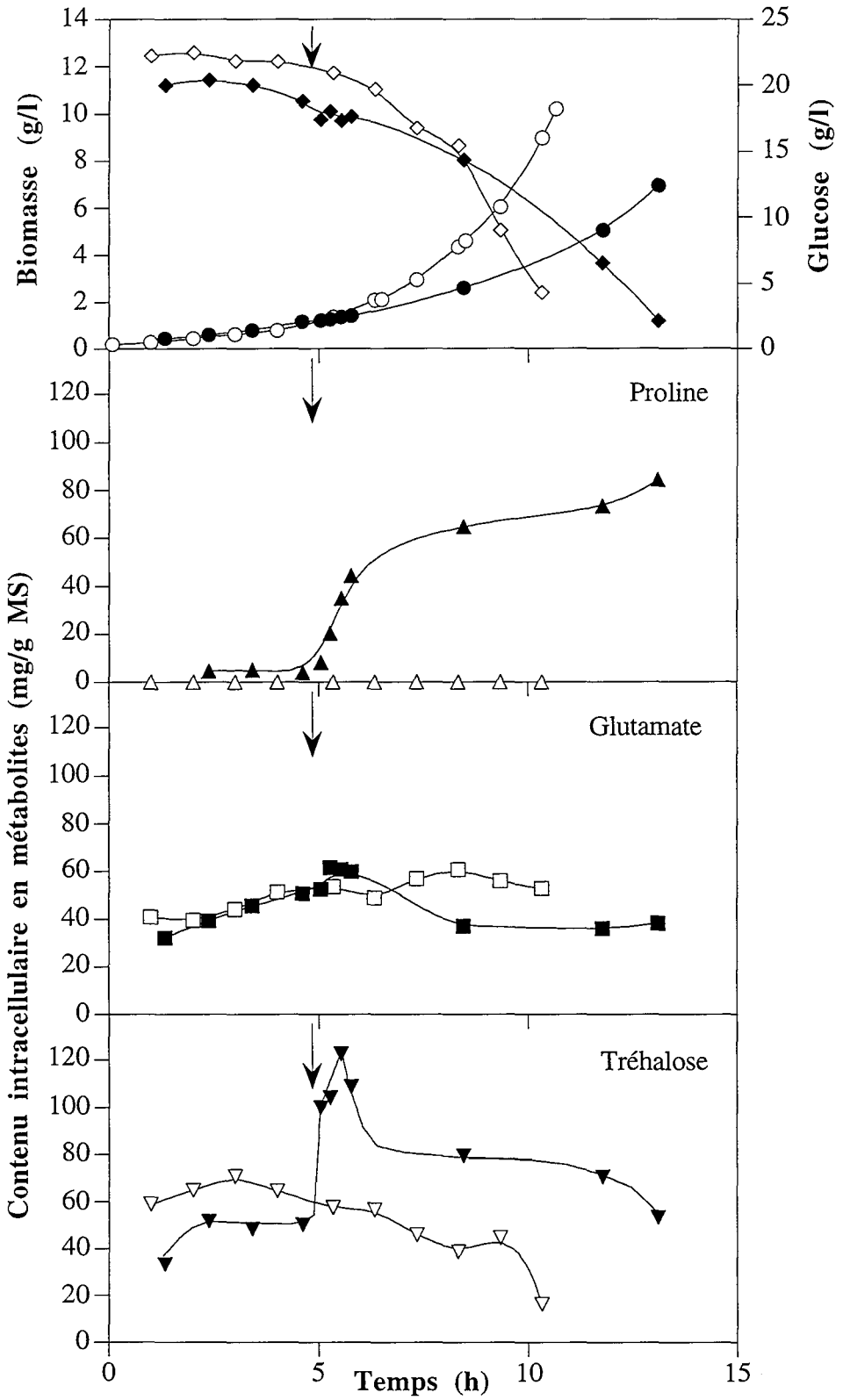


Figure n°V.1 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant *gdhA* à 0,4 osmol.kg^{-1}(blanc) et à 1,5 osmol.kg^{-1} (noir) après addition de NaCl (flèche) : Biomasse (●○), glucose (◆◇).

I.3. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752

Les paramètres de croissance de la souche *gdhA* et de sa souche mère sont très proches. Si le μ_{max} de souche *gdhA* (0,37 h^{-1}) est légèrement inférieur à celui de la souche sauvage (0,44 h^{-1}) à 0,4 osmol.kg^{-1}, par contre à osmolalité élevée (1,5 osmol.kg^{-1}) le μ_{max} des deux souches est identique (0,2 h^{-1}) (Tableau n°V.2).

		ATCC 14752		*gdhA*	
		0,4 Osm	1,5 Osm	0,4 Osm	1,5 Osm
	μ_{max} (h^{-1})	0,44	0,20	0,37	0,20
	$R_{x/s}$ (g/g)	0,45	0,25	0,45	0,3
Pool intracellulaire (mg/g MS)	Proline	1	55	1	70
	Glutamate	90	90	50	40
	Tréhalose	20	40	50	80

Tableau n°V.2 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites de*C. glutamicum* ATCC 14752 et *gdhA* cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.

La principale différence observée entre les deux souches est le contenu intracellulaire d'acide glutamique deux fois inférieur chez la souche mutée (50 mg/g matière sèche) que chez la souche mère (90 mg/g matière sèche). La proline devient alors l'acide aminé majoritaire chez le mutant *gdhA* cultivée à 1,5 osmol.kg^{-1}, alors que le pool intracellulaire de glutamate est supérieur à celui de la proline chez la souche sauvage à cette osmolarité.
Enfin le contenu interne en tréhalose est deux fois supérieur chez la souche recombinée à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1} que chez la souche sauvage.

I.4. Discussion - conclusion

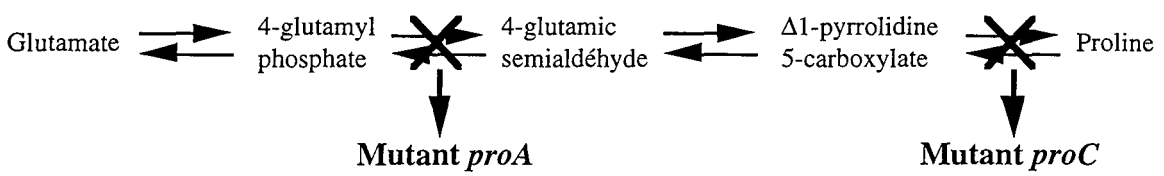
L'absence de glutamate deshydrogénase n'entraîne pas de différence importante sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum* cultivée à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}. Malgré sa déficience en glutamate deshydrogénase, *Corynebacterium glutamicum* conserve sa capacité de lutte contre une élévation de la pression osmotique du milieu de culture.

Les différences observées au niveau du contenu intracellulaire en métabolites concernent principalement l'acide glutamique. En effet le pool interne d'acide glutamique est deux fois inférieur chez la souche recombinée à celui mesuré chez la souche sauvage. Ces résultats montrent donc que la glutamate deshydrogénase n'est pas indispensable à la souche et que d'autres enzymes sont capables de synthétiser l'acide glutamique. Les enzymes pouvant être responsables de cette synthèse sont la glutamine amide 2 oxoglutarate amino transférase (gogat) et les transaminases. Il a déjà été décrit, dans la littérature, un mutant de *C. glutamicum* ATCC 13032, ne possédant pas le gène de la glutamate deshydrogénase, et capable de croître normalement sans apport de glutamate (Börman-El Kholy et *al.*, 1992). Chez ce mutant, une forte activité gogat était observée. Dans notre cas, nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité intracellulaire de gogat, ni d'aspartate transaminase chez la souche mutée. Le faible pool d'acide glutamique chez cette souche indique que ces enzymes réunies n'ont néanmoins pas la même capacité *in vivo* de biosynthèse de l'acide glutamique que la glutamate deshydrogénase.

II. Etude cinétique et physiologique des mutants *proA* et *proC*

II.1. Présentation des mutants *proA* et*proC*

Les souches étudiées sont deux souches de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 mutées dans la voie de biosynthèse de la proline. Les gènes *proA* et *proC* ont été inactivés par insertion de transposon. Le gène *proA* code pour la 4 - glutamyl phosphate réductase, deuxième enzyme dans la voie de biosynthèse de la proline à partir de l'acide glutamique. Le gène *proC* code pour la Δ1-pyrroline-5-carboxylate réductase, dernière enzyme de la voie de biosynthèse de la proline.



II.2. Etude du mutant *proA*

II.2.1. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites.

La souche mutante *proA* a été cultivée sur milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1} en culture discontinue. Sa vitesse spécifique maximale de croissance est alors de 0,35 h^{-1} et le rendement de conversion du glucose en biomasse est de 0,42 g/g. Lorsque cette souche est soumise à un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} par addition de NaCl dans le milieu, le μ_{max} chute à une valeur de 0,14 h^{-1} et le rendement de croissance sur glucose à 0,24 g/g.

A la suite du choc osmotique, le contenu intracellulaire en proline augmente très faiblement de 0 à 10 mg/g matière sèche (Figure n°V.2). On peut remarquer un pic transitoire d'acide glutamique après l'ajout de NaCl dans le milieu. Le contenu en acide glutamique se stabilise par la suite à sa valeur initiale de 80 mg/g matière sèche. La teneur interne en tréhalose augmente rapidement après l'ajout de NaCl de 10 à 120 mg/g matière sèche puis se maintient autour de 70 mg/g matière sèche.

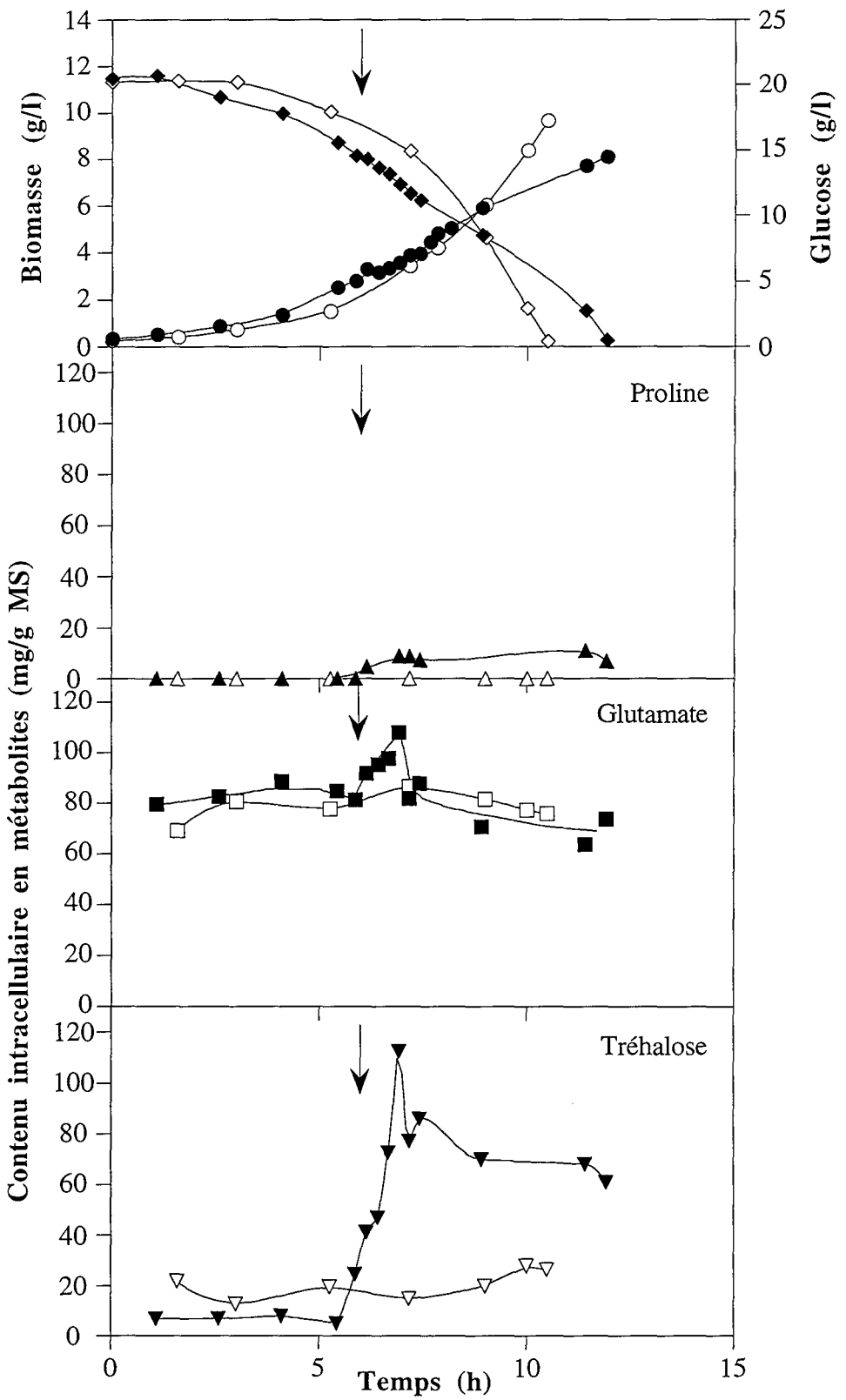


Figure n°V.2 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant *proA* à 0,4 osmol.kg^{-1}(blanc) et à 1,5 osmol.kg^{-1} (noir) après addition de NaCl (flèche) : Biomasse (●○), glucose (◆◇).

II.2.2. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752

Les paramètres de croissance du mutant *proA* et de sa souche mère sont regroupés dans le Tableau n°V.3. La souche mutée possède un μ_{max} inférieur à celui de la souche sauvage à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}. L'écart entre le μ_{max} des deux souches augmente avec l'osmolarité du milieu ; il est de 20% à 0,4 osmol.kg^{-1} et passe à 30% à 1,5 osmol.kg^{-1}.

		ATCC 14752		*proA*	
		0,4 Osm	1,5 Osm	0,4 Osm	1,5 Osm
	μ_{max} (h^{-1})	0,44	0,20	0,35	0,14
	$R_{x/s}$ (g/g)	0,45	0,25	0,42	0,24
Pool intracellulaire (mg/g MS)	Proline	1	55	0	10
	Glutamate	90	90	80	80
	Tréhalose	20	40	10	70
	Glutamine	2	3	2	15
	Alanine	3	3	2	4

Tableau n°V.3 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites de*C. glutamicum* ATCC 14752 et *proA* cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.

La principale différence observée entre les deux souches est le faible contenu intracellulaire en proline chez la souche recombinée cultivée à 1,5 osmol.kg^{-1}. Il est de 5 fois inférieur à celui de la souche sauvage (Tableau n°V.3). D'autre part le pool interne en tréhalose est quant lui supérieur chez la souche mutée tandis que celui d'acide glutamique est identique chez les deux bactéries. Enfin une accumulation de glutamine a été observée chez la souche mutée en réponse au choc osmotique. Le pool intracellulaire en glutamine est multiplié par cinq comparativement à la souche mère.

II.3. Etude du mutant *proC*

II.3.1. Cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites

La souche mutante *proC* est auxotrophe pour la proline, c'est à dire qu'elle est incapable de synthétiser de la proline et ne peut pas pousser en absence de proline dans le milieu de culture. Cette souche a donc été cultivée en milieu BMCG-glucose contenant 2,5 g/l de proline à 0,4 osmol.kg^{-1}. Sa vitesse spécifique de croissance et alors de 0,44 h^{-1} et le rendement de croissance sur glucose est de 0,5 g/g. Après addition de NaCl dans le milieu de manière à élever l'osmolalité du milieu à 1,5 osmol.kg^{-1}, le μ_{max} chute à une valeur de 0,31 h^{-1}.

Après le choc osmotique, le contenu cellulaire en proline augmente fortement de 50 à 150 mg/g matière sèche (Figure n°V.3). Le pool intracellulaire en acide glutamique reste constant à une valeur de l'ordre de 30 mg/g matière sèche tandis que celui de tréhalose augmente de 10 à 35 mg/g matière séche.

II.3.2. Comparaison avec la souche sauvage ATCC 14752

Les paramètres de croissance ainsi que les pools intracellulaires en métabolites du mutant *proC* et de la souche sauvage cultivés en présence de proline sont regroupés Tableau n°V.4.

		ATCC 14752		*proC*	
		0,4 Osm	1,5 Osm	0,4 Osm	1,5 Osm
	μ_{max} (h^{-1})	0,52	0,30	0,44	0,31
	$R_{x/s}$ (g/g)	0,5	0,48	0,5	0,49
Pool intracellulaire (mg/g MS)	Proline	30	160	50	150
	Glutamate	25	30	30	35
	Tréhalose	15	10	10	30

Tableau n°V.4 : Récapitulation des paramètres de croissance et du contenu intracellulaire en métabolites de*C. glutamicum* ATCC 14752 et *proC* cultivées à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1} avec de la proline.

Le comportement de la souche mutante *proC* est proche de celui de la souche sauvage cultivée en présence de proline. Les paramètres de croissance ainsi que le contenu cellulaire en métabolites sont identiques chez les deux souches.

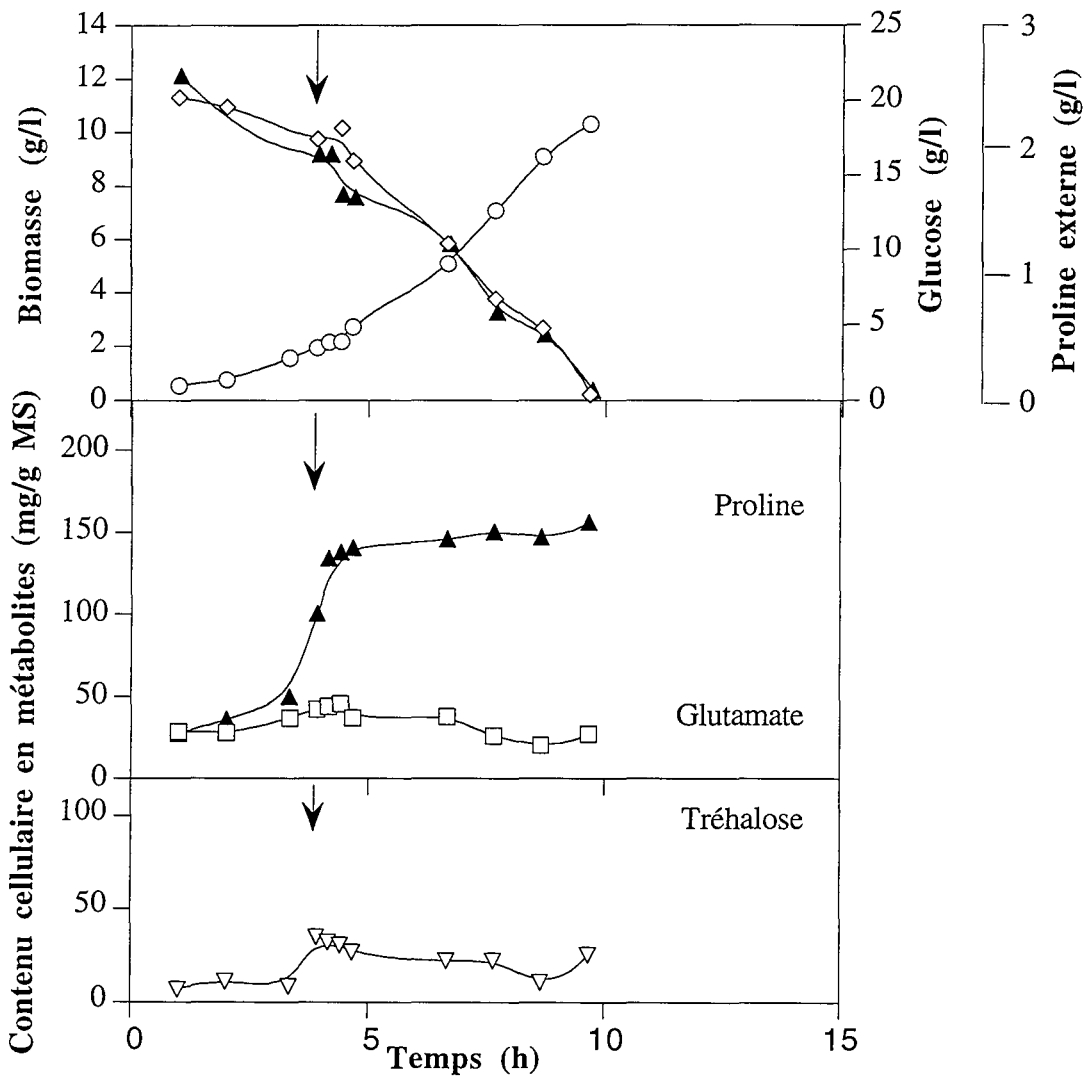


Figure n°V.3 : Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et d'accumulation des métabolites intracellulaires au cours d'une culture du mutant *proC* à 0,4 osmol.kg^{-1}(blanc) et à 1,5 osmol.kg^{-1} (noir) après addition de NaCl (flèche) : Biomasse (○), glucose (◇), proline (▲).

II.4. Discussion - conclusion

La mutation au niveau du gène *proA* n'entraîne pas de phénomène d'auxotrophie chez *C. glutamicum* ATCC 14752. La bactérie est en effet capable de croître sur un milieu dépourvu de proline à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.

Malgré l'inactivation du gène proA, la bactérie accumule de la proline en réponse au choc osmotique. Le contenu intracellulaire de proline est néanmoins très faible (10 mg/g matière sèche). A l'inverse des mutations au niveau du gène *pro C* et *proB*, gènes codant pour les deux autres enzymes de la voie de biosynthèse de la proline (*cf* Figure n°V.4), entraîne un caractère d'auxotrophie chez *C. glutamicum* ATCC 14752 (Ankri et *al.*, 1995). Ces résultats indiquent qu'il doit exister une autre voie de biosynthèse de la proline, capable de pallier un dysfonctionnement de la seconde enzyme de la voie. Des travaux à l'Institut de Génétique et de Microbiologie d'Orsay ont montré que les mutants *proA* retrouvaient leur caractère prototrophe après leur avoir inséré le gène *asd* de *Corynebacterium glutamicum* (Ankri et *al.*, 1995). Le gène *asd* code pour une enzyme de la voie de biosynthèse de la lysine, l'aspartyl phosphate deshydrogénase. Cette enzyme catalyse le même type de réaction que la 4 - glutamyl phosphate réductase (*cf* Figure n°V.4) (Serebrijski et *al.*, 1995). *C. glutamicum* possède donc une voie alternative de biosynthèse de la proline catalysée par l'aspartyl phosphate deshydrogénase.

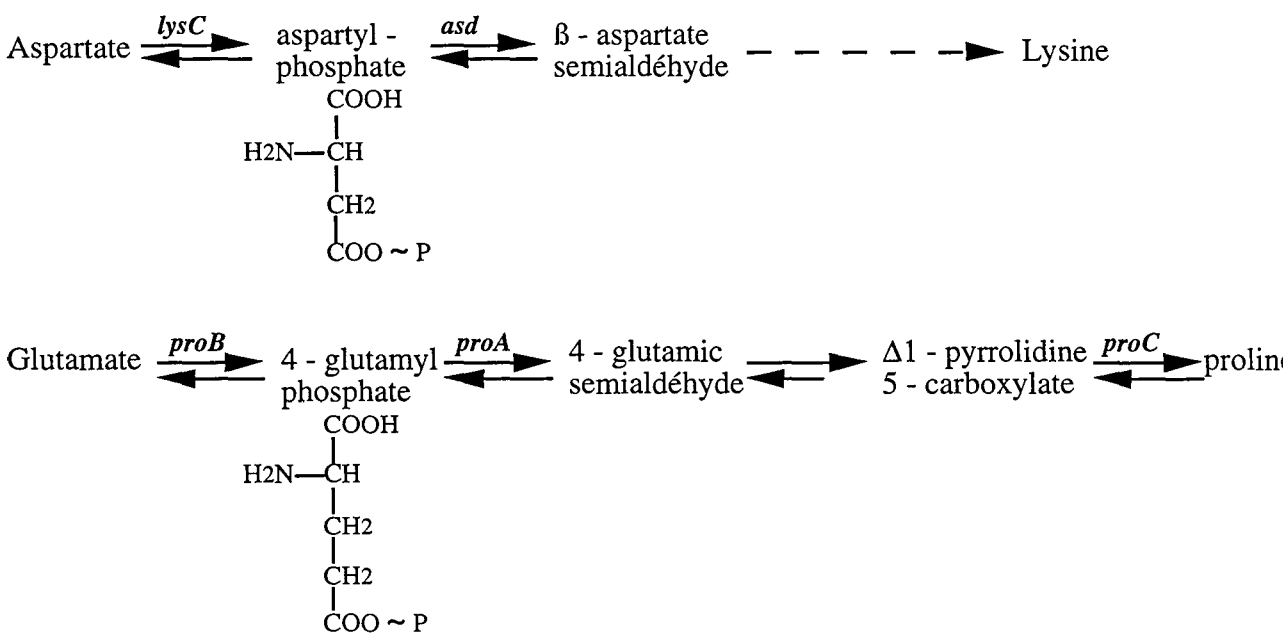


Figure n°V.4 : Voies de biosynthèses de la proline et de la lysine

Une autre répercussion de la mutation au niveau de la voie de biosynthèse de la proline est une biosynthèse accrue de tréhalose et de glutamine en réponse au choc osmotique. Le contenu cellulaire en tréhalose est alors multiplié par deux et celui en glutamine par cinq chez la souche mutée cultivée à 1,5 osmol.kg^{-1}. Le déficit du contenu cellulaire en proline du mutant *proA*, cultivé sous forte osmolarité, peut être en partie compensé par une augmentation de la teneur interne en tréhalose et glutamine.

III. Récapitulation des résultats

❑ Mutant *gdhA*

1 - Nous avons vu que la présence de la glutamate deshydrogénase n'est pas indispensable à *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752 pour maintenir une croissance normale à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.

2 - La souche déficiente en glutamate deshydrogénase possède un contenu cellulaire en glutamate deux fois inférieur à celui de la souche sauvage. Ce faible contenu interne est compensé en partie par une accumulation plus importante de proline et de tréhalose chez la bactérie cultivée à 1,5 osmol.kg^{-1}.

❑ Mutant *proA* et *proC*

1 - L'étude cinétique du mutant *proA* a montré que cette souche est capable de pousser en absence de proline et de synthétiser de la proline. Ces résultats indiquent la présence d'une voie alternative de biosynthèse de proline. Des études complémentaires réalisées à l'Institut de Génétique et De Microbiologie d'Orsay ont montré que l'aspartate deshydrogénase intervient dans cette voie.

2 - En réponse au choc osmotique, le contenu cellulaire en proline chez le mutant *proA* est cinq fois inférieur à celui de la souche sauvage à osmolarité équivalente. La bactérie compense, en partie, ce déficit en proline en accumulant de manière plus importante du tréhalose (x 2) et de la glutamine (x 5).

3 - Le mutant *proC* est auxotrophe pour la proline. La réponse osmotique de cette souche, cultivée en présence de proline, est alors équivalente à celle de la souche sauvage.

CHAPITRE VI

Détermination de la pression de turgescence et étude de la réponse osmotique à partir de bilans osmotiques

Chapitre VI : Détermination de la pression turgescence et étude de la réponse osmotique à partir de bilans osmotiques

I. Détermination de la pression de turgescence chez C. glutamicum 178

I.1. Rappels sur la méthode de détermination de la pression de turgescence 178

I.2. Pression de turgescence chez C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 180

I.3. Influence de la pression osmotique du milieu sur la pression de turgescence .. 180

I.4. Influence du taux de croissance sur la pression de turgescence 182

I.4.1. Etude en culture discontinue 182

I.4.2. Etude en culture continue 184

I.5. Discussion 185

II. Bilans osmotiques 186

II.1. Méthodologie 186

II.1.1. Calcul de la contribution osmotique des métabolites 186

II.1.2. Détermination des concentrations intracellulaires en métabolites 186

II.1.2.1. Contenu en eau libre de C. glutamicum 186

II.1.2.2. Détermination de la composition du milieu cytoplasmique 188

II.1.3. Détermination du coefficient osmotique intracellulaire 190

II.1.4. Méthodologie des bilans osmotiques 191

II.2. Applications des bilans osmotiques sur quelques cultures 192

II.2.1. Cultures discontinues en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg-1 192

II.2.2. Cultures discontinues de C. glutamicum ATCC 17965 soumises à un ajout de NaCl 193

II.2.3. Cultures discontinues soumises à un ajout de sorbitol ou glycérol 195

II.2.4. Bilans osmotiques sur les cultures de C. glutamicum ATCC 14752 et ses mutants 196

II.2.4.1. Cultures à 0,4 osmol.kg-1 196

II.2.4.2. Cultures à 1,5 osmol.kg-1 197

II.3. Discussion - conclusion 199

III. Récapitulation des résultats 200

Détermination de la pression de turgescence et étude de la réponse osmotique à partir de bilans osmotiques

Les études précédentes ont mis en évidence le rôle important de la proline dans les phénomènes d'osmorégulation. Nous avons notamment montré que la résistance à la pression osmotique était liée à la capacité d'accumuler de la proline. En culture continue, nous avons pu mettre en évidence une relation entre vitesse de croissance bactérienne et pool intracellulaire en proline. De manière à aller plus loin dans la compréhension des mécanismes régissant la croissance bactérienne et la réponse osmotique, il s'avère nécessaire de quantifier la pression osmotique intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum*. Dans un premier temps, nous avons donc réalisé des mesures de la pression osmotique intracellulaire et de la pression de turgescence des différentes souches à notre disposition sous différentes conditions de pression osmotique et de croissance.

A partir de la détermination expérimentale du contenu cellulaire en métabolites, réalisée dans les chapitres précédents, nous avons calculé la pression osmotique intracellulaire dans le but de la comparer avec celle mesurée expérimentalement. L'application de ces bilans osmotiques sur quelques cultures devrait nous permettre de vérifier si les métabolites dosés sont bien les principaux intervenants dans l'élévation de l'osmolarité interne.

I. Détermination de la pression de turgescence chez *C. glutamicum*

La pression de turgescence est la différence de pression osmotique entre le milieu intracellulaire et le milieu externe. Cette pression de turgescence est généralement admise comme étant la force motrice de la croissance (Reed, 1984a) sans que cela n'ait été réellement démontré. En effet très peu de valeurs de pression de turgescence sont disponibles dans la littérature et, à notre connaissance, aucune étude de l'influence de la pression de turgescence sur la croissance n'a été réalisée. Nous avons donc mesuré la pression osmotique intracellulaire sur les différentes souches de *C. glutamicum* à notre disposition cultivées sous différentes conditions de pression osmotique.

I.1. Rappels sur la méthode de détermination de la pression de turgescence

La technique utilisée pour déterminer la pression osmotique intracellulaire est la méthode des chocs osmotiques croissants décrite en détail dans le chapitre II. La détermination de la pression osmotique intracellulaire (Π_{intra}) est basée sur l'établissement de bilan de conservation de matière sur des bactéries en croissance et sur d'autres possédant une pression de turgescence nulle. Pour cela, les cellules sont placées dans des solutions d'osmolarité croissante. La mesure du volume des bactéries fournit une estimation de la Π_{intra}.

Cette méthode nécessite une mesure du volume cellulaire. Nous avons comparé deux techniques : une méthode spectrophotométrique décrite précédemment (*cf* Publication n°1) et la technique de mesure par Coulter counter. Ces deux techniques ont été testées pendant la phase exponentielle de croissance d'une culture de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en milieu BMCG-glucose classique à une osmolalité de 0,4 osmol.kg^{-1}. Les profils d'évolution du volume cellulaire en fonction de l'inverse de l'osmolalité sont présentés Figure n°VI.1.

Les valeurs de pression osmotique intracellulaire, de pression de turgescence et de volume non-osmotique obtenues à partir de la Figure n°VI.1 sont regroupées dans le Tableau n°VI.1. La pression de turgescence a été calculée par différence entre la pression osmotique intracellulaire et la pression osmotique du milieu de culture (0,4 osmol.kg^{-1}). Le volume non-osmotique de la bactérie correspond au volume occupé par les composés solides ou insolubles de la cellule. Il est donné par la valeur du volume à l'intersection de la courbe à l'origine.

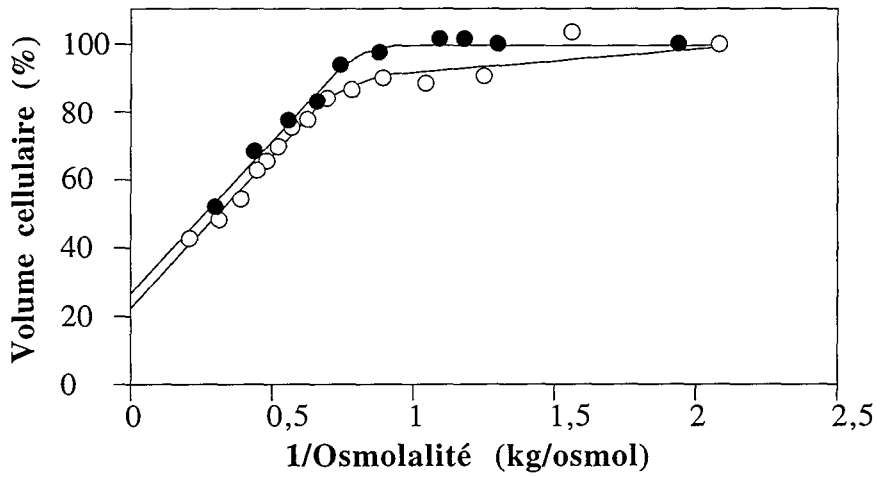


Figure n°VI.1 : Evolution du volume cellulaire de *C. glutamicum* ATCC 17965, cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1} et soumise à des chocs osmotiques croissants, en fonction de l'inverse de l'osmolarité externe. *Le volume cellulaire a été déterminé par une méthode spectrophotométrique* (○) *et par Coulter counter* (●).

	Technique utilisée	
	Spectrophotométrie	Coulter counter
Π_{intra} (osmol.kg^{-1})	1,16 ± 0,06	1,22 ± 0,07
$\Delta\Pi$ (osmol.kg^{-1})	0,76 ± 0,06	0,82 ± 0,07
Volume non-osmotique (%)	22 ± 5	27 ± 9

Tableau n°VI.1 : Valeurs de pression osmotique intracellulaire (Π_{intra}), pression de turgescence ($\Delta\Pi$) et du volume non-osmotique chez *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1}.

Les valeurs de $\Delta\Pi$ et de volume non-osmotique déterminées par les deux techniques sont proches les unes des autres. Ces résultats valident la faisabilité de la méthode spectrométrique pour la détermination de la pression osmotique intracellulaire. Pour la suite de l'étude, nous avons retenu cette technique du fait de sa simplicité de mise en oeuvre et de sa rapidité.

I.2. Pression de turgescence chez *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752

La pression de turgescence a été déterminée chez les deux souches de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752, cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}, pendant la phase exponentielle de croissance. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau n°VI.2.

	ATCC 17965	ATCC 14752
$\Delta\Pi$ (osmol.kg^{-1})	0,67 ± 0,1	0,49 ± 0,08
VNO (%)	30 ± 6	33 ± 5

Tableau n°VI.2 : Valeurs de pression de turgescence ($\Delta\Pi$) et du volume non-osmotique (VNO) pendant la phase exponentielle de croissance de C. glutamicum ATCC 17965 et 14752 cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}. *Intervalles de confiance à 95% calculés à partir de 5 déterminations indépendantes.*

Les résultats montrent que *C. glutamicum* ATCC 17965 possède, pendant la phase exponentielle de croissance à 0,4 osmol.kg^{-1}, une pression de turgescence supérieure à celle de l'ATCC 14752. L'erreur relative sur ces valeurs de $\Delta\Pi$ est de l'ordre de 15%.

Les deux souches testées ont le même volume non-osmotique. Cela semble logique puisqu'elles possèdent une teneur en eau identique de l'ordre de 65%. Le volume non osmotique, déterminé à partir de la Figure n°VI.1, de l'ordre 30% est donc cohérent avec la valeur de 35% obtenu à partir de la détermination du contenu cellulaire en eau libre.

I.3. Influence de la pression osmotique du milieu sur la pression de turgescence

Dans le but d'étudier l'influence de l'osmolarité du milieu de culture sur la pression de turgescence des bactéries, nous avons, dans un premier temps, mesurer le $\Delta\Pi$ chez *C. glutamicum* ATCC 17965 en phase exponentielle de croissance en milieu BMCG à différentes osmolalités. Plusieurs mesures ont été réalisées au début de la phase exponentielle de croissance, une heure après l'addition de NaCl toutes les 15 minutes durant une à deux heures. Les valeurs moyennes de pression osmotique intracellulaire et de $\Delta\Pi$ obtenues sont représentées en fonction de la pression osmotique du milieu de culture Figure n°VI.2.

La pression osmotique intracellulaire de *C. glutamicum* en phase exponentielle de croissance augmente avec l'osmolarité du milieu de culture. Elle passe de 1,07 à 2,93 osmol.kg^{-1} lorsque l'osmolalité du milieu de culture augmente de 0,4 à 2,7 osmol.kg^{-1}. Malgré l'augmentation

du Π_{intra}, la pression de turgescence diminue avec l'élévation de la pression osmotique du milieu de culture. Le $\Delta\Pi$ est de 0,23 osmol.kg^{-1} chez les bactéries cultivées à 2,7 osmol.kg^{-1}.

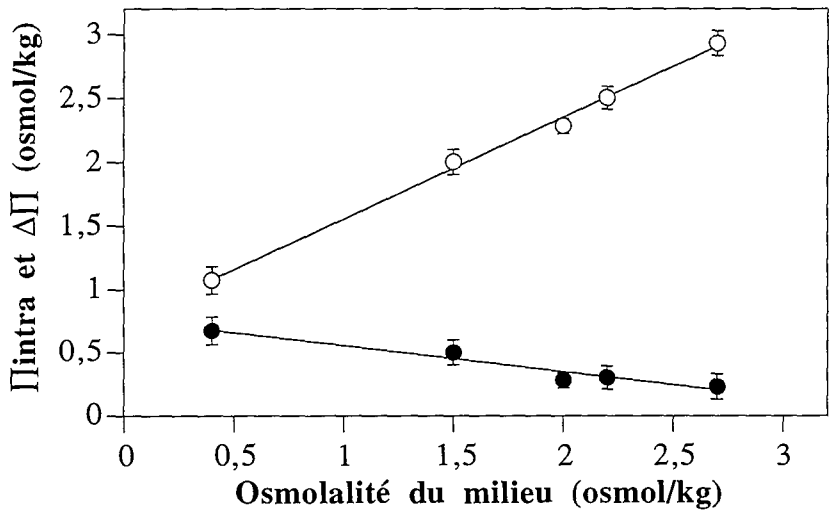


Figure n°VI.2 : Evolution de la pression osmotique intracellulaire (○) et de la pression de turgescence (●) de *C. glutamicum* ATCC 17965, en phase de croissance, en fonction de l'osmolarité du milieu de culture.

La même étude a été réalisée sur les différentes souches à notre disposition (ATCC 14752, mutants *gdhA*, *proA* et *proC*) cultivées en milieu BMCG à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}. Les résultats sont reportés dans le tableau n°VI.3.

	Osmolalité du milieu	
	0,4 osmol.kg^{-1}	1,5 osmol.kg^{-1}
ATCC 17965	0,67 ± 0,1 *(5)*	0,5 ± 0,1 *(3)*
ATCC 14752	0,49 ± 0,08 *(5)*	0,24 ± 0,05 *(4)*
ATCC 14752 + Proline	0,54 ±0,1 *(3)*	0,26 ± 0,13 *(3)*
Mutant *gdhA*	0,47 ± 0,09 *(5)*	0,29 ± 0,06 *(3)*
Mutant *proC*	-	0,27 ± 0,1 *(2)*
Mutant *proA*	0,44 ± 0,05 *(3)*	0,16 ± 0,1 *(3)*

Tableau n°VI.3 : Valeurs de pression de turgescence pendant la phase exponentielle de croissance de différentes souches de *C. glutamicum* cultivées en milieu BMCG à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}.
Entre parenthèses, le nombre de déterminations indépendantes pris pour le calcul des intervalles de confiance à 95%.

Les résultats montrent que l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture entraîne une diminution de la pression de turgescence quelque soit la souche utilisée.

I.4. Influence du taux de croissance sur la pression de turgescence

I.4.1. Etude en culture discontinue

La pression de turgescence a été mesurée au cours d'une culture de *Corynebacterium glutamicum* soumise à un choc osmotique de 0,4 à 1,5 osmol.kg^{-1} par addition de sorbitol dans le milieu (Figure n° VI.3). La valeur de $\Delta\Pi$ est de 0,75 osmol.kg^{-1} chez les bactéries prélevées avant le choc osmotique. Ensuite la pression de turgescence diminue au cours de la culture pour atteindre une valeur de 0,1 osmol.kg^{-1} en fin de culture. Le profil d'évolution du $\Delta\Pi$ semble suivre celui de la vitesse spécifique de croissance.

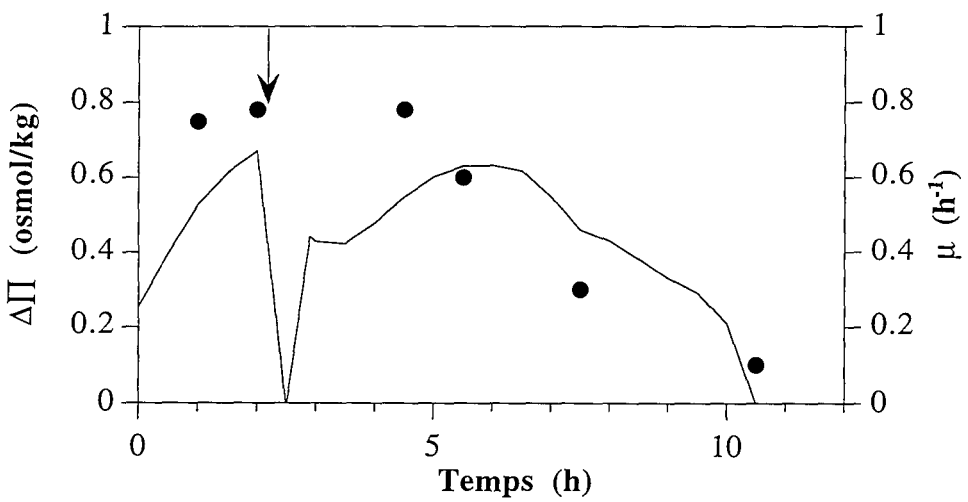


Figure n°VI.3 : Evolution de la vitesse spécifique de croissance (----) et de la pression de turgescence (●) au cours d'une culture de *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1} puis soumise à un choc osmotique (1,5 osmol.kg^{-1}) par addition de sorbitol (flèche).

Si on reporte maintenant les valeurs de $\Delta\Pi$ obtenues, pendant la phase exponentielle de croissance de *C. glutamicum* ATCC 17965 à différentes osmolarités (*cf* § I.3), en fonction du taux de croissance moyen (déterminé par la méthode semi-logarithmique), il apparaît plus clairement que le $\Delta\Pi$ augmente avec la vitesse spécifique de croissance (Figure n°VI.4).

Les valeurs de $\Delta\Pi$ obtenues en culture discontinue avec les différentes souches issues de *C. glutamicum* ATCC 14752 évoluent, de la même manière, en fonction du taux de croissance moyen des bactéries (Figure n°VI.5).

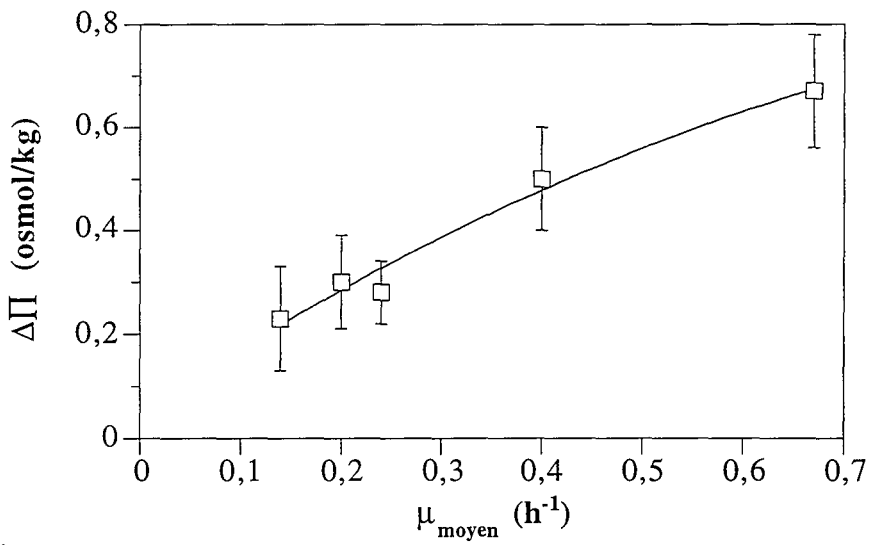


Figure n°VI.4 : Evolution de la pression de turgescence de *C. glutamicum* ATCC 17965 pendant la phase exponentielle de croissance en fonction de la vitesse spécifique moyenne de croissance.

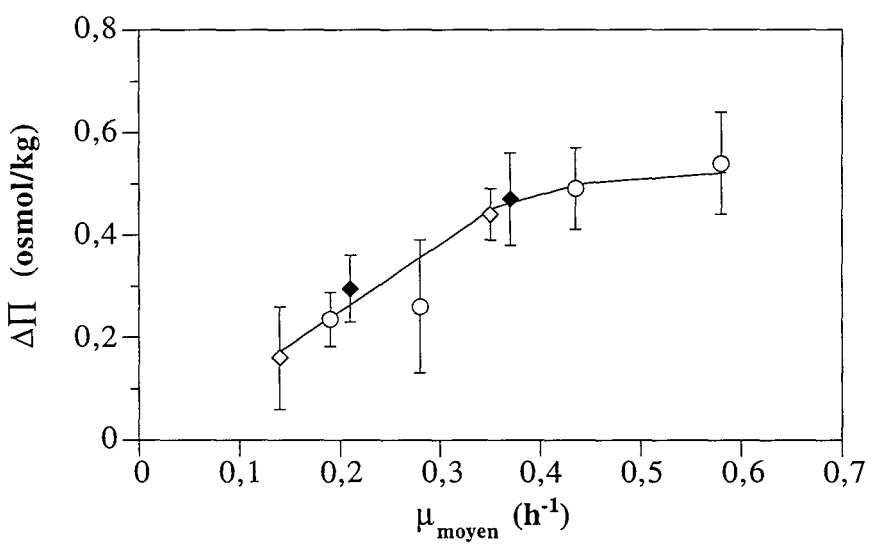


Figure n°VI.5 : Evolution de la pression de turgescence de *C. glutamicum* ATCC 14752 (○), du mutant *gdhA* (◆) et du mutant *proA* (◇) pendant la phase exponentielle de croissance en fonction de la vitesse spécifique moyenne de croissance.

I.4.2. Etude en culture continue

De manière à confirmer plus nettement les résultats précédents, une étude a été réalisée en culture continue, car ce mode de culture permet de fixer la vitesse spécifique de croissance par l'intermédiaire du taux de dilution et donc de s'affranchir de l'aspect dynamique. En effet à l'état stationnaire, le taux de croissance est égal au taux de dilution. Nous avons donc réalisé une culture de *C. glutamicum* ATCC 17965 en mode continu sous limitation glucose en faisant varier le taux de dilution et l'osmolarité du milieu (0,4 et 1,4 osmol.kg^{-1}). Les mesures de Π_{intra} ont été réalisées aux différents états stationnaires de la culture. Les valeurs de $\Delta\Pi$ ont été calculées et reportées Figure n°VI.6.

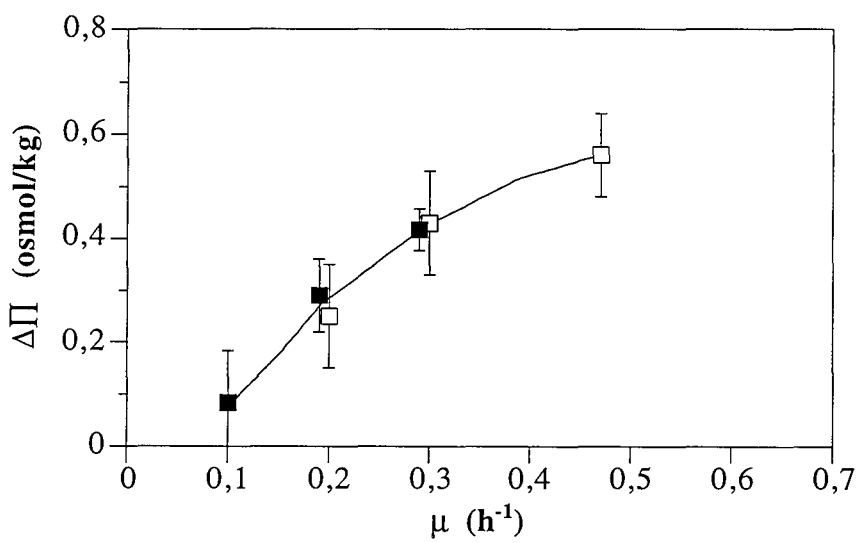


Figure n°VI.6 : Evolution de la pression de turgescence en fonction du taux de croissance d'une culture continue de *C. glutamicum* ATCC 17965 sous limitation glucose à (□) 0,4 et (■) 1,4 osmol.kg^{-1}. *Les valeurs de $\Delta\Pi$ ont été déterminées à l'état stationnaire.*

Les résultats montrent clairement qu'il existe une relation entre la pression de turgescence et la vitesse spécifique de croissance. Le $\Delta\Pi$ augmente avec le taux de croissance. Il est notamment intéressant de noter qu'à taux de croissance équivalent (à 0,2 et 0,3 h^{-1}), les valeurs de $\Delta\Pi$ obtenues à 0,4 et 1,4 osmol.kg^{-1} sont identiques.

I.5. Discussion

A partir d'une méthode simple de détermination du volume osmotique, nous avons pu mesurer la pression de turgescence de plusieurs souches de *C. glutamicum*. En culture en milieu BMCG-glucose à une osmolalité de 0,4 osmol.kg^{-1}, la pression de turgescence en phase exponentielle de croissance des deux souches sauvages ATCC 17965 et 14752 est respectivement de 0,67 et 0,49 osmol.kg^{-1}. Aucune valeur de $\Delta\Pi$ n'est disponible dans la littérature concernant les corynebactéries. Nos valeurs peuvent néanmoins être comparées à celles obtenues chez *Escherichia coli* , bactérie à Gram négatif et chez *Bacillus subtilis*, bactérie à Gram positif. *B. subtilis*, en croissance en milieu synthétique à une osmolalité de 0,3 osmol.kg^{-1}, possède une pression de turgescence de 0,67 ± 0,14 osmol.kg^{-1} (Whatmore et Reed, 1990) ; *E. coli*, à osmolalité équivalente, a une pression de turgescence de 0,02 osmol.kg^{-1} (Cayley et *al.*, 1991). Chez *Bacillus subtilis*, le VNO varie entre 25 et 35% (Whatmore et Reed, 1990), tandis que chez *Escherichia coli* il est de l'ordre de 20% (Cayley et *al.*, 1991). Nos mesures de volume non-osmotique indiquent une valeur de l'ordre de 30% chez *C. glutamicum*.

La contribution importante de notre étude est la mise en évidence d'une relation entre pression de turgescence et la vitesse de croissance de la bactérie. C'est, à notre connaissance, la première fois que cette relation est clairement démontrée chez les bactéries. Néanmoins cette notion de force motrice pour la croissance n'est pas nouvelle. Notamment en physiologie végétale, où ,à partir de l'analyse de la croissance de cellules de plantes, Lockhart (1965) a établi une relation entre vitesse de croissance volumétrique (qui traduit la croissance par élongation cellulaire) et pression de turgescence :

$$\frac{1}{V}\frac{dV}{dt} = g \cdot (\Delta\Pi - \Delta\Pi_c)$$

V : volume cellulaire
g : coefficient d'étirement
$\Delta\Pi$: pression de turgescence
$\Delta\Pi_c$: pression de turgescence critique (minimum recquis pour la croissance)

Cette équation montre la dépendance de la vitesse de croissance à la turgescence et indique que les mécanismes qui régulent le bilan osmotique de la cellule sont fondamentaux pour la croissance cellulaire. Nous allons donc, dans la suite de l'étude, nous intéresser à l'établissement de bilans osmotiques des bactéries en croissance.

II. Bilans osmotiques

Le principe de ces bilans osmotiques est, à partir des mesures expérimentales des concentrations en métabolites intracellulaires, de calculer la pression osmotique intracellulaire et de la comparer avec celle déterminée expérimentalement. L'objectif principal est donc de savoir si à partir des métabolites dosés on peut retrouver la pression osmotique intracellulaire mesurée. Ces bilans pourront alors servir d'outil de vérification afin de contrôler que les métabolites dosés représentent les principaux solutés participant au rétablissement de la pression de turgescence et donc que nous n'avons pas oublié de métabolites importants.

II.1. Méthodologie

II.1.1. Calcul de la contribution osmotique des métabolites

La méthodologie du calcul des bilans osmotiques se base sur les concentrations intracellulaires mesurées. En effet à partir de la concentration intracellulaire en chaque métabolite, il est facile de calculer sa contribution en terme de pression osmotique, d'après la relation :

$$\text{osmolalité} = \Phi \,.\, \nu \,.\, \text{concentration}$$

osmolalité : $osmol.kg^{-1}$
Φ : coefficient osmotique
ν : nombre d'ions par molécule
concentration molale : $mole.kg^{-1}$

Il est donc nécessaire de connaître les concentrations en métabolites intracellulaires et le coefficient osmotique.

II.1.2. Détermination des concentrations intracellulaires en métabolites

II.1.2.1. Contenu en eau libre de *C. glutamicum*

La détermination de la quantité d'eau libre intracellulaire a été réalisée, par la méthode utilisant le thiosulfate comme marqueur de l'espace interstitiel (*cf* Matériels et Méthodes), sur 10 cultures de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en milieu BMCG (*cf* Tableau n°VI.4).

	Valeurs expérimentales
Volume d'eau interstitielle/Biomasse sèche	2,4 ± 0,2 ml/gMS
Masse d'eau intracellulaire/Biomasse humide	0,65 ± 0,01 g/gMH
Masse d'eau intracellulaire/Biomasse sèche	1,86 ± 0,12 g/gMS

Tableau n°VI.4 : Contenu en eau de Corynebacterium glutamicum ATCC 17965. *Les valeurs sont présentées avec leur intervalle de confiance à 95%. Le nombre de déterminations indépendantes est de 10.*

Des valeurs identiques ont été trouvées avec la souche ATCC 14752 en phase exponentielle de croissance (1,94 g eau/g MS).

Notre valeur est à comparer à celles trouvées dans la littérature, obtenues avec des souches de *C. glutamicum* avec la (^{14}C)-taurine comme marqueur de l'espace interstitiel par :

- ❑ Clément *et al.* (1984) : 1,76 ±0,2 µl/mg MS
- ❑ Hoischen et Krämer (1989) : 1,8 µl/mg MS.
- ❑ Bröer et Krämer (1990) : 1,7 µl/mg MS

Bourrust (1993) a obtenu des valeurs de 1,79 ml/g MS (par filtration) et 1,84 ± 0,08 ml/g MS (par centrifugation) en utilisant la méthode de marquage au thiosulfate avec notre souche ATCC 17965 et le même milieu de culture BMCG-glucose.

L'effet de la pression osmotique du milieu de culture sur la teneur en eau des cellules en phase exponentielle de croissance a également été testé (*cf* Tableau n°VI.5). Ainsi une élévation de la pression osmotique du milieu de culture par ajout de NaCl ou sorbitol n'entraîne pas de variation très significative de la teneur en eau de *C. glutamicum* en croissance.

Osmolalité du milieu (osmolyte dépresseur)	Teneur en eau libre (g/gMS)	
❑ ATCC 17965		
0,4 osmol.kg^{-1}	1,86 ± 0,12	*(10)*
1 osmol.kg^{-1} (NaCl)	1,72 ± 0,25	*(2)*
1,5 osmol.kg^{-1} (NaCl)	1,7 ± 0,15	*(3)*
1,5 osmol.kg^{-1} (sorbitol)	1,86 ± 0,17	*(4)*
❑ ATCC 14752		
0,4 osmol.kg^{-1}	1,94 ± 0,15	*(3)*
1,5 osmol.kg^{-1} (NaCl)	1,66 ± 0,2	*(3)*

Tableau n°VI.5 : Teneur en eau de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en phase exponentielle de croissance sur milieu BMCG-glucose à différentes pressions osmotiques générées par des osmolytes divers. *Les valeurs sont présentées avec leur intervalle de confiance à 95%. Le nombre de déterminations indépendantes réalisées est indiqué entre parenthèses.*

II.1.2.2. Détermination de la composition du milieu cytoplasmique

Chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}, une concentration molale totale en métabolites intracellulaires a été estimée (Tableau n° VI.6). Les concentrations molales en métabolites ont été calculées à partir des contenus cellulaires mesurés et de la quantité d'eau libre cellulaire déterminée précédemment.

La concentration molale totale a été déterminée en tenant compte de l'électroneutralité du cytoplasme. Nous avons supposé, d'une part, que l'acide glutamique est présent dans le cytoplasme sous forme de glutamate de potassium et, d'autre part, que l'excès de potassium et de sodium est complexé avec des anions ou des acides organiques. Le calcul a donc été effectué suivant la relation VI.3 :

$$(\Sigma C_j)_{cyto} = Glu^- + K^+ + Na^+ + [(K^+ + Na^+) - Glu^-] + Aa + Tré + [Sucres\text{-}P \times 2] + [F1,6dP \times 3] \quad (VI.3)$$

Nous n'avons pris en compte pour ce calcul de la concentration molale totale que les principaux métabolites affectant, à notre connaissance, sensiblement la pression osmotique intracellulaire. Nous n'avons notamment pas fait intervenir les macromolécules telles que les protéines cytoplasmiques et les acides nucléiques (ADN, ARN). Du fait de leur haute masse molaire, leur contribution à la pression osmotique est négligeable. Par exemple, la concentration en protéines solubles de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivée en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1} a été dosée à 130 g/l soit une concentration molale de 1,9 mmole/kg (équivalent sérum-albumine bovine) (Delaunay, 1995). De plus, aucune variation de la concentration en protéines solubles n'a été observée après un choc osmotique. Cayley et *al.* (1991) ont également montré chez *Escherichia coli* que la quantité en protéines et acides nucléiques est indépendante de l'osmolarité externe.

La concentration en acides aminés autres que le glutamate a été déterminée expérimentalement pour la proline (25mM), la glutamine (10mM) et l'alanine (10mM). Les autres acides aminés sont présents à une concentration qui ne permet pas leur détection par HPLC (< 5 mM). Cependant il est probable que ces acides aminés ne soient pas tous présent à une concentration de 5 mM. Leur concentration globale a été donc fixée arbitrairement à 55 mM ce qui équivaut à une concentration individuelle moyenne de l'ordre de 3,5 mM.

La concentration en sucres phosphorylés et fructose-1,6-diphosphate a été déterminée au cours des travaux de Bourrust (1993) (*cf* Tableau VI.7). Nous avons considéré un contenu identique en ces métabolites chez les deux souches ATCC.

Les acides organiques susceptibles d'être accumulés (pyruvate, lactate...) n'apparaissent pas dans le tableau VI.6. Ils ont été néanmoins indirectement pris en compte en tant que composés anioniques. Par exemple, chez la souche ATCC 17965, la concentration en molécules anioniques calculée est de 0,23 mole.kg^{-1}. D'après les travaux de Péquignot (1995), le contenu cellulaire en acides organiques est de l'ordre de 55 mM chez *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée en milieu BMCG-glucose (*cf* Tableau VI.7). La part des composés anioniques, dans notre modèle, prend donc largement en compte les acides organiques intracellulaires et les anions tels que les phosphates et les bicarbonates dont la concentration est respectivement de l'ordre de 8 mM chez *E. coli* (Lehninger, 1985) et 15 mM chez les cellules animales (Lehninger, 1985). On peut penser que la concentration en bicarbonates, chez les bactéries, n'est pas supérieure à cette valeur puisque, contrairement aux cellules animales, le système de régulation du pH intracellulaire par les bicarbonates n'est pas prédominant. La régulation du pHi est principalement réalisée par les pompes à protons et les antiports K^+/H^+ et Na^+/H^+.

Concentration molale intracellulaire (mole/kg)	*Corynebacterium glutamicum*	
	ATCC 17965	ATCC 14752
Acide glutamique	0,21	0,3
Potassium	0,34	0,32
Sodium	0,1	0,09
Composés anioniques	0,23*	0,12*
Autres acides aminés	0,1*	0,1*
Tréhalose	0,09	0,03
Fructose 1,6 dP	0,015	0,014*
Sucres phosphorylés	0,02	0,02*
Total ($(\sum C_i)_{cyto}$)	1,105	0,989

Tableau n°VI.6 : Valeurs moyennes des concentrations molales intracellulaires en métabolites chez *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}. *(*) valeurs estimées*

	Concentration (mM)	Références
❑ Acides organiques :		
Lactate	30	Péquignot (1995)
Acétate	20	"
Pyruvate	0,8	"
Cis-aconitate	0,3	"
Isocitrate	0,8	"
α-céto glutarate	3,1	"
oxaloacétate	1,2	"
glyoxylate	-	"
❑ Sucres phosphorylés :		
Glucose-6-P	2,4	Bourrust (1993)
Glucose-1-P	2,5	"
Fructose-6-P	4,7	"
Fructose 1,6 dP	16	"
❑ Autres métabolites :		
Glycérol	18	Péquignot (1995)

Tableau VI.7 : Concentrations intracellulaires moyennes en métabolites chez *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée en milieu BMCG-glucose à 0,4 osmol.kg^{-1}.

II.1.3. Détermination du coefficient osmotique intracellulaire

Le coefficient osmotique, encore appelé coefficient de déviation par rapport à l'idéalité (*cf* Annexe I), est égal à 1 pour des solutions idéales.

Le coefficient osmotique intracellulaire de nos bactéries a été estimé de manière à ce que la pression osmotique intracellulaire calculée à partir des différentes concentrations en métabolites du Tableau n°VI.6 soit égale à celle mesurée expérimentalement. Les valeurs ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau n°VI.8.

Souches	$(\Sigma C_j)_{cyto}$ (mole.kg^{-1})	Π_{intra} mesurée (osmol.kg^{-1})	Φ_i calculé
ATCC 17965	1,105	1,07 ± 0,1	0,92 ± 0,08
ATCC 14752	0,989	0,9 ± 0,1	0,87 ± 0,1

Tableau VI.8 : Valeurs du coefficient osmotique intracellulaire (Φ_i) calculées chez *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752 en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}.

La différence observée sur le coefficient osmotique entre les deux souches ne semble pas significative. De ce fait, une valeur moyenne de 0,9 sera prise pour les deux souches au cours des calculs des bilans osmotiques.

II.1.4. Méthodologie des bilans osmotiques

Le principe du bilan osmotique est de calculer la pression osmotique intracellulaire de la bactérie à partir des concentrations intracellulaires mesurées et par la suite de comparer cette valeur calculée à la valeur expérimentale. La pression osmotique intracellulaire (Π_{intra}) de bactéries cultivées à une osmolalité externe donnée (Π_{ext}) est calculée suivant la relation VI.4 :

$$\Pi_{intra}^{calcul} = \Phi_i \times (\Sigma C_j) \qquad \text{(VI.4)}$$

Π_{intra}^{calcul} : pression osmotique intracellulaire calculée (osmol.kg^{-1})

Φ_i : coefficient osmotique intracellulaire

(ΣC_j) : concentration molale totale en métabolites intracellulaires (mole.kg^{-1})

Si on veut mettre en évidence les métabolites qui participent au rétablissement de la pression osmotique intracellulaire à la suite d'un choc osmotique, la relation VI.4 peut être décomposée de la manière suivante :

$$\Pi_{intra}^{calcul} = \Phi_i \times \frac{(\Sigma n_j)_{0,4}}{V\Pi ext} + \Phi_i \times \frac{(\Sigma \Delta C_j)_{0,4}^{\Pi ext}}{V\Pi ext} \qquad \text{(VI.5)}$$

$(\Sigma n_j)_{0,4}$: quantité totale en métabolites des bactéries cultivées à 0,4 osmol.kg^{-1} (mmole.gMS)

$(\Sigma \Delta n_j)_{0,4}^{\Pi ext}$: différence de quantité en métabolites entre 0,4 et Πext osmol.kg^{-1} (mmole.gMS)

$V\Pi ext$: quantié d'eau libre de la cellule cultivée à Πext osmol.kg^{-1} (g/gMS)

$$\boxed{\Pi_{intra}^{calcul} = \Phi_i \times \frac{(\Sigma n_j)_{0,4}}{V\Pi ext} + \Phi_i \left[\frac{\Sigma(n_j^{\Pi ext} - n_j^{0,4})}{V\Pi ext}\right]} \qquad \text{(VI.6)}$$

Ce calcul de la pression osmotique intracellulaire est donc basée sur deux d'hypothèses principales:

- ❑ le coefficient osmotique intracellulaire est constant quelque soit la pression osmotique externe
- ❑ il y a additivité des pressions osmotiques de chaque métabolite

L'additivité des pressions osmotiques a été vérifiée *in vitro* sur différents mélanges d'acides aminés, tréhalose et chlorure d'ammonium.

II.2. Applications des bilans osmotiques sur quelques cultures

II.2.1. Cultures discontinues en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}

A partir de la composition du milieu cytoplasmique, nous avons calculé la pression osmotique de chaque famille de métabolites (Figure n° VI.7). Le sel d'acide glutamique (glutamate de potassium) est le principal métabolite contribuant à la pression osmotique intracellulaire chez les bactéries cultivées à une osmolalité de 0,4 osmol.kg^{-1}. Sa contribution représente respectivement 35% et 58% de la pression osmotique intracellulaire chez les souches ATCC 17965 et 14752. Les autres principaux intervenants sont les cations (potassium et sodium) et les composés anioniques (anions et acides organiques). La part moins importante des cations et anions chez la souche ATCC 14752 s'explique par la concentration intracellulaire plus élevée en acide glutamique. De ce fait, à teneur en cations équivalente chez les deux souches, la concentration en cations non complexés au glutamate est inférieure chez la souche ATCC 14752 et donc notre mode de calcul donne une concentration en composés anioniques d'autant inférieure.

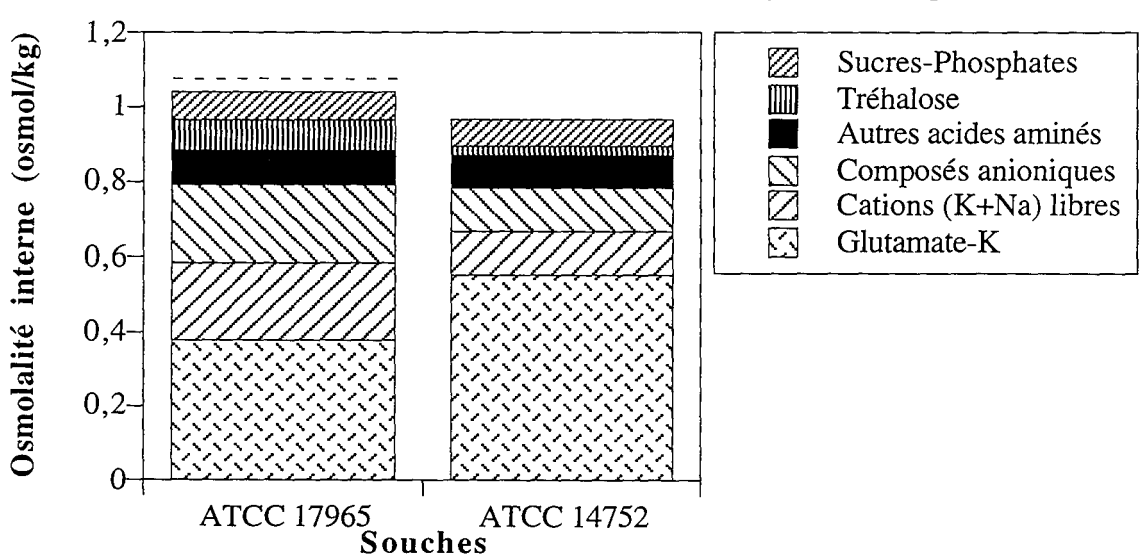


Figure n°VI.7 : Bilan osmotique de *C. glutamicum* ATCC 17965 et 14752 cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1}.
(- - - -) *Valeur de* Π_{intra} *mesurée*

II.2.2. Cultures discontinues de *C. glutamicum* ATCC 17965 soumises à un ajout de NaCl

Les bilans osmotiques de *C. glutamicum* ATCC 17965 pendant la phase exponentielle de croissance en milieu BMCG à 1,5 , 2 et 2,7 osmol.kg^{-1} sont présentés Figure n°VI.8. De manière à mettre en valeur les métabolites contribuant au rétablissement de la pression de turgescence à la suite du choc osmotique, la contribution osmotique des métabolites présents chez les bactéries à 0,4 osmol.kg^{-1} a été regroupée sous le terme "pool 0,4 osm". Le bilan osmotique a alors été réalisé selon la relation VI.6 et en prenant comme teneur en eau des cellules celle mesurée sur les bactéries cultivées à 1,5 osmol.kg^{-1}.

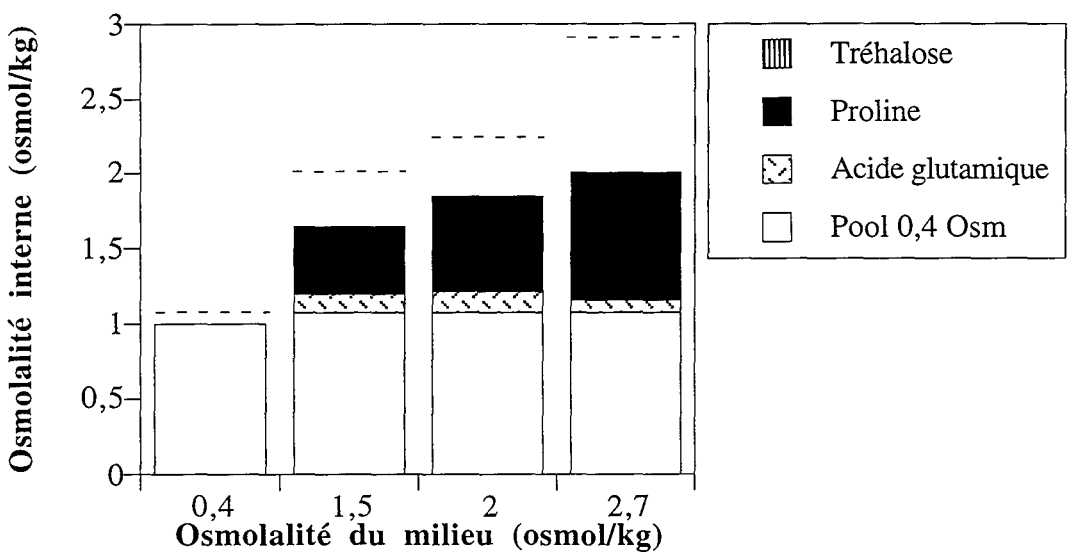


Figure n°VI.8 : Bilans osmotiques de *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée à différentes pressions osmotiques. *Osmolyte dépresseur : NaCl.* (- - - -) *Valeur de* Π_{intra} *mesurée.*

Les bilans osmotiques établis sur des cultures à 1,5 et 2 osmol.kg^{-1} sont bouclés à 80% ce qui est satisfaisant vue les imprécisions sur les concentrations intracellulaires en métabolites, sur la valeur du coefficient osmotique intracellulaire et de la pression osmotique intracellulaire.

Le pool cellulaire des bactéries cultivées à 0,4 osmol.kg^{-1} représente environ 50% de la pression osmotique intracellulaire. Il contient les cations potassium et sodium, l'acide glutamique et les composés anioniques (anions et acides organiques) nécessaires à l'électroneutralité du cytoplasme. Il ne participe pas réellement au rétablissement de la pression de turgescence puisqu'il n'a pas évolué à la suite du choc osmotique. Les métabolites intervenants sont la proline, principalement, et l'acide glutamique.

Nous avons précédemment montré que la pression osmotique intracellulaire augmente avec l'osmolarité du milieu. La contribution du contenu cellulaire présent à 0,4 osmol.kg^{-1}

diminue alors de 55% (à 1,5 osmol.kg^{-1}) à 39% (à 2,7 osmol.kg^{-1}). Par contre la contribution de la proline au rétablissement de la pression de turgescence augmente avec l'osmolarité du milieu (Figure n°VI.8)

Le bilan osmotique établi à 2,7 osmol.kg^{-1} n'est bouclé qu'à 65%. Cela peut s'expliquer :

- ❑ soit par une variation du coefficient osmotique intracellulaire avec l'osmolarité externe. Chez *Escherichia coli* , Cayley et *al.* (1991) ont montré que le coefficient osmotique augmentait de 0,54 à 0,71 quand la pression osmotique du milieu passait de 0,1 à 0,28 osmol.kg^{-1}. Dans notre cas, une augmentation du coefficient (de 0,9 à 1) ne suffirait pas à boucler le bilan à 80%.
- ❑ soit par une synthèse de métabolite supplémentaire qui n'a pas été prise en compte. Cette hypothèse semble tout de même peu probable, car il faudrait une importante accumulation de métabolites de l'ordre de 0,35 M.
- ❑ soit par une surestimation de la teneur en eau libre des cellules. La teneur en eau des bactéries cultivées à 2,7 osmol.kg^{-1} a été estimée à partir des valeurs mesurées sur des cultures à 1,5 osmol.kg^{-1}. Nous avons vu, dans le chapitre III, que la bactérie tend à restaurer son volume initial à la suite d'un choc osmotique. Néanmoins l'évolution du volume cellulaire n'a été suivie que durant 15 minutes après l'addition de NaCl. A cet instant, la bactérie cultivée respectivement à 2,55 et 3,3 osmol.kg^{-1} n'avait restaurée que 80 et 65% de son volume initial. Le bilan osmotique à 2,7 osmol.kg^{-1} serait bouclé à 80% pour une teneur en eau libre équivalente à 80% de sa teneur initiale. Cette hypothèse semble donc la plus vraisemblable.

Nous avons pu réaliser le bilan osmotique tout au long d'une culture de *Corynebacterium glutamicum* soumise à un choc osmotique de 0,4 à 2 osmol.kg^{-1}, par addition de NaCl, sur laquelle des mesures de pression osmotique intracellulaire ont été réalisées (Figure n°VI.9). L'établissement des bilans osmotiques permet de mieux évaluer l'importance des phénomènes observés dans le rétablissement de la pression de turgescence :

- ❑ la chute du volume cellulaire, après l'addition de NaCl, entraîne une augmentation de l'osmolalité interne de 1 à 1,95 osmol.kg^{-1}.
- ❑ l'accumulation des ions sodium, qui a lieu pendant la restauration du volume cellulaire, se traduit par une augmentation de la pression osmotique intracellulaire jusqu'à 2,5 osmol.kg^{-1}.
- ❑ l'accumulation de proline permet de stabiliser la pression osmotique intracellulaire entre 1,75 et 1,5 osmol.kg^{-1} pendant toute la croissance.

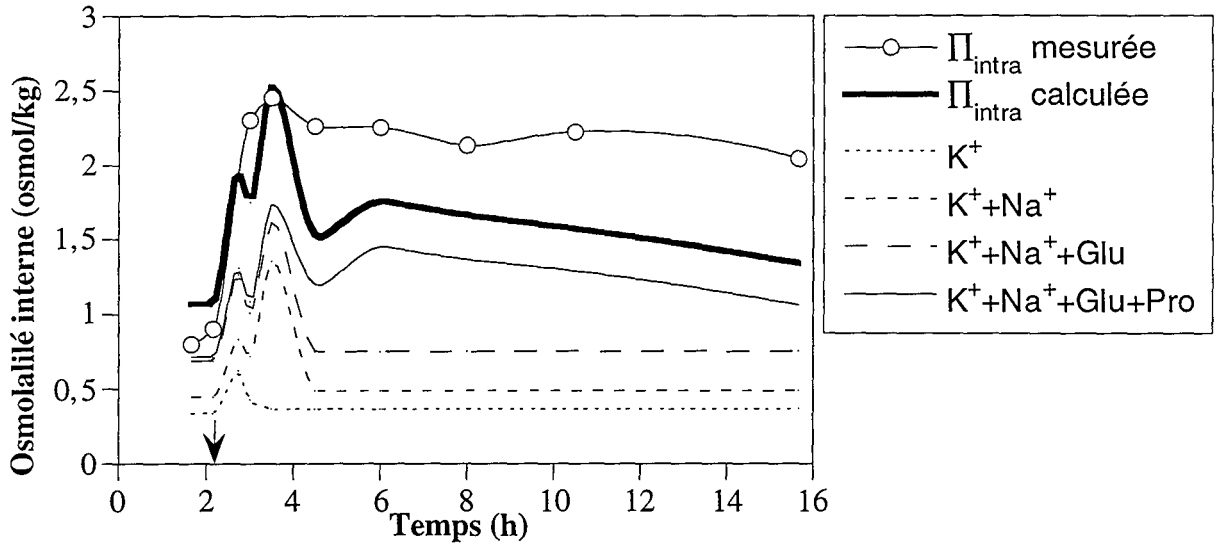


Figure VI.9 : Evolution de la pression osmotique intracellulaire mesurée et calculée au cours d'une culture de *C. glutamicum* ATCC 17965 à 0,4 puis 2 osmol.kg^{-1}, après addition de NaCl (flèche). *La contribution osmotique du potassium, sodium, acide glutamique et proline a été calculée et reportée sur la figure.*

II.2.3. Cultures discontinues soumises à un ajout de sorbitol ou glycérol

De manière à mieux comprendre la réponse osmotique des bactéries soumises à un choc osmotique par addition d'osmolytes pénétrants, les bilans osmotiques ont été effectués sur les cultures soumises à un ajout de sorbitol et glycérol et comparés avec celui obtenu avec le NaCl comme osmolyte dépresseur (Figure n° VI.10). Ne connaissant pas la teneur en eau des bactéries cultivées avec le glycérol, nous avons pris, pour le calcul des concentrations intracellulaires, la teneur en eau mesurée sur les cellules en culture en présence de sorbitol.

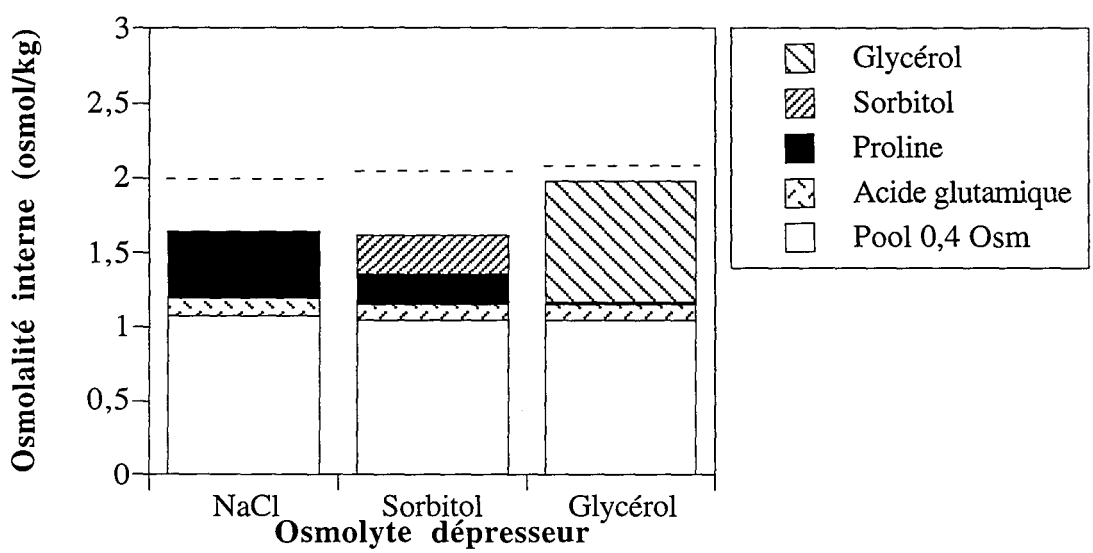


Figure n°VI.10 : Bilan osmotique de *C. glutamicum* ATCC 17965 cultivée à 1,5 osmol.kg^{-1} après ajout de différents osmolytes dépresseurs. (- - -) : *Valeurs de Π_{intra} mesurée*

Les bilans montrent que le sorbitol et le glycérol, en pénétrant dans la cellule, participe au rétablissement de la pression de turgescence en contribuant à l'élévation de la pression osmotique intracellulaire. La contribution osmotique du sorbitol est de 12% alors que celle du glycérol est de 38%.

Le bilan osmotique de la culture avec le sorbitol est bouclé à 80% comme celui de la culture avec NaCl. La contribution osmotique du sorbitol et de la proline réunis est égale à celle de la proline seule sur la culture avec NaCl. Cela suggère que la synthèse de proline répond à la perte de pression de turgescence plutôt qu'à l'osmolalité du milieu de culture.

Le bilan osmotique de la culture en présence de glycérol est bouclé à 93%. Ce bilan a été calculé en prenant comme teneur en eau des cellules celle mesurée sur la culture en présence de sorbitol. Ce meilleur bilan pourrait s'expliquer par une sous-estimation de la teneur en eau. Berner (1994) a observé une diminution transitoire du volume cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* suite à un choc osmotique par addition de glycérol. Au bout de quelques secondes, le volume cellulaire atteint une valeur supérieure à celle initialement mesurée.
Une autre explication possible est la présence de métabolites supplémentaires non dosés sur les cultures soumises à une addition de NaCl. Les études cinétiques ont montré qu'en présence de glycérol la synthèse de proline est fortement diminuée. La pénétration du glycérol pourrait également abolir la synthèse des métabolites non dosés. Dans ce cas, la part d'inconnu des bilans osmotiques devrait diminuer d'autant plus que l'osmolyte pénètre dans la cellule. Or cela n'est pas vérifié avec le bilan obtenu sur la culture avec sorbitol ce qui rend peu probable la seconde explication.

II.2.4. Bilans osmotiques sur les cultures de *C. glutamicum* ATCC 14752 et ses mutants

Les différents bilans osmotiques présentés dans ce paragraphe ont été calculés en prenant comme teneur en eau des cellules celle mesurée chez la souche ATCC 14752 à 0,4 et 1,5 osmol.kg^{-1}. Nous avons donc estimé que cette teneur en eau ne varie pas d'une souche à l'autre puisque les souches recombinées dérivent de la souche sauvage ATCC 14752.

II.2.4.1. Cultures à 0,4 osmol.kg^{-1}

Les bilans osmotiques de *C. glutamicum* ATCC 14752, du mutant *gdhA* et des mutants *proA* et *proC,* cultivés en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1}, sont présentés Figure n°VI.11. Les bilans sur les souches recombinées ont été réalisés en supposant que la teneur en potassium et

sodium est identique à celle mesurée chez la souche sauvage. Cette hypothèse a été, par la suite, vérifiée sur une culture avec le mutant *proC*; le contenu cellulaire en potassium et sodium ne subit pas de variation significative d'une souche à l'autre.

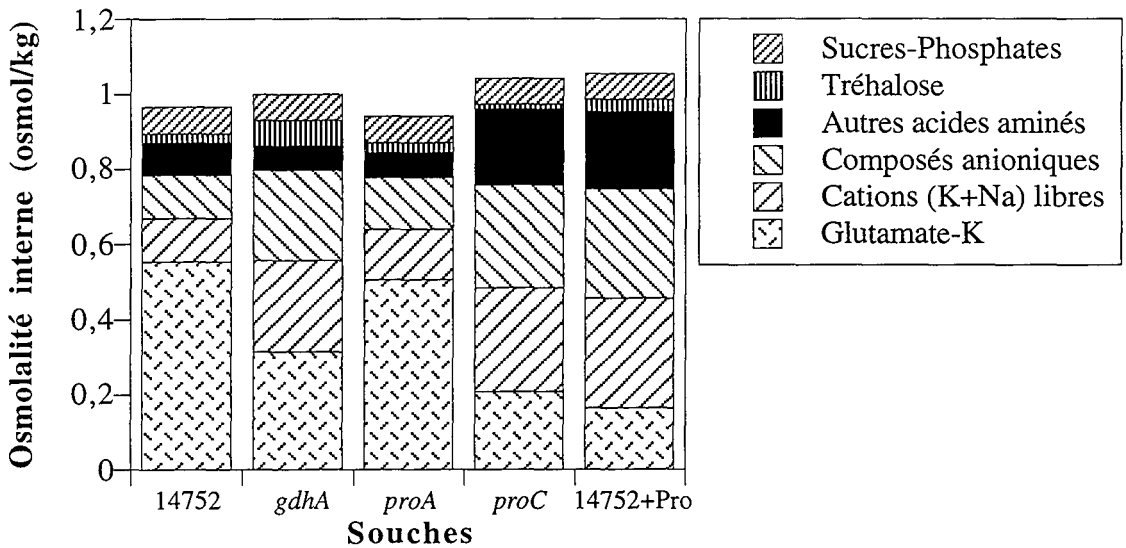


Figure n°VI.11 : Bilans osmotiques de *C. glutamicum* et des souches recombinées cultivées à 0,4 osmol.kg^{-1}

Ces bilans montrent l'importance de l'acide glutamique et des ions dans la pression osmotique intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum* . Ils représentent plus de 75% de l'osmolalité interne.

Peu de différence est observée entre les bilans osmotiques de la souche sauvage et du mutant *gdhA* malgré un contenu cellulaire en glutamate deux fois plus faible chez cette dernière. Ceci s'explique par le mode de calcul du contenu cellulaire total à 0,4 osmol.kg^{-1}. La diminution de l'acide glutamique est comblée par une augmentation des composés anioniques nécessaires à la neutralisation de l'excès de charges positives (potassium et sodium). Par ailleurs la pression osmotique intracellulaire mesurée chez ces deux souches, cultivées à 0,4 osmol.kg^{-1}, est également identique, ce qui va dans le sens du mode de calcul choisi.

II.2.4.2. Cultures à 1,5 osmol.kg^{-1}

Les bilans osmotiques des cultures des différentes souches ont été établis en phase exponentielle de croissance à 1,5 osmol.kg^{-1} (Figure n°VI.12). Les différents bilans sont bouclés entre 75 et 98%.

Chez la souche mère ATCC 14752 et le mutant *gdhA*, les bilans osmotiques sont bouclés à 80 et 85% et montrent que la proline, principalement, et le tréhalose sont les principaux participants au rétablissement de la pression de turgescence.

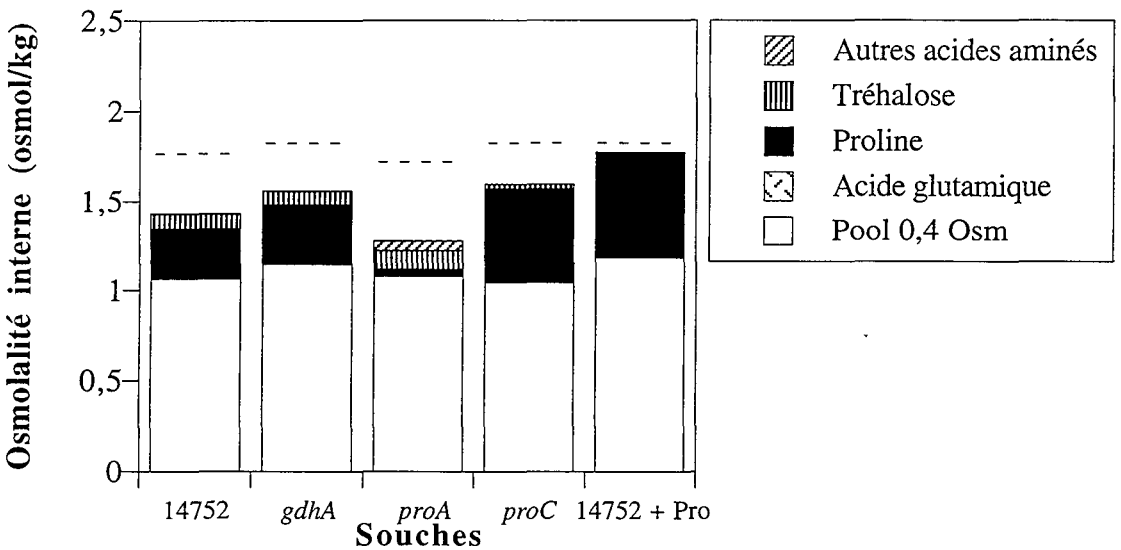


Figure n°VI.12 : Bilans osmotiques de *C. glutamicum* et des souches recombinées cultivées à 1,5 osmol.kg^{-1}.
(- - - -) *Valeur de* Π_{intra} *mesurée*

Chez le mutant *proA*, la faible synthèse de proline fait légèrement chuter le bilan osmotique (75%) ce qui est peu significatif. La synthèse de tréhalose, de glutamine et d'alanine ne compense que la moitié de la diminution de la pression osmotique de la proline. Une variation du coefficient osmotique intracellulaire due à la mutation du gène *proA* est peu probable. Une synthèse de métabolite supplémentaire non prise en compte peut alors être l'explication de ce faible bilan. Ces métabolites pourraient être le 4 -glutamyl phosphate et le pyroglutamate que nous n'avons pas dosé. Le 4-glutamyl phosphate est le substrat de la γ-glutamyl phosphate réductase, produit du gène *proA*. L'absence de cette enzyme chez ce mutant pourraît entraîner une accumulation de ce composé. Le pyroglutamate est, quant à lui, le produit de dégradation non-enzymatique du 4 - glutamyl phosphate (Serebrijski et *al.*, 1995) et pourrait aussi s'accumuler dans le cytoplasme.

Les bilans osmotiques réalisés sur les cultures de la souche sauvage et du mutant *proC*, cultivés en présence de proline exogène, sont bouclés entre 90 et 98%. Le rétablissement de la pression de turgescence est alors lié à l'accumulation de la proline exogène dans le cytoplasme bactérien.

Enfin les études cinétiques ont montré que le tréhalose est accumulé en réponse au choc osmotique chez la souche sauvage et ses mutants. Les bilans osmotiques montrent que la contribution du tréhalose au rétablissement de la pression de turgescence est très faible et ne dépasse pas 5% de l'osmolalité intracellulaire.

II.3. Discussion - conclusion

Les bilans osmotiques, établis à partir des mesures du contenu cellulaire en acides aminés, tréhalose et cations ainsi que de la teneur en eau cellulaire, nous permettent de calculer une pression osmotique intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum*. En comparant les valeurs calculées avec celles mesurées expérimentalement, les bilans osmotiques sont alors bouclés à 80-95%. Ceci indique que la régulation de la pression de turgescence est principalement réalisée par les métabolites dosés.

Dans le mode de calcul de ces bilans, nous avons dû estimer le coefficient osmotique intracellulaire à une valeur de 0,9. Très peu de valeurs de Φ_i sont disponibles dans la littérature. Nos valeurs peuvent être, au mieux, comparées à celles obtenues par Cayley et *al.* (1991) chez *Escherichia coli*. Chez cette bactérie, le coefficient osmotique varie entre $0,54 \pm 0,06$ et $0,71 \pm 0,11$ pour des osmolarités externes de 0,1 et 0,28 osmol.kg^{-1}. Une détermination complète et précise de la composition du milieu cytoplasmique serait nécessaire afin d'estimer correctement la valeur de Φ_i.

III. Récapitulation des résultats

❑ Etude sur la pression de turgescence

1 - A partir d'une méthode spectrophotométrique simple, nous avons pu mesurer expérimentalement la pression osmotique intracellulaire et la pression de turgescence de *C. glutamicum* . Les souches ATCC 17965 et 14752 cultivées en milieu BMCG à 0,4 osmol.kg^{-1} ont une pression de turgescence en phase de croissance de, respectivement, 0,67 et 0,49 osmol.kg^{-1}.

2 - Nous avons montré que la pression osmotique intracellulaire des bactéries, en phase exponentielle de croissance, augmente avec l'osmolarité du milieu tandis que la pression de turgescence diminue.

3 - Il a été clairement établi l'existence d'une étroite relation entre la pression de turgescence et la vitesse spécifique de croissance.

❑ Bilans osmotiques

1 - Les bilans osmotiques établis sur quelques cultures de *C. glutamicum* sont bouclés à plus de 75% montrant ainsi que nous avons pris en compte les principaux métabolites intervenants dans le rétablissement de la pression de turgescence.

2 - Les bilans osmotiques montrent clairement la contribution principale de la proline au rétablissement de la pression de turgescence à la suite d'un choc osmotique. Par contre, la contribution du tréhalose reste très faible même dans les conditions de synthèse accrue de ce disaccharide (mutants *proA*).

3 - Les bilans osmotiques établis sur les cultures avec différents osmolytes dépresseurs confirment que la synthèse de proline répond à la perte de pression de turgescence, plutôt qu'à la pression osmotique externe en soi.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Discussion - Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons étudié le comportement en fermenteur de souches de *Corynebacterium glutamicum* placées dans des conditions de stress osmotique. L'analyse de la réponse osmotique a été réalisée au niveau extracellulaire et intracellulaire. L'établissement des cinétiques de croissance, de consommation et de production de composés a conduit à une étude extracellulaire du système. Grâce à un important travail préalable de développement de techniques de dosage des métabolites intracellulaires, une analyse intracellulaire de la réponse osmotique a pu être réalisée.

Nous allons résumer les principaux résultats obtenus en reprenant les différentes questions posées au début de cette étude.

Quelle est la réponse de *C. glutamicum* à un choc hyperosmotique ?

Après un choc osmotique, la vitesse maximale de croissance et le rendement de croissance sur glucose diminuent proportionnellement avec l'augmentation de l'osmolarité du milieu. La chute du rendement de croissance traduit une utilisation plus importante du substrat carboné et énergétique dans les mécanismes d'osmorégulation aux dépens de la croissance.

La réponse osmotique bactérienne fait intervenir plusieurs événements physiologiques successifs. **La bactérie peut lutter contre une élévation de la pression osmotique externe par trois types de mécanismes différents** (*cf* Figure ci-après) : variation du volume cellulaire, transport de solutés extérieurs et synthèse de métabolites.

○ Par l'utilisation d'une technique spectrophotométrique, nous avons observé une **diminution du volume cellulaire** quelques secondes après l'addition du NaCl dans le milieu de culture. Cette réduction du volume cellulaire entraîne une concentration du milieu cytoplasmique et permet donc d'augmenter la pression osmotique intracellulaire. Les profils obtenus indiquent néanmoins que la bactérie tend à restaurer son volume initial au bout d'une période dépendante de l'amplitude du choc.

La détermination de la quantité d'eau libre intracellulaire chez *Corynebacterium glutamicum* a confirmé ces résultats. En effet, après un choc osmotique d'une amplitude de 1,1 osmol.kg^{-1}, les deux techniques utilisées montrent que la bactérie restaure au moins 90% de son volume cellulaire initial. L'application des bilans osmotiques a souligné l'importance d'avoir accès au volume cellulaire et à la teneur en eau des cellules dans le cadre de l'étude de l'osmorégulation. Les techniques utilisées au cours de ce travail sont simples mais ont montré leur limite pour la quantification de ces paramètres sur des cellules cultivées à très forte osmolarité. La détermination de la teneur en eau des cellules par les techniques utilisants des marqueurs radioactifs serait plus appropriée dans ce cas. Le suivi du volume cellulaire reste malgré tout un problème chez les bactéries.

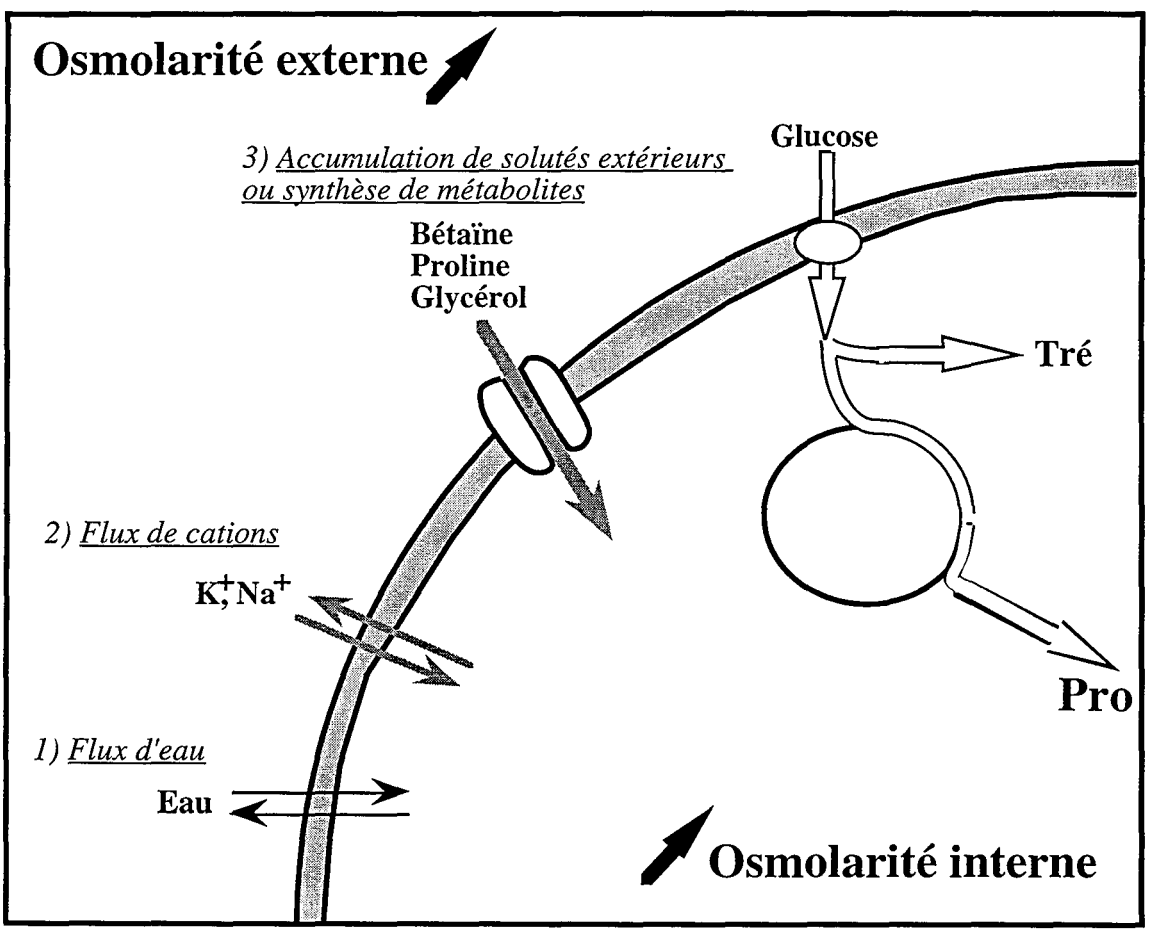


Figure : Réponse osmotique mise en évidence chez *C. glutamicum*

○ La bactérie peut augmenter son contenu cellulaire en accumulant des solutés présents dans le milieu extérieur.

❄ Ainsi quelques minutes après l'ajout de NaCl dans le milieu, une **accumulation rapide et transitoire d'ions sodium** a été observée en culture discontinue. Cette accumulation de cations dépend fortement de l'osmolyte utilisé. Ainsi l'utilisation de KCl, comme soluté dépresseur, entraîne une accumulation transitoire d'ions potassium. Par contre, avec un osmolyte non-ionique et non-pénétrant (galactose) aucune accumulation ni de sodium ni de potassium n'a été observée. L'effet inhibiteur sur la croissance de ces trois osmolytes étant équivalent, ces résultats suggèrent que cette accumulation de cations n'est pas un mécanisme essentiel chez *C. glutamicum* . En culture continue, une augmentation du pool cellulaire en cations a été également observée à l'état stationnaire. Dans ce cas, cette accumulation est permanente et contribue de manière non négligeable à l'élévation de la pression osmotique intracellulaire.

❄ Par ailleurs, nous avons vu que la bactérie accumule du glycérol, de la bétaïne ou de la proline lorsqu'ils sont présents dans le milieu externe. Cette accumulation, par transport, permet d'augmenter la pression osmotique intracellulaire sans nécessiter la synthèse des solutés compatibles, énergétiquement plus coûteuse pour la bactérie. En effet, dans ces différents cas la synthèse de proline est diminuée.

○ Enfin, la bactérie peut synthétiser en quantité importante un certain nombre de solutés compatibles.

❄ Une **accumulation de proline intracellulaire représente la réponse à long-terme** de la bactérie soumise à un choc osmotique (NaCl, KCl, galactose). Le contenu cellulaire en proline varie proportionnellement avec l'osmolarité du milieu. L'utilisation de différents composés ioniques et non-ioniques, non-pénétrant, comme osmolytes dépresseurs, a permis de démontrer que la synthèse de proline n'est pas une réponse spécifique au NaCl ou à l'élévation de la force ionique mais bien à l'élévation de la pression osmotique.
L'étude cinétique de la souche ATCC 14752 a montré que cette bactérie est plus sensible à la pression osmotique que *C. glutamicum* ATCC 17965. Nous avons parallèlement observé qu'elle accumule moins de proline que la seconde, ceci pouvant expliquer la différence de sensibilité à la pression osmotique. L'apport de proline exogène permet à la souche ATCC 14752 de retrouver une meilleure résistance au NaCl. Par ailleurs, l'étude réalisée avec des souches mutées dans la voie de biosynthèse de la proline a permis de confirmer ce fait. En effet, le mutant *proA* utilisé est une souche bradytrophe pour la proline, sa voie de

biosynthèse fonctionne mais est altérée. Cette souche, qui synthétise moins de proline que la souche sauvage, est plus sensible à la pression osmotique.
Par ailleurs, l'étude de l'influence du taux de croissance sur la réponse osmotique de *C. glutamicum* en culture continue a montré que le pool intracellulaire de proline est corrélé à la vitesse de croissance de la bactérie. Ces résultats montrent clairement l'importance de la proline sur la croissance de *C. glutamicum* cultivée sous forte pression osmotique.

❄ La bactérie n'accumule pas d'acide glutamique en réponse à un choc osmotique d'amplitude modérée (< 1-1,3 osmol.kg^{-1}) lors de cultures discontinues ou continues. Pour des chocs osmotiques d'amplitude supérieure, une accumulation transitoire d'acide glutamique a été observée.

❄ Une accumulation intracellulaire de tréhalose a été observée, en réponse à un choc osmotique, chez *C. glutamicum* ATCC 17965 lors des cultures continues. La synthèse de tréhalose augmente lorsque la voie de biosynthèse de la proline est affectée. En effet, l'étude en culture continue sous différentes limitations nutritionnelles montre que, lorsque la voie de biosynthèse d'acide glutamique et de proline est amoindrie (limitation ammonium et potassium), la bactérie accumule d'autres métabolites tels que le tréhalose et des acides aminés (glutamine, alanine). Cette balance entre proline et tréhalose a également été observée chez la souche mutante *proA* , cultivée en culture discontinue, où la voie de biosynthèse de la proline est altérée. Néanmoins la contribution osmotique du tréhalose est inférieure à celle de la proline.

L'étude de la réponse de *C. glutamicum* à un choc osmotique par addition d'osmolytes non-ioniques et pouvant pénétrer dans le cytoplasme (sorbitol, glycérol) a montré que l'inhibition de la croissance bactérienne est moins drastique avec ces osmolytes pénétrants. De plus, la synthèse de proline est d'autant plus faible que l'osmolyte dépresseur est accumulé dans le cytoplasme bactérien. L'osmolyte, en pénétrant dans le cytoplasme, participe à l'élévation de la pression osmotique intracellulaire. Ces résultats mettent donc en avant la pression de turgescence, plus que l'osmolalité du milieu en soi, comme facteur influençant la croissance bactérienne et la réponse osmotique.

Dans la dernière partie de l'étude, nous avons pu observer grâce à des mesures expérimentales une augmentation de la pression osmotique intracellulaire proportionnelle à l'osmolarité externe. L'accumulation de métabolites intracellulaires permet de rétablir une pression de turgescence positive. Par ailleurs, nous avons vérifié si, à partir des concentrations internes en métabolites déterminées expérimentalement, nous pouvions retrouver, par le calcul, les valeurs de pression osmotique intracellulaire mesurées. L'écart entre la pression osmotique intracellulaire calculée et celle mesurée est de l'ordre de 20%. Ces résultats sont satisfaisants compte tenu des imprécisions sur les mesures de concentration intracellulaire et de pression osmotique

intracellulaire. Cela suggère donc que nous n'avons pas oublié de métabolites importants. Cette étude a enfin montrée la nécessité de déterminer avec précision la teneur en eau libre de la cellule. Une surestimation de le teneur en eau est, semble-t-il, à l'origine du faible bilan osmotique observé sur les cultures à très forte osmolalité (>2 osmol.kg^{-1}).

Ces observations vont nous permettre de discuter les mécanismes de la réponse osmotique au niveau macroscopique (pression de turgescence) et moléculaire (régulations métaboliques).

Quelle est l'explication métabolique des phénomènes observés ?

Nous avons vu jusqu'à présent que les changements métaboliques induits par le choc osmotique concerne les voies de biosynthèse de trois principaux métabolites, l'acide glutamique, la proline et le tréhalose. Les résultats précédemment résumés soulèvent un certain nombre de questions auxquelles nous allons tenter de répondre :

❑ *Pourquoi la proline est-elle accumulée chez C. glutamicum et non le glutamate ?*

Nous avons montré que *Corynebacterium glutamicum* accumule de la proline de manière importante après un choc osmotique mais pas d'acide glutamique. Ce résultat est surprenant pour une bactérie productrice d'acide glutamique. En outre l'accumulation d'acide glutamique serait plus rentable pour la bactérie d'un point de vue énergétique mais aussi du point de vue "osmotique". En effet, la synthèse de proline est plus coûteuse énergétiquement que celle d'acide glutamique. Elle consomme une mole de plus d'ATP et deux moles de $NADPH_2$. Par ailleurs, l'acide glutamique étant complexé à un cation (en solution à pH physiologique), possède, à concentration égale, une osmolarité deux fois supérieure à celle de la proline.

Deux hypothèses peuvent être proposées pour répondre à cette question:

○ Du fait de sa charge ionique, une accumulation d'acide glutamique entraîne une augmentation de la force ionique du cytoplasme qui peut être inhibitrice de certaines activités enzymatiques (Measures, 1975). A l'inverse, la proline est un acide aminé neutre et donc sa synthèse ne provoque pas d'élévation de la charge ionique.

○ La voie de biosynthèse d'acide glutamique peut être saturée ou inhibée. Il a été décrit chez *Corynebacterium glutamicum* une inhibition de l'activité de la glutamate deshydrogénase par le produit de la réaction : l'acide glutamique. *In vitro,* une concentration en glutamate de 200 mM réduit l'activité spécifique initiale de 75% (Delaunay, 1995). La concentration en glutamate

intracellulaire mesurée chez la souche ATCC 17965 est de 250 mM. Nous avons observé que la vitesse spécifique maximale d'accumulation d'acide glutamique est constante à des osmolarités comprises entre 0,4 et 2 osmol.kg^{-1}. On peut donc supposer que la voie de biosynthèse d'acide glutamique est au maximum de sa capacité chez *Corynebacterium glutamicum* cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1}. A la suite du choc osmotique, du fait de la rétro-inhibition du glutamate sur la glutamate deshydrogénase, une accumulation plus importante d'acide glutamique ne serait donc pas possible. **La synthèse de proline, produit de l'acide glutamique, serait un moyen de déblocage de la voie de biosynthèse de l'acide glutamique.** Une accumulation de proline est alors observée sans accumulation supplémentaire de glutamate.

La détermination des vitesses spécifiques d'accumulation de proline montre que l'accumulation de proline augmente avec la pression osmotique du milieu jusqu'à une certaine valeur d'osmolalité (2,2 osmol.kg^{-1} pour la souche ATCC 17965). Au delà de cette valeur, cette vitesse reste à un maximum qui n'évolue plus avec la pression osmotique du milieu. Ces résultats indiquent un phénomène de saturation de la voie de biosynthèse de proline. A partir de cette valeur d'osmolarité, une accumulation supplémentaire d'acide glutamique est observée. Suite à la saturation de la voie principale de biosynthèse de glutamate et de proline, l'intervention d'une voie alternative de biosynthèse d'acide glutamique (gogat, transaminases) peut être envisagée comme explication de ce phénomène. L'étude cinétique du mutant déficient en glutamate deshydrogénase a montré que la bactérie peut synthétiser du glutamate par d'autres voies métaboliques.

Nous aboutissons à un modèle simple de régulation de la voie de biosynthèse d'acide glutamique en réponse à un choc osmotique. La glutamate deshydrogénase est considérée comme principale voie de biosynthèse d'acide glutamique. La détermination des quantités d'enzymes intracellulaires a jusqu'ici montré que la glutamate deshydrogénase est l'enzyme quantitativement prédominante par rapport à la gogat et l'aspartate transaminase. Une détermination de la participation de ces différentes enzymes à la biosynthèse de l'acide glutamique serait nécessaire pour confirmer ce modèle. Par contre avec ce modèle, nous n'expliquons pas le fait que l'accumulation d'acide glutamique observée n'est que transitoire.

❑ *Comment la synthèse de proline est -elle déclenchée chez C. glutamicum ?*

Au cours de travaux précédents, Wojcik (1992) a été le premier à observer une importante accumulation de proline chez *Corynebacterium glutamicum* en réponse à une addition de NaCl. En conclusion de ces travaux, il émet l'hypothèse selon laquelle la proline serait le principal osmorégulateur chez cette bactérie. A la suite de nos travaux, nous avons confirmé sans ambiguïté l'importance de la proline dans les phénomènes d'osmorégulation.

Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que la synthèse de proline résulte de la saturation de la voie de biosynthèse de l'acide glutamique. L'activation de la voie de biosynthèse de proline par l'osmolarité est expliquée par une osmo-induction du promoteur du gène proA (Serebrijski, 1995). Nos différents résultats tendent à montrer que **la synthèse de proline répond à la variation de pression de turgescence plutôt qu'à celle de la pression osmotique externe.** On peut supposer, dans ce cas, l'existence d'un capteur sensible à la pression de la membrane plasmique contre le peptido-glycan (capteur à pression de turgescence). Une réponse en cascade (de type second messager) pourrait entraîner l'induction du promoteur.

❑ *Quel est le rôle physiologique du tréhalose ?*

Quelque soit la souche utilisée, une accumulation de tréhalose a été observéependant la phase de croissance. Une diminution du contenu cellulaire en tréhalose libre a lieu en phase stationnaire. En culture discontinue, nous n'avons pas trouvé de relation entre ce pool intracellulaire et l'osmolarité du milieu. Par contre, en culture continue, sous limitation glucose, l'accumulation de tréhalose augmente avec l'osmolarité du milieu. La détermination des vitesses spécifiques d'accumulation de tréhalose en culture continue a, par ailleurs, montré que la synthèse de tréhalose est liée à la vitesse spécifique de consommation du glucose (elle-même liée à l'osmolarité) plutôt qu'à la pression osmotique du milieu.

Ces résultats suggèrent que **le tréhalose n'est pas un véritable osmorégulateur** dans le sens où son accumulation n'est pas directement liée à l'élévation de la pression osmotique. La synthèse de tréhalose résulterait d'une déviation du flux carboné suite à l'augmentation du flux de glucose entrant après le choc osmotique. Sa fonction cellulaire se rapprocherait alors de celle d'un **composé de réserve**. Cette hypothèse permettrait d'expliquer également le profil d'évolution du contenu cellulaire en tréhalose observé en culture discontinue qui semble suivre celui de la vitesse spécifique de consommation du glucose. La balance observée entre proline et tréhalose pourrait également s'expliquer par une réorganisation des flux métaboliques due à l'apparition de goulot d'étranglement (suite à une mutation apportée sur la voie de biosynthèse de la proline ou au ralentissement de cette voie à cause d'une limitation nutritionnelle). Une étude des flux métaboliques pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Néanmoins un biais est apporté à cette hypothèse par le fait que, lors de cultures sous fortes osmolarités en présence d'osmoprotecteurs (bétaïne) ou d'osmolytes pénétrants (glycérol), l'accumulation de tréhalose est faible ainsi que celle de proline. L'effet de la bétaïne est connue chez de nombreuses bactéries ; en pénétrant dans la cellule, la bétaïne abolie la synthèse des solutés compatibles. Dans ce cas, le tréhalose se comporterait chez *Corynebacterium glutamicum* comme un soluté compatible.

Le tréhalose est décrit, dans la littérature, comme composé pariétal, sous forme estérifiée à des acides mycoliques, chez les corynebactéries. Il est également connu comme composé protecteur contre la déshydratation des cellules. On peut supposer que l'accumulation de tréhalose liée à la vitesse de consommation de glucose et à l'élévation de la pression osmotique résulte de son rôle de précurseur des composés pariétaux nécessaires à la croissance et à la protection contre la déshydratation (résultante du choc osmotique).

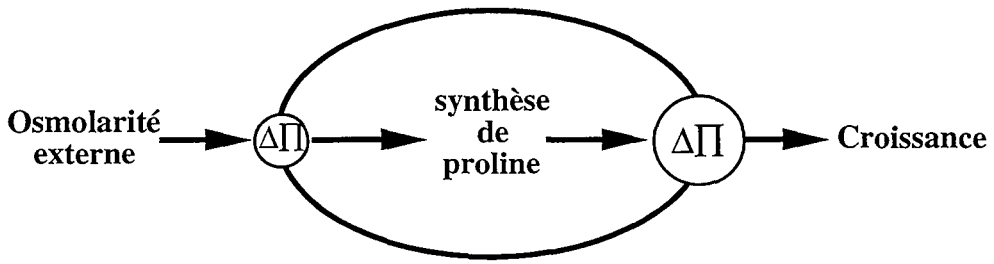
La présence de tréhalase n'a jamais été mis en évidence chez les souches de corynebactéries utilisées ici. La diminution du contenu cellulaire en tréhalose libre, observée en phase stationnaire de croissance, pourrait s'expliquer, là encore, par une incorporation plus importante du tréhalose dans la membrane bactérienne nécessaire à la survie de la bactérie dans ces conditions extrêmes. Un suivi de l'incorporation du tréhalose dans la membrane bactérienne dans différentes conditions de cultures permettrait de mieux déterminer la fonction physiologique du tréhalose chez les corynebactéries.

Quel est le rôle de la pression de turgescence ?

Par des mesures de la pression osmotique intracellulaire de *C. glutamicum*, nous avons pu observer que la pression de turgescence des bactéries en croissance est positive mais diminue avec l'élévation de l'osmolarité externe. La détermination de la pression de turgescence en culture continue, à différents taux de croissance et osmolalités, a permis de mettre clairement en évidence une relation étroite entre la pression de turgescence et la vitesse de croissance de la bactérie (et non pas l'osmolalité). Cette relation a été retrouvée sur des cultures discontinues de différentes souches de *C. glutamicum* .

Nos résultats démontrent donc que la **pression de turgescence peut être considérée comme étant la force motrice de la croissance de *Corynebacterium glutamicum*.** Cette relation peut se comprendre par le fait que la bactérie se divise par un processus d'élongation cellulaire.

Enfin nous avons observé qu'en culture continue, sous limitation glucose et sous forte pression osmotique, la bactérie accumule d'autant plus de proline que le taux de croissance est élevé. Il existe donc une relation étroite entre synthèse de proline, pression de turgescence et vitesse de croissance. Nous parvenons donc à une séquence d'événements de ce type : l'augmentation de la pression osmotique externe entraîne une diminution de la pression de turgescence, celle-ci déclenche les mécanismes d'osmorégulation et notamment la synthèse de proline qui permet le rétablissement d'une pression de turgescence positive force motrice de la croissance bactérienne.



A l'inverse, chez *Escherichia coli*, Cayley et al. (1991) ont montré que la vitesse de croissance est liée au volume cytoplasmique et plus précisément au volume d'eau libre de la cellule. Il existe une différence fondamentale de comportement entre *E. coli* et *C. glutamicum*. Ceci peut s'expliquer par une différence de propriété physico-chimique de la membrane entre bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. *C. glutamicum* ainsi que *Bacillus subtilis* (Whatmore et Reed, 1990a) se comportent comme des "cellules rigides". Lorsque ces bactéries sont soumises à des chocs hyperosmotiques croissants, leur volume reste constant jusqu'à l'annulation de la pression de turgescence puis diminue proportionnellement avec l'osmolalité. A l'inverse, chez *Escherichia coli* placée dans des conditions identiques, le volume cellulaire diminue proportionnellement avec l'osmolalité ce qui traduit un comportement de "cellule élastique" (Csonka et Hanson, 1991). Brown (1990) a observé que le volume cellulaire est l'élément régulé chez les cellules sans paroi ("cellules élastiques") tandis que la pression de turgescence est régulée chez les cellules à paroi ("cellules rigides").

A osmolarité externe égale, les valeurs de pression de turgescence obtenues chez *C. glutamicum* sont nettement supérieures à celles obtenues chez *E. coli* (Cayley, 1991). Cette différence ne peut néanmoins pas s'expliquer uniquement par une différence d'accumulation de métabolites. Le coefficient osmotique intracellulaire a pu être estimé à partir de la mesure de la pression osmotique intracellulaire et de la composition du milieu cytoplasmique de *C. glutamicum* cultivée à 0,4 osmol.kg^{-1}. La valeur calculée est alors de 0,9. Chez *E.coli*, Cayley et *al.* (1991) ont estimé, en utilisant la même démarche, un coefficient osmotique intracellulaire de 0,7 chez la bactérie cultivée à 0,3 osmol.kg^{-1}. Ces auteurs interprètent cette non-idéalité osmotique en terme d'accumulation préférentielle du potassium avec les acides nucléiques (par des interactions électrostatiques). Le potassium ainsi complexé aux acides nucléiques ne possède pas la même contribution osmotique que le potassium libre. Ceci se traduit par une faible activité thermodynamique du potassium de l'ordre de 0,15 M pour une concentration intracellulaire totale de 0,35 M. La moitié du potassium intracellulaire serait donc complexé aux acides nucléiques. *E. coli* et *C. glutamicum* possèdent une teneur en eau libre quasiment identique. Par contre, le contenu cellulaire en acides nucléiques est supérieur chez E. coli (24% d'après Cayley et *al.*,

1991) que chez *C. glutamicum* (17% d'après Bourrust, 1993). Ce résultat provient d'une différence de teneur en ARN (3 mM chez *C. glutamicum* et 4,5 mM chez *E. coli*), le contenu en ADN étant semblable chez les deux bactéries (3,5%). De plus la concentration intracellulaire totale en potassium (0,35 M) est identique chez les deux bactéries cultivées à 0,3-0,4 osmol.kg^{-1}. On peut donc supposer que chez *C. glutamicum* l'activité thermodynamique du potassium est supérieure à celle d'*E. coli* et peut donc expliquer le coefficient osmotique plus élevé chez notre bactérie.

Comparaison de la réponse osmotique de *Corynebacterium glutamicum* à d'autres bactéries.

Les études de l'osmorégulation des corynebactéries sont relativement peu nombreuses. *Escherichia coli* est la bactérie la plus étudiée. Nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus chez *E. coli*, bactérie à Gram négatif, et *Bacillus subtilis*, bactérie à Gram positif dont on connaît bien la réponse osmotique.

Il existe tout d'abord une différence de résistance à la pression osmotique entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif. Les premières sont moins résistantes au NaCl. Ceci peut s'expliquer en partie par une nette différence entre les pools intracellulaires en acides aminés de ces bactéries. Ainsi le contenu cellulaire en acides aminés chez des bactéries à Gram positif non stressées est équivalent à celui obtenu chez des bactéries à Gram négatif osmotiquement stressées (Measures, 1975). Cette différence se reflète sur les valeurs de pression de turgescence de ces bactéries. Ainsi à osmolalité externe équivalente (0,3-0,4 osmol.kg^{-1}), la pression de turgescence obtenue chez *C. glutamicum* et *B. subtilis* (Whatmore et Reed, 1990a) est de l'ordre de 0,7 osmol.kg^{-1} alors que celle d'*E.coli* n'est que de 0,02 osmol.kg^{-1} (Cayley et *al.*, 1991).

Quelque soit la bactérie (mis à part les bactéries marines), les acides aminés représentent les principaux solutés compatibles. Chez *C. glutamicum* et *B. subtilis*, la proline est le principal composé organique osmorégulateur, tandis que, chez *E. coli,* on trouve une accumulation d'acide glutamique. Le tréhalose est également synthétisé en réponse à un choc osmotique chez *E. coli.*

Chez de nombreuses bactéries, le potassium est décrit comme le composé le plus important dans les mécanismes d'osmorégulation. Il est accumulé, en réponse à une addition de NaCl dans le milieu, et est cité comme signal secondaire de l'osmorégulation en déclenchant les synthèses des solutés compatibles. C'est le cas notamment chez *E. coli* et *B. subtilis*. A l'inverse, nous avons vu que *C. glutamicum* accumule du sodium. Il existe d'autres bactéries qui ont ce comportement tels que des cyanobactéries. Chez *C. glutamicum,* nous pouvons dire que la synthèse des solutés compatibles n'est pas déclenchée par l'accumulation du potassium ni du sodium. En effet, une

réponse osmotique identique est obtenue lorsque le choc osmotique est réalisé avec un composé non ionique (galactose). Ce choc n'entraîne pas d'accumulation de cations.

Enfin, nous avons vu qu'il existe une différence fondamentale de comportement entre *Escherichia coli* et *Corynebacterium glutamicum* . Pour la première, le volume cellulaire est l'élément régulé de l'osmorégulation, tandis que pour la seconde c'est la pression de turgescence.

Ainsi le modèle d'osmorégulation décrit chez *Escherichia coli* ne peut pas être extrapolé à *Corynebacterium glutamicum* .

❖ ❖ ❖

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives d'investigation. Celles-ci peuvent conduire à un approfondissement de l'étude de l'osmorégulation ou à l'application des connaissances acquises à la compréhension du procédé de production d'acide glutamique.

❑ Dans le cadre de l'étude de l'osmorégulation de *Corynebacterium glutamicum* , plusieurs points pourraient être approfondis. Dans le but de valider notre modèle de régulation de la voie de biosynthèse d'acide glutamique et de proline en réponse à un choc osmotique, il serait intéressant de déterminer la participation des différentes enzymes (glutamate deshydrogénase, gogat, transaminases) à la biosynthèse de l'acide glutamique. Ceci pourrait être réalisé en utilisant des inhibiteurs spécifiques de chacune de ces enzymes. Une telle étude a été amorcée, au laboratoire, sans succès faute d'inhibiteurs performants (Delaunay, 1995). L'obtention de mutants déficients pour la gogat ou certaines transaminases serait un autre moyen d'étude.

La détermination du rôle physiologique du tréhalose chez *Corynebacterium glutamicum* pourrait être effectuée par un suivi de l'incorporation du tréhalose dans la membrane bactérienne dans différentes conditions de cultures et d'osmolarités. En parallèle, une étude approfondie des flux métaboliques permettrait de vérifier l'hypothèse avancée au cours de ce travail et de mieux comprendre la balance proline-tréhalose. Cette étude pourrait être complétée par l'obtention et l'analyse de souches mutées dans la voie de biosynthèse du tréhalose.

❑ Afin de savoir si la pression osmotique est réellement le paramètre clé de la production d'acide glutamique au sein du procédé avec surfactant, il serait nécessaire d'étudier l'influence de la pression osmotique après l'ajout des surfactants. L'utilisation d'osmolytes ioniques et non-ioniques peut être envisagée. De même l'ajout, dans le milieu, d'un composé non-ionique pénétrant tel que le glycérol devrait permettre de voir si la pression de turgescence peut être le facteur influençant la production d'acide glutamique.

ANNEXES

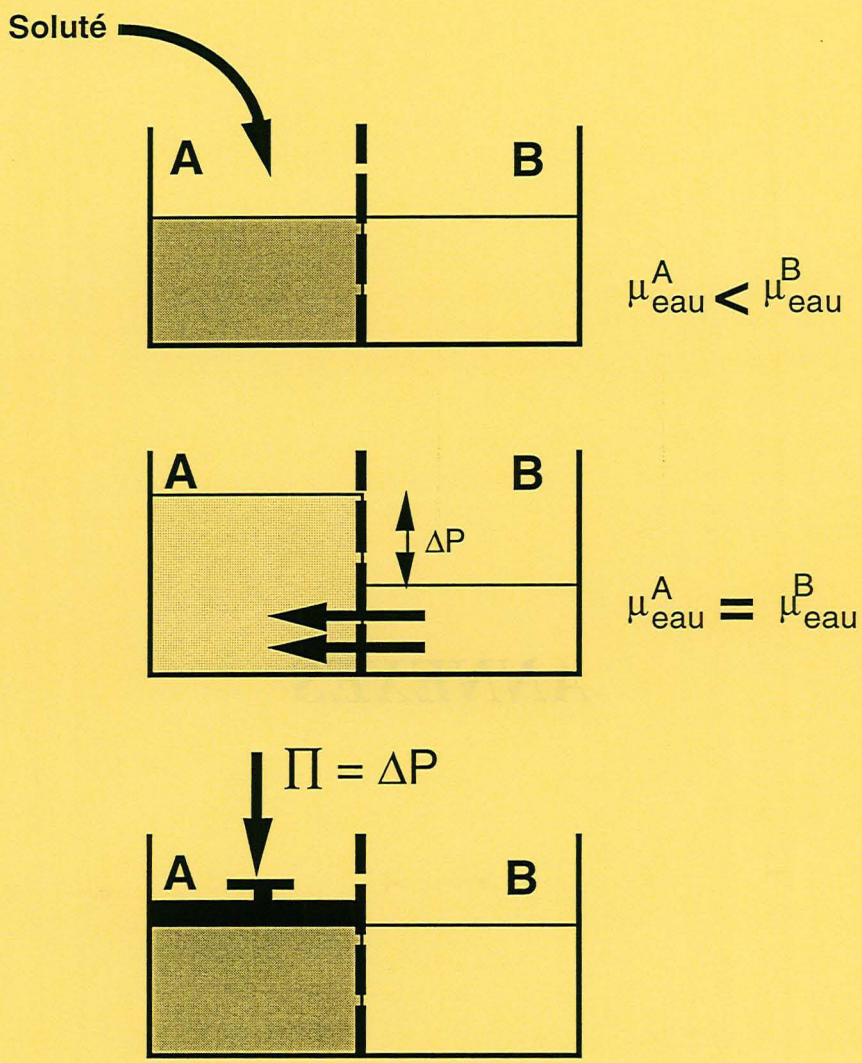


Figure n°1 : Mise en évidence du phénomène d'osmose et de la pression osmotique

ANNEXE I : PRESSION OSMOTIQUE : RAPPELS

1. Osmose et pression osmotique : définitions

L'expérience la plus couramment décrite pour mettre en évidence le phénomène d'osmose est la suivante. Considérons deux compartiments A et B contenant le même volume d'eau pure séparés l'un de l'autre par une membrane semi-perméable totalement perméable à l'eau et imperméable aux solutés (*cf* Figure n°1). La pression est la même dans les deux compartiments. Une certaine quantité d'un soluté est alors ajoutée dans le compartiment A. Cet ajout déclenche une diffusion d'eau du compartiment B vers le compartiment A. Ce phénomène est appelé **osmose**.

La force responsable du flux d'eau est appelée la **pression osmotique** ($\prod$). Elle est égale à la pression à appliquer au compartiment A pour stopper le flux d'eau (Shechter, 1984).

2. Loi thermodynamique de la pression osmotique : loi de Van't Hoff

Dans le but de quantifier la pression osmotique, il est fondamental de connaître la relation reliant la pression osmotique à la composition d'une solution. Le problème a été abordé par Van't Hoff, en 1887, sur la base d'une analogie entre la pression osmotique d'une solution diluée et la pression des gaz.

En thermodynamique, le sens du transport d'un constituant (eau ou soluté non chargé) est dicté par la valeur de son **potentiel chimique** (μ). Le transport net d'eau d'un compartiment à un autre s'accompagne d'une variation de volume et donc de pression, qu'il est nécessaire de prendre en considération. La comparaison des potentiels chimiques ne suffit plus à prédire le sens du transfert spontané, à moins d'inclure la pression dans la définition du potentiel chimique standard :

$$\mu_i^0 (P + dP) = \mu_i^0 (P) + V_i.dP \qquad (1)$$

où V_i est le volume molaire du constituant i, μ_i^0 (P) et μ_i^0 (P+dP) les potentiels chimiques standards (concentration unité) aux pressions P et P+dP.

Dans l'exemple cité ci-dessus, le potentiel chimique de l'eau est supérieur dans le compartiment B. Il y a alors diffusion d'eau du compartiment de plus fort potentiel chimique (B) vers le compartiment de potentiel chimique inférieur (A). Cette diffusion s'accompagne d'une différence de pression dP entre les deux compartiments (*cf* Figure n°1). La diffusion continue jusqu'à l'obtention de l'équilibre des potentiels chimiques dans les deux compartiments :

$$\mu_{eau}^A = \mu_{eau}^B \qquad (2)$$

Solutions idéales	Solutions non-idéales
$\Pi = -\frac{R.T}{V_{eau}} . \ln x^{A}_{eau}$	$\Pi = -\frac{R.T}{V_{eau}} . \ln \gamma x^{A}_{eau}$
$\Pi = -\frac{R.T}{V_{eau}} . \ln (1-x^{A}_{soluté})$	$\Pi = -\frac{R.T}{V_{eau}} . \ln \gamma (1-x^{A}_{soluté})$

dans le cas de solutions diluées : $\ln (1-x^{A}_{soluté}) \# -x^{A}_{soluté}$

$\Pi = \frac{R.T}{V_{eau}} . x^{A}_{soluté}$	$\Pi = \frac{R.T}{V_{eau}} . \Phi . x^{A}_{soluté}$	
	non-électrolytes	**électrolytes**
$\Pi = R.T.C_{soluté}$	$\Pi = \Phi.R.T.C_{soluté}$	$\Pi = \Phi.R.T.\nu.C_{soluté}$

Tableau n°1 : Expressions mathématiques de la pression osmotique dans le cas de solutions idéales et non-idéales d'électrolytes et de non-électrolytes.

$$\text{or : } \mu^{B}_{eau} = \mu^{0}_{eau}(P+dP) \qquad (3)$$

La condition d'équilibre devient alors :

$$\mu^{A}_{eau} = \mu^{0}_{eau}(P) + V_{eau}.dP + R.T.\ln x^{A}_{eau} \qquad (4)$$

x^{A}_{eau} : fraction molaire de l'eau dans le compartiment A

V_{eau} : volume molaire de l'eau.

A l'équilibre, l'excès de pression qui s'établit dans le compartiment A par rapport au compartiment B est ΔP. On obtient alors :

$$\mu^{0}_{eau}(P) = \mu^{0}_{eau}(P) + V_{eau}.\Delta P + R.T.\ln x^{A}_{eau} \qquad (5)$$

$$V_{eau}.\Delta P + R.T.\ln x^{A}_{eau} = 0 \qquad (6)$$

D'après la définition de la pression osmotique, l'excès de pression au dessus du compartiment A est égal à la pression osmotique :

$$\Delta P = \Pi$$

$$\text{Soit } \boxed{\Pi = -\frac{R.T}{V_{eau}}.\ln x^{A}_{eau}} \qquad (7)$$

A ce niveau, il est nécessaire de faire la distinction entre solution **idéale** et **non idéale** (*cf* Tableau n°1).

❑ Dans le cas d'une **solution idéale diluée**, on obtient la relation :

$$\boxed{\Pi = R.T.C_{soluté}}$$

R : constante des gaz parfaits (8,314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)

$C_{soluté}$: concentration en soluté donné en $mol.m^{-3}$

T : température (K)

Π est alors exprimé en Pascal (Pa).

Comme la concentration molaire $C_{soluté}$ est égale à $\frac{n_{soluté}}{V}$:

$$\Pi.V = R.T.n_{soluté}$$

Cette relation est la loi de Van't Hoff (1887), calquée sur la loi des gaz parfaits. Elle n'est valable que pour les solutions idéales et suffisamment diluées.

❑ Pour les **solutions non idéales**, il est nécessaire d'introduire le coefficient d'activité (γ) et le coefficient osmotique (Φ) afin de conserver la validité de la loi (7) (*cf* Tableau n°1)

Ces coefficients sont égaux à 1 pour les solutions idéales.

L'expression γx_{eau}^{A} est appelé **activité de l'eau**, notée a_w.

L'a_W de toute solution est inférieure à 1. Seule l'eau pure a une a_W égale à 1.

L'activité de l'eau est un descripteur simple de l'état de l'eau dans un milieu. Cette notion est souvent utilisée dans le domaine alimentaire où elle est préférée à la pression osmotique car elle traduit mieux l'état d'hydratation du milieu (Berner, 1994).

Le **coefficient osmotique** est encore appelé coefficient de déviation par rapport à l'idéalité.

On obtient pour des **solutions non idéales de non électrolytes** :

$$\boxed{\Pi = \Phi.\mathrm{R.T.}C_{soluté}}$$

pour des **solutions non idéales d'électrolytes** :

$$\boxed{\Pi = \Phi.\mathrm{R.T.}\nu.C_{soluté}}$$

ν étant le nombre d'ions par molécule

3. Osmolarité et osmolalité

L'osmolarité et l'osmolalité se définissent à partir de la molarité et de la molalité des solutés dissous. Ces notions sont tirées de la relation citée ci-dessus :

$$\Pi = \Phi.\mathrm{R.T.}\nu.C_{soluté} \qquad (8)$$

L'expression $\Phi.\nu.C_{soluté}$ correspond à l'**osmolarité** de la solution.

A partir de l'équation (8), on obtient l'équation suivante :

$$\Pi = \Phi.\mathrm{R.T.}\nu.m.\rho \qquad (9)$$

m : molalité (mole.kg^{-1} de solvant)
ρ : densité de la solution

L'expression $\Phi.\nu.m$ correspond à l'**osmolalité** de la solution. Elle peut être mesurée à l'aide d'un osmomètre.

Ces deux notions sont largement utilisées chez les microbiologistes. Elles ont l'avantage de traduire de manière très simple la notion de pression osmotique en une notion plus usuellement utilisée : la concentration. Dans ce cas on parle de concentration osmolaire dont l'unité est l'**osmole.kg^{-1}** ou l'**osmole.l^{-1}**. L'osmole est ici le nombre de particules qui abaisse le point de congélation d'une solution de 1,858 °C.

En effet, les solutions diluées possèdent quatre propriétés physiques colligatives reliées les unes aux autres. Ainsi une solution à 1 mole.kg^{-1} d'un soluté non ionique :

- abaisse le point de congélation de 1,858°C

- augmente la pression osmotique de 1 osmol.kg^{-1} (1 mOsm = 17 mm Hg)
- augmente le point d'ébullition de 0,52 °C
- abaisse la pression de vapeur de 0,3 mm Hg.

Ainsi pour des solutions diluées, le point de congélation est directement proportionnel à l'osmolalité. Plus une solution possède une osmolalité élevée, plus son point de congélation est bas. Les osmomètres de laboratoire donnent une mesure de l'osmolalité d'une solution par la détermination du point de congélation des solutions.

A partir de la relation (9), on obtient la relation reliant l'osmolalité à la molalité d'une solution :

$$\boxed{\text{osmolalité} = \Phi .\ \nu .\ \text{molalité}}$$

Des valeurs de Φ pour des solutions de différents solutés sont données dans la littérature (Robinson et Stokes, 1959).

ANNEXE II : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES

❑ Milieu de conservation des souches

Le milieu BCC (Bouillon Coeur Cervelle, Biokar) a été utilisé pour le repiquage des souches sur boite de Pétri. La composition du milieu est présentée ci-dessous :

Extrait de coeur-cervelle	17,5 g/l
Peptone pancréatique de gélatine	10 g/l
NaCl	2,5 g/l
Glucose	2 g/l

❑ Milieu de préculture

Le milieu liquide utilisé est le milieu BMCG (Basal Medium *Corynebacterium* Growth). La préparation du milieu pour les fioles d'Erlenmeyer est réalisée de la manière suivante :

Solution A (BMCG-sels)	60 ml
Solution de supplément	0,5 ml
Solution de glucose 500 g/l	1,5 ml

❑ Milieu de fermentation

La préparation du milieu BMCG pour le fermenteur est réalisée de la manière suivante :

Solution A (BMCG-sels)	1 litre
Solution de supplément	8 ml
Solution de glucose à 500 g/l	40 ml

Eléments	Concentration (g/l)	Eléments	Concentration (mg/l)
Potassium	1,7	Biotine	0,03
Sodium	2	Thiamine	2
Chlore	1	Ac. nicotinique	3
Magnésium	0,04	Ac. Panthoténique	3
Fer	0,004	Choline	3
Calcium	0,002	Myo-inositol	3
Cuivre	0,0001	Déferroxamine	3
Ammonium	2,25		
Phosphates	8,2		
Sulfates	5,2		

Tableau : Concentration finale des principaux éléments dans le milieu BMCG

ANNEXE III : PREPARATION DU MILIEU BMCG
(Liebl et *al.*, 1989 Modifié)

Préparation de la solution de supplément :

Mélanger 500 ml de solution B + 200 ml de C +100 ml de D +5 ml CaCl 1M
Toutes les solutions sont stérilisées séparément :
A, B et C 20 minutes à 120 ^{0}C
D par filtration

❑ : **Solution A (BMCG base) :**

$(NH_4)_2\ SO_4$	7 g/l
Na_2HPO_4	6 g/l
KH_2PO_4	6 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH_4Cl	1 g/l

Pour les précultures, le pH est ajusté à 7,3 avec une solution de KOH 10N.

❑ **Solution B (BMCG sels) :**

$MgSO_4, 7\ H_2O$	80 g/l
$FeSO_4, H_2O$	4 g/l
$MnSO_4, H_2O$	0,4 g/l
NaCl	5 g/l

❑ **Solution C (BMCG éléments) :**

$NaB_4O_7, 10\ H_2O$	88 mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}, 4H_2O$	40 mg/l
$ZnSO_4, 7H_2O$	10 mg/l
$CuSO_4$, anhydre	172 mg/l
$MnCl, 4H_2O$	7,2 mg/l
$FeCl_3$, anhydre	522 mg/l

❑ **Solution D (BMCG vitamines) :**

Biotine	30 mg/l
Thiamine	2 g/l
Acide Nicotinique	3 g/l
Acide Panthoténique	3 g/l
Choline HCl	3 g/l
Myo Inositol	3 g/l
Déferroxamine (Desféral™)	3 g/l

ANNEXE IV

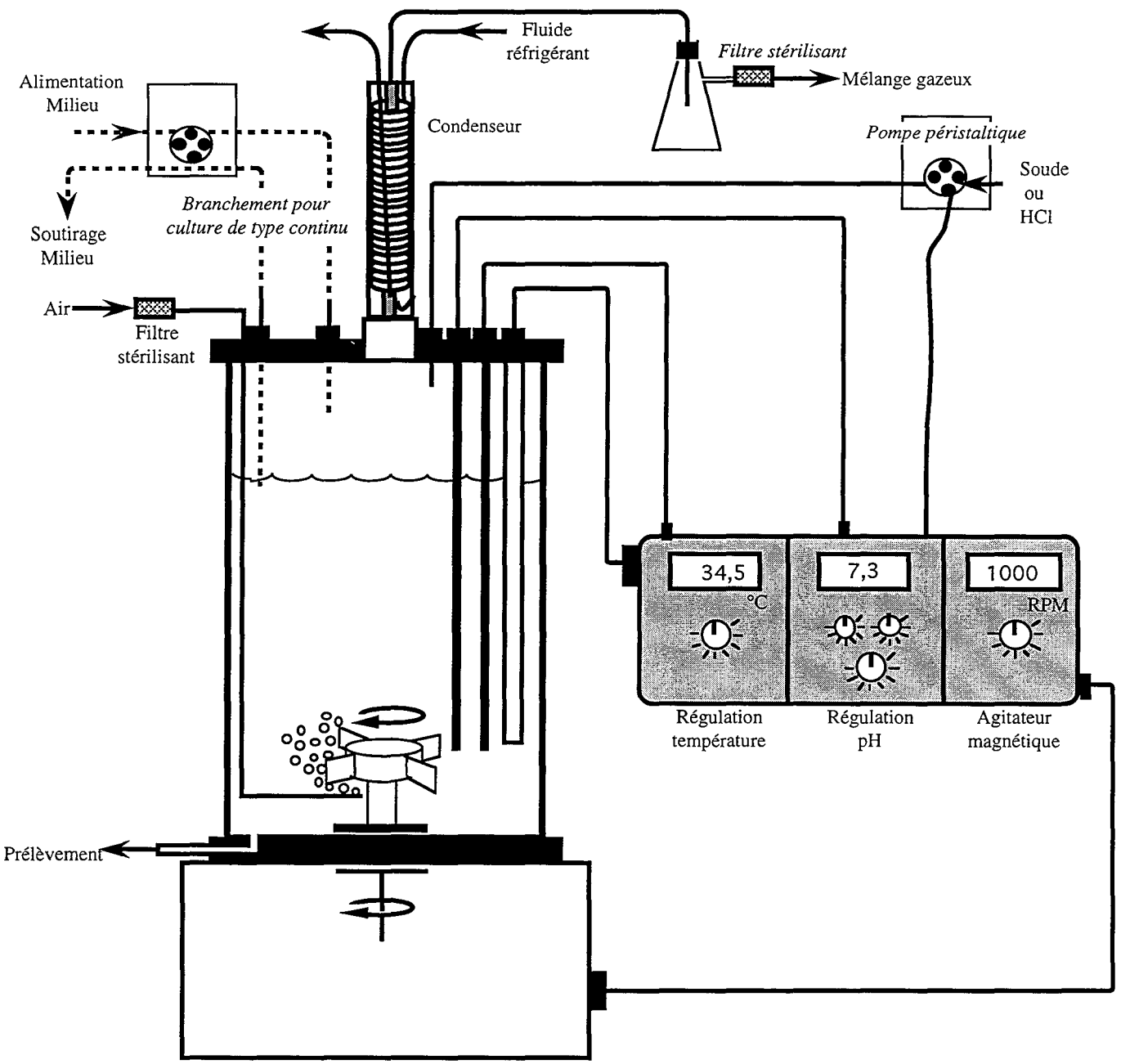


Schéma du fermenteur Sétric Génie Industriel de 2 litres avec ses annexes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alemohammad MM and Knowles CJ (1974). Osmotically induce volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol into the cell. *J. Gen. Microbiol.* **82**, 125-142.

Anand JC and Brown AD (1968). Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **52**, 205-212.

Anderson CB and Witter LD (1982). Glutamine and proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. *Appl. Env. Microbiol.* **43**, 1501-1503.

Ankri S (1991). Structure et régulation de la glutamate deshydrogénase codée par le gène gdhA chez *Corynebacterium glutamicum* . DEA, CUST, Clermond-Ferrand.

Ankri S, Serebrijski I, Reyes O and Leblon G (1995). A *proA*-independent secondary proline biosynthetic pathway in*Corynebacterium glutamicum* . Soumise à *J. Bact.* .

Bae J-H, Anderson SH and Killer KJ (1993). Identification of a high-affinity glycine betaine transport system in *Staphylococcus aureus. Appl. Env. Microbiol.* **59** (8), 2734-2736.

Bassit N, Cochet N and Lebeault JM (1993). Influence of water activity on *Streptococcus diacetylactis* metabolism. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* **40**, 399-401.

Bisson MA and Bartholomew D (1984). Osmoregulation or turgor regulation in *Chara* ? *Plant Physiol.* **74**, 252-253.

Bégué P, Egg P, Petroff D, Renaud M and Wojcik F (1990). Procédé de production de tréhalose par fermentation de microorganisme dans des conditions induisant une variation de la pression osmotique. Brevet FR 2 671 099 - A1.

Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y, Himdi-Kabbab S, Hamelin J and Blanco C (1993). Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens. J. Gen. Microbiol.* **139**, 129-136.

Berner JL (1994). Influence du potentiel hydrique du milieu de culture sur la production d'arôme par la levure *Sporidiobolus salmonicolor* : importance des mécanismes d'osmorégulation. Thèse de doctorat, ENSBANA, Dijon.

Berner JL and Gervais P (1994). A new vizualization chamber to study the transient volumetric response of yeast cells submitted to osmotic shifts. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 165-170.

Blomberg A, Larsson C and Gustafsson L (1988). Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisisae* : osmotolerance in relation to physiological state. *J. Bacteriol.* **170** (10), 4562-4568.

Boos W, Ehmann U, Bremer E, Middendorf A and Postma P (1987). Trehalase of *Escherichia coli* : mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J. Biol. Chem.* **262,** 13212-13218.

Booth IR and Higgins CF (1990). Enteric bacteria and osmotic stress : intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 239-246.

Börman-El Kholu ER, Eikmans BJ, Gutmann M and Sahm H (1993). Glutamate deshydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum* . *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 2329-2331.

Botsford JL and Lewis TA (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* : production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbiol.* **56**, 488-494.

Botsford JL, Alvarez M, Hernandez R and Nochols R (1994). Accumulation of glutamate by *Salmonella Typhimurium* in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbiol.* **60** (7), 2568-2574.

Bourrust F (1993). Etude de la croissance de *Corynebacterium melassecola* en réacteur sur deux sources de carbone.Détermination des concentrations intra- et extracellulaires - Analyse thermodynamique de la glycolyse. Thèse de doctorat, Univ. Blaise Pascal, Clermont Ferrand.

Breedveld MW, Dijkema C, Zevenhuisen LPTM and Zehnder AJB (1993). Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3157-3163.

Bröer S and Krämer R (1990). Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum* . *J. Bacteriol.* **72**, 589-591.

Brown AD and Simpson JR (1972). Water relations of sugar tolerant yeasts : the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 589-591.

Brown AD and Edgley M (1980). Osmoregulation in yeast
In : Genetic Engineering Of Osmoregulation (Rains DW, Valentine RC and Hollaender A, Eds.) Plenum Press, New York, pp 75-90.

Brown AD (1990). Microbial water stress physiology, principles and perspectives. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Cayley S, Lewis BA, Guttman HJ and Record MTJr. (1991). Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. *J. Mol. Biol.* **222**, 281-300.

Cayley S, Lewis BA and Record MTJr. (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174** (5), 1586-1595.

Clément Y, Escoffier B, Trombe MC and Lanéelle G (1984). Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum* ?. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2589-2594.

Collins MD and Cummins CS (1986). in : Bergey's manual of systematic bacteriology. (Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG., Eds), Williams and Wilkins, Baltimore,vol. 2, pp 1266-1276.

Collins MD (1987) Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 : 442-443

Csonka LN (1981). Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium. Mol. Gen. Genet.* **182**, 82-86.

Csonka LN and Baich A (1983). Proline synthesis.
in : Amino acis : biosynthesis and genetic regulation. (Herrmann K.M., Someville R.L., Eds), Addison Wesley publishing company, Reading, pp 35-49.

Csonka LN (1988). Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium* : effect of osmotic stress on synthesis, degradation and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* **170**, 2374-2378.

Csonka LN (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121-147.

Csonka LN and Hanson AD (1991). Procaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.

Curé I (1990). Etude de l'influence de la pression osmotique sur le volume cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae.* DEA, ENSBANA, Dijon.

Delaunay S (1995). Détermination d'activités enzymatiques influençant la production d'acides aminés chez *Corynebacterium glutamicum.* DEA INPL, Nancy.

Dinnbier U , Limpinsel E, Schmid R and Bakker EP (1988). Transient accumulation of potassium glutamate ant its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *E. coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**, 348-357.

Elbein (1974). *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.

Epstein W (1986). Osmoregulation by potassium transport in *E. coli* . *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 73-78.

Epstein W and Schultz SG (1965). Cation transport in *E. coli* V : regulation of cation content. *J. Gen. Physiol.* **63** (6), 545-553.

Ertan H (1992). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae* . *Arch. Microbiol.* **158**, 35-41.

Fons MB, Cami JC, Patte JC and Chippaux M (1987). Cloning in *Escherichia coli* of genes involved in the synthesis of proline and leucine in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 141-143.

Frings E, Kunte HJ and Galinski EA (1993). Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* : occurence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 25-32.

Galinski EA and Trüper HG (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95-108.

Gehring K, Hofnung M and Nikaido H (1990). Stimulation transport by osmotic stress in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 4741-4773.

Gervais P, Molin P, Grajek W and Bensoussan M (1988). Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 457-463.

Giæver HM, Styrvold OB, Kaasen I and Strøm AR (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *E.coli* . *J. Bacteriol.* **170**, 2841-2849.

Godel H, Seitz P and Verhoef M (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC-GC Int.* 5 (2) : 44-49

Gonzalez-Gonzalez R, Botsford JL and Lewis T (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* : characterization of enzymes involved in glutamate synthesis. *Can. J. Microbiol.* **36**, 469-474.

Gouesbet G, Blanco C, Hamelin J and Bernard T (1992). Osmotic adjustment in *Brevibacterium ammoniagenes* : pipecolic acid accumulation at elevated osmolalities. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 959-965.

Gurevich VB, Svetlakov AV, Popova LY and Shenderov AN (1986). Glutamate synthesis control in *Vibrio harveyi*. *Mikrobiologiya* **55**, 77-80.

Gustafsson L and Larsson C (1990). Energy budgeting in studying the effect of environmental factors on the energy metabolism of yeasts. *Thermochim. Acta* **172**, 95-104.

Hellebust JA (1976). Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**, 485-505.

Higgins CF, Cairney J, Stirling DA, Sutherland L and Booth IR (1987). Osmotic regulation of gene expression : ionic strength as an intracellular signal ? *Trends Biochem. Sciences* **12**, 339-344.

Hoischen C and Krämer R (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum* . *Arch. Microbiol.* **151**, 342-347.

Hua ST, Tsai VY, Lichens M and Noma AT (1982). Accumulation of amino acids in *Rhizobium sp.* strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Env. Microbiol.* **44**, 135-140.

Hutkins RW, Ellefson WL and Kashket ER (1987). Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactococcus acidophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* **53**, 2275-2281.

Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Blanco C and Bernard T (1995). Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens* : differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *Arch. Microbiol.* **163**, 380-386.

Jenkins DE, Chaisson SA and Matin A (1990). Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 2779-2781.

Jewell JB and Kashket ER (1991). Osmotically regulated transport of proline by *Lactococcus acidophilus* IFO 3532 *Appl. Env. Microbiol.* **57**, 2829-2833.

Kawahara Y, Ohsumi T, Yoshihara Y and Ikeda S (1989). Proline in osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2475-2479.

Killham K and Firestone MK (1984). Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces indigenous* to saline soils. *Appl. Env. Microbiol.* **47**, 301-306.

Klein W, Ehmann U and Boos W (1991). The repression of trehalose transport and metabolism in *E. coli* by high osmolarity is mediated by trehalose-6-phosphate phosphatase. *Res. Microbiol.* **142**, 359-371.

Koch AL (1961). Some calculations on the turbidity of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 429-441.

Koch AL (1984). Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J. Bacteriol.* **159** (3), 919-924.

Koch AL and Pinette MFS (1987). Nephelometric determination of turgor pressure in growing Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **169** (8), 3654-3663.

Larroche C, Besson I, Dussap CG, Bourrust F and Gros JB (1993). Characterization of water distribution in cell pellets using nonlabeled sodium thiosulfate as an interstitial space marker. *Biotechnol. Prog.* **9**, 214-217.

Larsen PI, Sydnes LK, Lanfald B and Strøm AR (1987). Osmoregulation in *E. coli* by accumulation of organic osmolytes : betaines, glutamic acid and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147**, 1-7.

Larsson C, Morales C, Gustafsson L and Adler L (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* **172** (4), 1769-1774.

Lehninger AL (1985). Principes de Biochimie. Flammarion Médecine-Sciences, Eds.

Leisinger T (1987). Biosynthesis of proline. In : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. pp 345-351 (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, E. Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C..

Le Rudulier D and Bouillard L (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl. Env. Microbiol.* **46**, 152-159.

Le Rudulier D, StrØm AR, Dandekar AM, Smith LT and Valentine RC (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**, 1064-1068.

Liebl W, Klamer R and Schleifer KH (1989). Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 205-210.

Liebl W, Ehrmann M, Ludwig W and Schleifer KH (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412 and *Corynebacterium lilium* DSM 20137 to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Int. *J. Syst. Bacteriol.* **41**, 255-260.

Lucht JM and Bremer E (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments : osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 3-20.

Mackay MA, Norton RS and Borowitzka LJ (1984). Organic osmoregulatory solutes in Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2177-2191.

MacLaggan D, Logan T M, Lynn DG and Epstein W (1990). Involvement of γ-glutamyl peptides in osmoadaptation of *E. coli* . *J. Bacteriol.* **172**, 3631-3636.

Makemson JC, and Hastings JW (1979). Glutamate functions in osmoregulation in a marine bacterium. *Appl. Env. Microbiol.* **38**, 178-180.

Marquis RE and Carstensen EL (1973). Electric conductivity and internal osmolality of intact bacterial cells. *J. Bacteriol.* **113** (2), 1198-1206.

Matts TC and Knowles CJ (1971). Stopped-flow studies of salt-induced turbidity changes of *Escherichia coli* . *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 583-587.

May G, Faatz E, Villarejo M and Bremer E (1986). Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 225-233.

Measures JC (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398-400.

Meers JL, Tempest DW and Brown CM (1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 187-194.

Meury J, Robin A and Monnier-Champeix P (1985). Turgor-controlled K^+ fluxes and their pathways in *E. coli* . Eur. *J. Biochem.* **151**, 613-619.

Miguelez E and Gilmour DJ (1994). Regulation of cell volume in the salt tolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 363-365.

Molenaar D, Hagting A, Alkema H, Driessen AJM and Konings WN (1993). Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **175** (17), 5438-5444.

Munns R, Greenway H, Setter TL and Kuo J (1983). Turgor pressure, volumetric elastic modulus, osmotic volume and ultrastructure of *Chlorella emersonii* grown at high and low external NaCl. *J. Exp. Bot.* **34** (139), 144-155.

Munro GF, Hercules K, Morgan J and Sauerbier W (1972). Dependence of the putrescine content of *E. coli* on the osmotic strengh of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**, 1272-1280.

Nagata S, Ogawa Y and Mimura H (1991). Internal cation concentrations of the halotolerant bacterium *Brevibacterium sp.* in response to the concentrations and species of external salts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**, 403-414.

Nagata S, Adachi K, Shirai K and Sano H (1995). ^{23}Na NMR spectroscopy of free Na^+ in the halotolerant bacterium *Brevibacterium sp.* and *Escherichia coli* . *Microbiol.* **140**, 729-736.

Nishi T and Yagi T (1995). Efflux of sodium ions by a Na^+/H^+-antiporter during salt stress in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**, 87-97.

Nobel PS (1968). The Boyle Van't Hoff relation. *J. Theoret. Biol.* **23**, 375-379.

Nunes OC, Manaia CM, Da Costa MS and Santos H (1995). Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and *"Thermus thermophilus"*. *Appl. Env. Microbiol.* **61** (6), 2351-2357.

Oren A (1986). Intracellular salt concentrations of the anaerobic eubacteria *Haloanaerobium halobius*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 4-9.

Øyaas K, Ellingsen TE, Dyrset N and Levine DW (1994). Utilization of osmoprotective compounds by hybridoma cells exposed to hyperosmotic stress. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 77-89.

Patchett RA, Kelly AF and Kroll RG (1992). Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Env. Microbiol.* **58** (12), 3959-3963.

Pequignot C (1995). Caractérisation de la croissance de *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 en cuve agitée aérée sur différents milieux de culture - Détermination des flux métaboliques. Thèse de doctorat, Univ. Blaise Pascal, Clermont Ferrand.

Pourkomailian B and Booth IR (1992). Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus* : evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2515-2518.

Pourkomailian B and Booth IR (1994). Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus* : evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. *Microbiol.* **140**, 3131-3138.

Reed RH (1984a). Transient breakdown in the selective permeability of the plasma membrane of *Chlorella emersonii* in response to hyperosmotic shock : implication for cell water relations and osmotic adjustment. *J. Membr. Biol.* **82**, 82-83.

Reed RH, Richardson DL, Warr SRC and Stewart WDP (1984b). Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1-4.

Reed RH, Richardson DL and Stewart WDP (1985). Na^+ uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for transient changes in plasmalemma Na^+ permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 347-355.

Rengpipat S, Lowe SE and Zeikus JG (1988). Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoethylicus*. *J. Bacteriol.* **170** (7), 3065-3071.

Richey B, Cayley DS, Mossing MC, Kolka C, Anderson CF, Farrar TC and Record MTJr. (1987). Variability in the intracellular ionic environment of *E. coli* , differences between *in vitro* and *in* vivo effects of ion concentration on protein-DNA interactions and gene expression. *J. Biol. Chem.* **262**, 7157-7164.

Robinson RA and Stokes RH (1959). Electrolyte solutions. Butterworths scientific publications, London.

Rod ML, Alam KY, Cunningham PR and Clark DP (1988). Accumulation of trehalose by *E. coli* K-12 at high osmotic pressure depends on the presence of amber suppressors. *J. Bacteriol.* **170**, 3601-3610.

Rosenfeld SA and Brenchley JE (1983). Regulation of glutamate and glutamine synthesis.
in : Amino acids : biosynthesis and genetic regulation. (Herrmann, K.M., Someville, R.L. Eds.), Addison Wesley publishing company, Reading, pp 1-15.

Roth WG, Porter SE, Leckie MP, Porter BE and Dietzler DN (1985). Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm.* **126** (1), 442-449.

Saez MJ and Lagunas R (1976). Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol. Cell. Biochem.* **13** (2), 73-78.

Scott WJ (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* **7**, 83-127.

Serebrijski I, Wojcik F, Reyes O and Leblon G (1995). *pro* A mutants : Multicopy suppression by *asd* gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous *pro* A. *J. Bact.* In press.

Shechter E (1984). Membranes biologiques : structure, transports, bioénergétique. Masson (Eds), Paris.

Shiio I, Narvi K, Yahaba N and Takahashi M (1962). Free intracellular amino acid of a glutamate forming bacterium, *Brevibacterium flavum* n° 2247. *J. Biochem.* **51**, 109-111.

Shiio I and Ozaki H (1970). Regulation of NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate producing bacterium. *J. Biochem.* **68**, 633-647.

Shiio I and Ujigawa K (1978). Enzyme of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum.. J. Biochem.* **84**, 395-405.

Smith LT and Smith GM (1989). An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti. J. Bacteriol.* **171**, 4714-4717.

Stimeling KW, Graham JE, Kaenjak A and Wilkinson BJ (1994). Evidence for feedback (trans) regulation of, and two systems for, glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus. Microbiol.* **140**, 3139-3144.

Styrvold OB and StrØm AR (1991). Synthesis, accumulation and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains : influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* **173** (3), 1187-1192.

Sugiura M andKisumi M (1985). Osmoregulation in a proline-producing strain of *Serratia marscecens. J. Gen. Microbiol.* **131**, 2515-2520.

Sung HC, Tachiki T and Tochikura T (1984). Production and preparation of glutamate synthase in *Brevibacterium flavum* . *J. Ferm. Technol.* **63** (1), 371-376.

Sutherland L, Cairney J, Elmore MJ, Booth IR and Higgins CF (1986). Osmotic regulation of transcription : induction of the ProU betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.* **168**, 805-814.

Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wroblewski H, Blanco C and Bernard T (1994). Osmoadaptation in Rhizobia : ectoine-induced salt tolerance.
J. Bacteriol. **176** (17), 5210-5217.

Tempest DW, Meers JL and Brown CM (1970). Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 171-185.

Theobald U, Mailinger W, Reuss M and Rizzi M (1993). *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal. Biochem.* **64**, 171-185.

Troller JA (1980). Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technol.* 76-83.

Troller JA (1987). Adaptation and growth of microorganisms in environments with reduced water activity.
in : Water activity : Theory and application to food. (Rockland L.B., Beuchat L.R., Eds) Dekker Inc., New York and Basel, pp 101-117.

Tsapis and Kepes (1977). Transient breakdown of the permeability barrier of the membrane of *Escherichia coli* upon hypoosmotic shock. *Biochim. Biophys. Acta.* **469**, 1-12.

Unemoto T and Hayashi M (1979). Regulation of internal solute concentrations of marine *Vibrio alginolyticus* in response to external NaCl concentration. *Can. J. Microbiol.* **25**, 922-926.

Walsby AE (1986). The pressure relationships of halophilic and non-halophilic prokaryotic cells determined by using gas vacuoles as pressure probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 45-49.

Walter RP, Morris WJG and Kell DB (1987). The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum. J. Gen. Microbiol.* **133**, 259-266.

Weibel KE, Mor JR and Fiechter A (1974). Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal. Biochem.* **58**, 208-216.

Welsh DT Reed RH and Herbert RA (1991). The role of trehalose in the osmoadaptation of *E. coli* NCIB 9484 : interaction of trehalose, K^+ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 745-750.

Whatmore AM and Reed RH (1990a). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis* : a possible role for K^+ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2521-2526.

Whatmore AM, Chudek JA and Reed RH (1990b). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527-2535.

Wojcik F (1992). Réponse osmotique chez *Corynebacterium glutamicum* : aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires. Thèse de doctorat, Orsay, Paris.

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD and Somero GN (1982). Living with water stress : evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

Yoshinaga F, Tsuchida T and Okumura S (1975). Purification and properties of glutamate kinases required for L-proline and L-glutamine biosynthesis in *Brevibacterium flavum. Agric. Biol. Chem.* **39**, 1269-1273.

Zimmermann U (1978). Physics of turgor and osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, 121-148.

POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur GERVAIS Patrick, Professeur, ENSBANA Dijon,
Monsieur LEBLON Gérard, Professeur, Institut de Génétique et Microbiologie d'Orsay.
Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur GUILLOUET Stéphane

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :
"Etude cinétique et physiologique de corynebacterium glutamicum sous stress osmotiques".

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le,**1° Février 1996**
Le Président de l'I.N.P.L.,
M. LUCIUS

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

TEL. 33/83.59.59.59
FAX. 33/83.59.59.55

Résumé : L'objectif général de ce travail est l'étude du comportement cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* en croissance dans des conditions de stress osmotique. Cette étude comporte quatre parties au cours desquelles les cinétiques de croissance et d'accumulation des métabolites intracellulaires sont présentées pour différents modes et conditions de culture. Nous avons mis en évidence les évènements physiologiques successifs à un choc hyperosmotique lors de cultures discontinues et continues. Ainsi l'élévation de la pression osmotique externe entraîne une diminution de la vitesse spécifique de la croissance et du rendement de croissance sur glucose. A la suite du choc osmotique, une accumulation transitoire d'ions sodium ou potassium a été observée suivant l'osmolyte dépresseur utilisé. Par la suite, *Corynebacterium glutamicum* accumule de manière importante de la proline. Nous avons montré que le contenu cellulaire en proline varie proportionnellement avec l'osmolarité du milieu et avec la vitesse spécifique de croissance. Une accumulation intracellulaire de tréhalose a également été observée en réponse au choc osmotique lors des cultures continues. Cette synthèse de tréhalose est augmentée lorsque la voie de biosynthèse de la proline est affectée, par exemple, lors de cultures continues sous limitation ammonium et potassium ou lors de cultures discontinues d'une souche génétiquement modifiée bradytrophe pour la proline.

L'accumulation de ces différents métabolites entraîne une augmentation de la pression osmotique intracellulaire proportionnelle à l'osmolarité du milieu. Par ailleurs, nous avons observé que la pression de turgescence (différence entre la pression osmotique intracellulaire et extracellulaire) est liée à la vitesse spécifique de croissance et non pas à l'osmolarité du milieu. Ces résultats suggèrent que la pression de turgescence est la force motrice de la croissance bactérienne sous stress osmotique. Enfin, l'établissement de bilans osmotiques a permis de vérifier que les principaux intervenants dans la réponse osmotique ont été identifiés.

Abstract : The aim of this work is to study kinetics and physiology of *Corynebacterium glutamicum* grown under osmotic stress. This work is composed of four parts which investigate the growth and intracellular metabolites accumulation kinetics for both batch and continuous operation under different culture conditions. The physiological events following an osmotic upshock were observed in batch and continuous cultures. Thus, an increase of external osmolality led to a decrease of the specific growth rate and of the glucose-to-biomass conversion yield. Upon the osmotic upshock a transient accumulation of sodium ou potassium ions were observed depending on the depressor osmolyte. Afterwards proline was strongly accumulated. The internal proline content was found to increase proportionally to the medium osmolality and to the specific growth rate. An intracellular accumulation of trehalose was also observed in continuous cultures upon a saline osmotic upshock. The synthesis of trehalose was found higher when the proline biosynthetic pathway was affected, for instance, during continuous culture under ammonium and potassium limitation or during batch culture of bradytrophic strain for proline.

The accumulation of metabolites led to an increase of intracellular osmotic pressure proportionate to the medium osmolality. Moreover, turgor (difference between internal and external osmolality) was found to be correlated with the specific growth rate but not with the medium osmolality. These results suggest that turgor is the driving force of the bacterial growth under osmotic stress. Finally, osmotic balances allowed to verify that the main osmoprotectants were identified.