



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Agroalimentaires
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

Thèse
présentée à l'INPL

M 4236 KUEHM

par

Nicolas **KUEHM**
Ingénieur ESBS

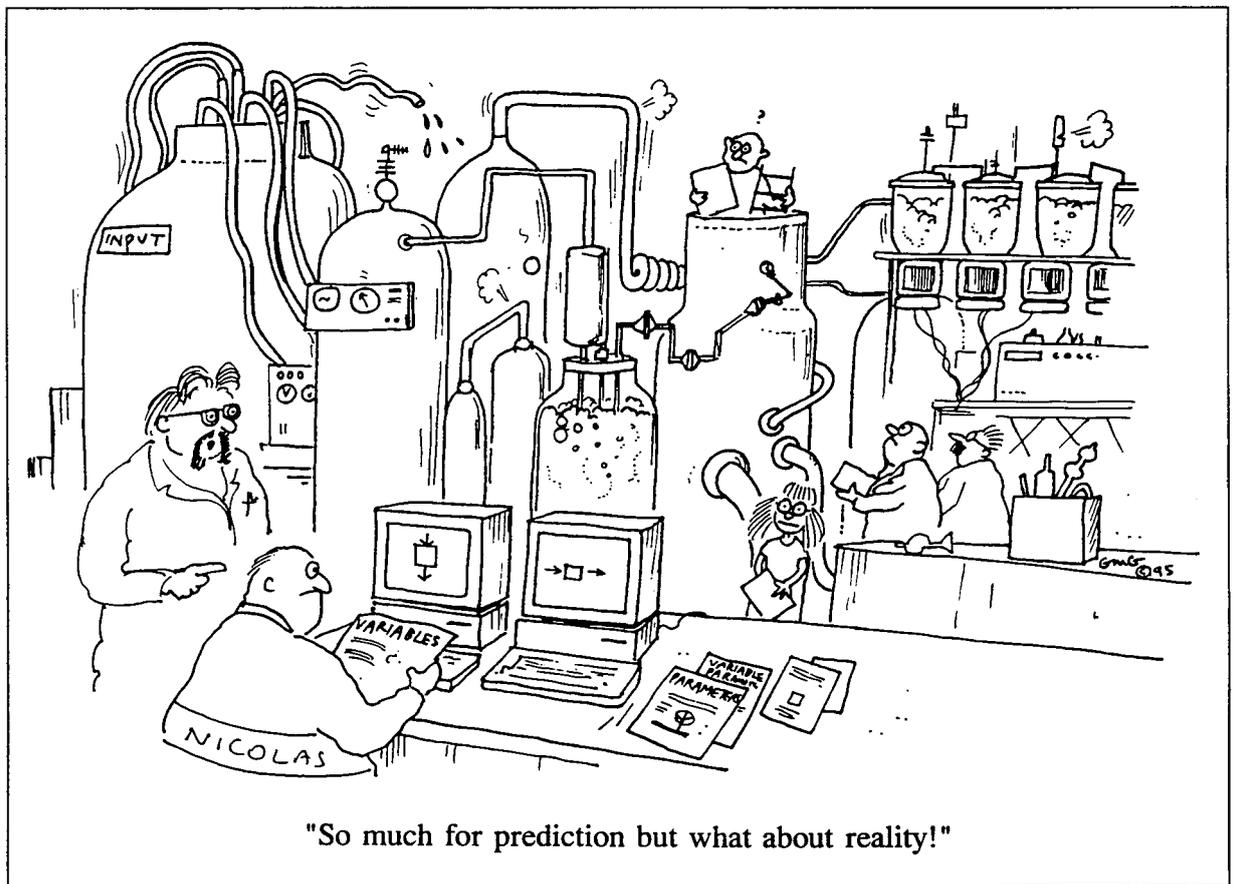
en vue d'obtenir le grade de

*Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialisation : Biotechnologie et Industries Alimentaires*

**MODELISATION CINETIQUE ET METABOLIQUE
DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* :
CROISSANCE SOUS STRESS OSMOTIQUE
ET PRODUCTION DE GLUTAMATE**

soutenue publiquement le 26 avril 1996 devant la commission d'examen

Président :	Mr	P. GERMAIN	Professeur, ENSAIA, Nancy
Rapporteurs :	MM	C.G. DUSSAP N.D. LINDLEY	Professeur, Université de Clermond-Ferrand II Chargé de Recherche CNRS, INSA Toulouse
Examineurs :	MM	J.M. ENGASSER C. FONTEIX J.L. SIMON	Professeur, ENSAIA, Nancy Maître de Conférence, ENSAIA, Nancy Rhône-Poulenc, Melle.



Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de Nancy, au sein du groupe “Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires” (GPBA), dans les locaux de l’Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Agro-alimentaires (ENSAIA).

J’exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Daniel Tondeur, Directeur du LSGC, pour m’avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ma reconnaissance va également vers Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au CNRS et responsable du GPBA.

Je remercie plus particulièrement Monsieur le Professeur Jean-Marc Engasser pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et pour ses précieux conseils dans mes recherches et la rédaction de ce document.

Mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Pierre Germain pour avoir accepté de présider le jury de thèse, ainsi qu’à Monsieur le Professeur Claude-Gilles Dussap et à Monsieur Nicholas Lindley, Chargé de Recherche au CNRS, pour l’honneur qu’ils m’ont fait en acceptant d’être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également Monsieur Jean-Luc Simon, Responsable de Recherche chez Rhône-Poulenc, d’abord pour sa thèse qui est en partie à l’origine de ces travaux, et ensuite pour avoir accepté de se joindre au jury.

Mes remerciements vont encore à Monsieur Christian Fonteix, Maître de Conférence à l’ENSAIA, pour ses conseils et ses discussions généreuses et pour avoir accepté de prendre part au jury.

Je tiens à adresser des remerciements particuliers à Madame Evelyne Ronat-Heit, Ingénieur Systèmes et Réseaux du GPBA, pour son assistance technique et son amitié au cours de ces trois années de thèse. Je remercie également l’ensemble des permanents du groupe pour leur sympathie et pour les conseils qu’ils ont su me dispenser pendant mes travaux. Un merci tout particulier à Christelle pour sa joie de vivre et son aide dans l’élaboration de ce document.

Enfin, j’exprime ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à la “Coryné Team”, Stéphane, Florence et le dernier rapporté, Stéphane, pour leur camaraderie, pour leurs manips, pour leurs conseils et leur aide dans mes manips, et pour tous les bons moments passés ensemble. Un merci particulier à Aurélio pour sa sympathie et son aide précieuse dans mes travaux informatiques. Merci encore à tous mes autres collègues thésards pour la sympathie de ces années communes.

ABREVIATIONS

● Cultures microbiennes :

X	concentration en biomasse	g/l
S	" en substrat	g/l
P	" en produit extracellulaire	g/l
P _i	niveau d'un produit intracellulaire	μmol/gMS
PO	pression osmotique du milieu de culture	Osm
V	volume de milieu du réacteur	l
V _M	volume molaire des gaz	l/mole
Q _{air}	débit d'aération	l/h
QR	quotient respiratoire	mole CO ₂ / mole O ₂
%CO ₂	pourcentage molaire de CO ₂ dans les gaz de sortie	
%O ₂	" " d'O ₂ " " "	
Q _a	débit d'alimentation	l/h
S _a	concentration en substrat dans l'alimentation	g/l
r'''	vitesse de production volumique	mol/l.h ou g/l.h
μ	vitesse spécifique de croissance	h ⁻¹
q _S	vitesse spécifique de consommation du substrat	mol/l.h ou g/l.h
q _P	vitesse spécifique de production d'un produit extracellulaire	g/l.h
Y _{a/b}	coefficient instantané de conversion du composé b en a ou de synthèse de a par rapport à b	g/g
R _{a/b}	coefficient moyen (cumulé) de conversion du composé b en a ou de synthèse de a par rapport à b	g/g
\tilde{P}	pseudo accumulation intracellulaire du produit P	μmol/gMS
\tilde{r}'''	vitesse de pseudo excrétion volumique	μmol/l.h
RC	recouvrement carboné	%

● **procédure de Détermination du Domaine de Validité :**

<i>exposant :</i>	(concerne les niveaux des variables)
f, m, e	faible, moyen, élevé
<i>indice :</i>	
i	expérience du plan de référence
j	variable d'état
k	temps d'échantillonnage
m	mesure
s	simulation
r_i	degré de réalisation de l'expérience statique i
x_{jk}	mesure de la variable d'état j au temps t_k
μ_{mjk}	fonction d'appartenance associée à la mesure de la variable d'état j au temps t_k
μ_{sjk}	fonction d'appartenance associée à la simulation de la variable d'état j au temps t_k
μ_{Lij}	fonction d'appartenance associée au niveau L de la variable d'état j dans l'expérience de référence i
ε	erreur estimée

● **Procédure Métaflux :**

PPP	voie des pentoses phosphates
PK	voie "Pyruvate Kinase + PTS"
PC	voie anaplérotique de la Phosphoénolpyruvate Carboxylase
α_{PPP}	part de voie des pentoses phosphates par rapport au flux arrivant au G6P
α_{PK}	part de voie "PK+PTS" par rapport au flux arrivant au PEP
α_{PC}	part de voie "PC" par rapport au flux arrivant au PEP
%PPP	pourcentage de voie des pentoses (voir définition dans le texte)
%PK	pourcentage de la voie "PK+PTS"
%PC	pourcentage de la voie anaplérotique PC
γ	degré de réduction d'un composé organique
η	efficacité thermodynamique d'une réaction biochimique

SOMMAIRE GENERAL

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	5
I.1. Métabolisme général des Corynébactéries sur glucose	5
I.2. La biomasse : composition et biosynthèse	32
I.3. Analyse métabolique.....	38
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	69
Chapitre III : Cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> sur glucose...89	89
III.1. Cinétique de croissance en culture discontinue	89
III.2. Production de glutamate et études CHON en cultures semi-continues.....	105
III.3. Conclusions.....	112
Chapitre IV : Modélisation cinétique de la croissance en cultures discontinues sous stress osmotique	114
IV.1. Modélisation cinétique de la croissance sous stress osmotique	114
IV.2. La procédure de Détermination du Domaine de Validité (DDV)	120
IV.3. Conclusions.....	132
Chapitre V : Méthodologie “Métaflux”	133
V.1. La méthodologie “Métaflux” (publication)	133
V.2. Influence de la biomasse	153
V.3. Procédures complémentaires.....	157
V.4. Comparaison Métaflux - Bionet	165
Chapitre VI : Analyse métabolique des cultures microbiennes	169
VI.1. Evaluation des flux métaboliques en croissance.....	169
VI.2. Analyse métabolique en production de glutamate (publication).....	181
VI.3. Discussion	191
Conclusions	194
Annexes
1. La procédure de Détermination du Domaine de Validité (publication).....
2. Récapitulatif des réactions biochimiques contenues dans Métaflux
3. Récapitulatif de l’analyse des voies individuelles de biosynthèse des métabolites intégrés dans Métaflux
4. Procédure de calcul pour la construction automatique des cartes individuelles
Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Les **Corynébactéries** sont des bactéries naturellement productrices d'acides aminés tels que la lysine ou le glutamate. Le GDR Orsan-CNRS, initié en 1992 et reconduit en 1995, porte sur l'étude de l'influence de l'osmolarité sur la croissance et la production de glutamate chez *Corynebacterium glutamicum*. Au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de Nancy, trois thèses se sont déroulées dans cet objectif. Tout d'abord Guillouet (1996) a mené des études poussées mettant en évidence le mécanisme de réaction de la souche en croissance vis à vis d'une augmentation de l'osmolarité du milieu de culture. Le sujet de la seconde thèse porte sur l'étude du procédé de production de glutamate pour caractériser les perturbations physiologiques engendrées par l'ajout des surfactants dans le milieu de culture (Debay, thèse en cours). En marge de ces études cinétiques, nous avons décidé de nous pencher sur la **modélisation cinétique et métabolique** afin de structurer la connaissance, de mieux comprendre la répartition du flux carboné et de tenter de localiser les étranglements métaboliques.

Depuis la découverte des microorganismes par Louis Pasteur, les sciences du vivant n'ont cessé de se développer grâce au génie humain et aux progrès de la technologie. Ces dernières années ont surtout été marquées par la biologie moléculaire, qui autorise la modification des caractéristiques intrinsèques des cellules. Ce fabuleux outil de recherche s'est rapidement imposé comme la solution à tous les problèmes d'étude fondamentale, de recherche appliquée, mais également de l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire. Le génie génétique devient aussi la technique moderne d'amélioration des souches pour la production industrielle de vaccins, d'antibiotiques, d'additifs alimentaires... Malgré un certain nombre de succès, toutes les promesses n'ont pas été tenues et l'engouement initial a fait place au septiscisme devant le nombre relativement restreint d'applications industrielles. La cellule ne peut en effet pas être rabaissée à une séquence d'ADN modifiable à volonté. Elle possède une structure physique (engendrant des problèmes d'excrétion par exemple) et présente des mécanismes de défense généralement rudimentaires mais efficaces (systèmes de restriction de l'ADN, protéases...), de même qu'un métabolisme complexe composé de nombreuses voies de synthèse.

Au cours de ces dix dernières années a été développé le concept d'**Ingénierie Métabolique** dont Bailey (1991) puis Stephanopoulos et Sinskey (1993) décrivent les objectifs,

les méthodes et les perspectives. Cette approche propose une nouvelle façon d'envisager la cellule pour l'amélioration des souches et des procédés, en considérant le flux de matière et d'énergie dans l'**ensemble du métabolisme** microbien afin d'en comprendre les mécanismes de répartition et de régulation. L'ingénierie métabolique repose sur plusieurs années de recherches "classiques", suggère une démarche et des outils d'investigation permettant de cibler les étapes biochimiques limitantes et permet d'envisager les modifications à effectuer pour réorienter le métabolisme vers un objectif particulier (augmenter la production d'un métabolite d'intérêt ou éviter la production des produits compétitifs par exemple). L'élément central de cette approche est donc la notion de **réseau métabolique**, qui souligne l'importance de ne plus considérer le métabolisme sous la forme de réactions enzymatiques isolées de leur contexte cellulaire. Pour atteindre son objectif, l'ingénierie métabolique requiert plusieurs étapes :

- la meilleure connaissance possible du réseau biochimique (voies métaboliques, stœchiométries des réactions, régulations...),
- l'identification précise des points de jonction du métabolisme, appelés **nœuds du réseau**,
- l'analyse de l'importance stratégique et des régulations de chacun de ces nœuds,
- la localisation des **étapes limitantes** du métabolisme,
- enfin, la détermination de la nature des modifications à envisager pour lever ces limitations : inhibition ou activation d'une enzyme, amplification ou délétion d'un gène, dérégulation ou encore une combinaison de plusieurs de ces éléments...

Les moyens expérimentaux ou théoriques dont elle dispose ne sont généralement pas nouveaux, mais trouvent un regain d'intérêt dans cette démarche globale vers l'amélioration des souches. Il s'agit bien entendu de toutes les études biochimiques et enzymatiques, des traceurs radioactifs et de la RMN, de la biologie moléculaire, mais aussi des études théoriques telles que la théorie du contrôle métabolique (Kacser et Burns, 1973), la notion de rigidité du métabolisme (Stephanopoulos et Vallino, 1991), la modélisation métabolique qualitative (par exemples Metabolic Pathways Synthesis (MPS) de Bailey, 1986 ; Métalgen.db de Rouxel, 1992) et quantitative (Bionet de Vallino et Stephanopoulos, 1990)... Cependant, aucune de ces techniques et méthodes n'est satisfaisante en elle même : les études enzymatiques ont permis d'amasser une quantité considérable d'informations, mais ces études, souvent menées *in vitro*, fournissent des résultats divers et parfois même contradictoires ; la RMN indique une répartition du flux, mais elle est difficile à mettre en œuvre et reste dépendante de certaines hypothèses sur le métabolisme ; la théorie du contrôle métabolique est une technique puissante mais complexe et qui requiert de nombreuses connaissances biochimiques et enzymatiques ; les modèles permettent l'analyse qualitative et quantitative du métabolisme, mais reposent également sur de nombreuses hypothèses. Le modèle métabolique reste tout de même un outil de choix puisqu'il est actuellement la seule méthode d'évaluation quantitative des flux dans un réseau biochimique complexe.

Plusieurs modèles ont déjà été proposés dans la littérature, de structures relativement simples (par exemple Coccagn, 1992), ou plus complexe (Vallino et Stephanopoulos, 1990 ; Péquignot, 1995).

Dans ce travail de recherche, nous avons développé un modèle métabolique original basé sur un concept de voies métaboliques indépendantes. Ce modèle est orienté vers l'étude du métabolisme des Corynébactéries s'inscrivant dans le cadre d'un axe de recherche plus large sur le comportement physiologique et cinétique des Corynébactéries en croissance et en production de glutamate. Nous avons plus particulièrement étudié les points suivants :

- quel algorithme doit-on développer pour notre méthode d'évaluation de flux ?
- quelles sont les hypothèses nécessaires ?
- quels sont les facteurs influençant le calcul des flux et comment doivent-ils être pris en compte ?
- quelles sont les procédures à développer pour rendre l'outil efficace et convivial ?
- quelles informations peut-on tirer de notre méthode ?
- quelles sont les limites et les possibilités de notre méthode comparée aux autres, et en particulier à Bionet ?

Pour répondre à ces différentes questions, nous organiserons l'exposé de nos travaux de la manière suivante :

■ **chapitre 1** : une synthèse bibliographique qui a pour but de positionner le problème de l'analyse et de la modélisation du métabolisme. Cette synthèse sera subdivisée en 3 parties : une présentation du métabolisme des Corynébactéries sur glucose, une présentation du contexte et des méthodes de l'analyse métabolique et enfin une présentation de Bionet, le logiciel qui fait actuellement figure de référence dans ce domaine.

■ **chapitre 2** : un matériel et méthodes, que nous avons voulu présenter sous forme de "fiches", concises et faciles d'accès lors de la recherche d'informations.

■ **chapitre 3** : une présentation des études cinétiques réalisées sur la souche *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 17965) en culture discontinue à différentes pressions osmotiques et en cultures semi-continues.

■ **chapitre 4** : une modélisation cinétique macroscopique (par opposition à intracellulaire ou métabolique) de l'influence de l'osmolarité sur la croissance. Nous présenterons également un outil original de détermination de la validité du modèle.

■ **chapitre 5** : un exposé de notre méthode d'évaluation des flux métaboliques, baptisée **Métaflux**. Cette partie sera présentée sous la forme d'une publication. Nous présenterons également des procédures "annexes" à Métaflux facilitant sa mise en œuvre et son exploitation.

Enfin, nous comparerons les résultats obtenus par Métaflux et par Bionet à partir d'un exemple théorique simple.

■ **chapitre 6** : une application de Métaflux à l'analyse métabolique de *Corynebacterium glutamicum*. En particulier, nous présenterons (sous la forme d'une publication) l'analyse des flux lors d'une culture semi-continue pour la production de glutamate.

Tout au long de l'exposé, nous nous efforcerons également d'étudier l'influence de la biomasse sur les méthodes de modélisation métabolique et en particulier sur Métaflux, puisque sa synthèse consomme la majeure partie du substrat carboné et mobilise l'ensemble du métabolisme.

Chapitre 1

*Synthèse
Bibliographique*

SOMMAIRE du CHAPITRE I

Métabolisme général des Corynébactéries sur glucose. 5

I.1. Les voies du métabolisme central.....	5
I.1.1. Entrée du glucose dans la cellule.	6
I.1.2. La Glycolyse.....	8
I.1.2.1. La PhosphoFructo-Kinase (PFK) et la Fructose BisPhosphatase (FBP).....	8
I.1.2.2. Pyruvate kinase (PK)	9
I.1.3. La voie des Pentoses Phosphates (PPP).....	10
I.1.3.1. Structure et fonctions biochimiques	10
I.1.3.2. Répartition du flux carboné entre EMP et PPP.....	11
I.1.4. Le complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDH).....	14
I.1.5. Le Cycle de Krebs (CK).....	14
I.1.5.1. Structure et fonctions biochimiques.....	14
I.1.5.2. La Citrate Synthase (CS).	15
I.1.5.3. L'Aconitate Hydratase (AK).	15
I.1.5.4. Le complexe Isocitrate Déshydrogénase (ICDH).	15
I.1.5.5. L' α -Cétoglutarate Déshydrogénase (α -KGDH).....	16
I.1.5.6. Autres réactions du Cycle de Krebs.	16
I.1.6. Les Voies Anapérotiques.	16
I.1.6.1. Le cycle du glyoxylate (CG).	17
a. Biochimie.....	17
b. Répartition Cycle de Krebs et Cycle Glyoxylique.....	18
I.1.6.2. La PEP Carboxylase (PC).....	18
I.1.6.3. Autres voies anapérotiques.	19
a. La PEP Carboxykinase (PEPCK).....	20
b. L'Enzyme Malique (EM).	21
c. L'Oxalo Acétate Décarboxylase (OADC).....	21
d. La Pyruvate Carboxylase (PyrC).	21
e. La PEP Carboxytransphosphorylase et la PEP Synthétase.....	22
I.1.6.4. Répartition du flux carboné au PEP.....	23
I.2. Les voies de biosynthèse des métabolites primaires.....	24
I.2.1. Lactate, Acétate et Succinate.	24
I.2.2. Tréhalose.....	24
I.2.3. Glutamate et Proline.....	24
I.2.3.1. Glutamate.....	24
I.2.3.2. Proline	27
I.2.4. Aspartate et Lysine.....	27
I.2.4.1. Aspartate.....	27
I.2.4.2. Lysine.....	27
I.2.5. Autres acides aminés.....	28
I.2.5.1. Thréonine et Isoleucine.	28
I.2.5.2. Alanine, Valine et Leucine.....	28

I.2.6. Sécrétion des acides aminés.....	29
I.2.6.1. Lysine.....	29
I.2.6.2. Glutamate.....	29
I.2.6.3. Autres.....	30
I.3. Les cycles futiles.....	30

La biomasse : composition et biosynthèse.....	32
--	-----------

I.4. La composition cellulaire.....	32
I.4.1. Structure de l'enveloppe cellulaire	33
I.4.2. Composition des protéines.....	33
I.5. Modélisation de la synthèse de la biomasse	34
I.5.1. Méthode simplifiée (méthode "Ingraham").....	34
I.5.2. Méthode complète.....	36

Analyse métabolique.....	38
---------------------------------	-----------

I.6. Etude qualitative du métabolisme cellulaire.....	38
I.7. Etude quantitative des flux métaboliques.....	39
I.7.1. La méthode des Bilans Matière	39
I.7.1.1. Principe	40
I.7.1.2. Validité de l'hypothèse d'état pseudo-stationnaire.....	41
I.7.1.3. Contraintes de la méthode des Bilans Matière.....	41
I.7.2. Notion de flux métabolique	42
I.7.2.1. Flux réactionnel et activité enzymatique.....	42
I.7.2.2. Flux métabolique et activité enzymatique	43
I.7.3. Traceurs radioactifs et RMN	44
I.7.4. Mesure de cinétiques enzymatiques	45
I.7.4.1. Cinétique enzymatique pour une réaction.....	45
I.7.4.2. Réseau de cinétiques enzymatiques.....	46
I.7.4.3. Cinétique enzymatique et logique floue	47
I.7.5. Evaluation des flux par les bilans matière	47
I.7.5.1. Exploitation non matricielle des bilans matière.....	47
I.7.5.2. Exploitation matricielle des bilans matière	48
I.7.5.3. Comparaison simulations et données expérimentales	51
I.7.6. Notion de flexibilité et de rigidité des nœuds du réseau	53
I.7.7. La Théorie du Contrôle Métabolique.....	55
I.7.7.1. Développements théoriques	54
I.7.7.2. Applications de la TCM.....	57
I.7.7.3. Exemple de la glycolyse de la levure	58
I.7.7.4. Récents développements.....	59
I.7.8. Conclusion générale sur l'analyse métabolique.....	60

I.8. Etude de Bionet.....	60
I.8.1. Présentation générale.....	60
I.8.2. Construction du BRNE.....	62
I.8.2.1. Description	62
I.8.2.2. Exemple.....	62
I.8.2.3. Modifications du réseau.....	63
I.8.3. Analyse du BRNE et construction de la matrice de redondances ..	64
I.8.3.1. Procédure d'analyse de singularités et de redondances ...	65
I.8.3.2. Identification des groupes de singularités.....	65
I.8.3.3. Décomposition en valeurs singulières.....	65
I.8.3.4. Analyse de sensibilité	66
I.8.4. Vecteur de mesures et résolution du BRNE.....	66
I.8.4.1. Construction du vecteur de mesure (vecteur r).....	66
I.8.4.2. Analyse des mesures	66
I.8.4.3. Modification du vecteur de mesures.....	67
I.8.4.4. Résolution du BRNE.....	67
I.8.4.5. Exemple de réseaux biochimiques.....	68

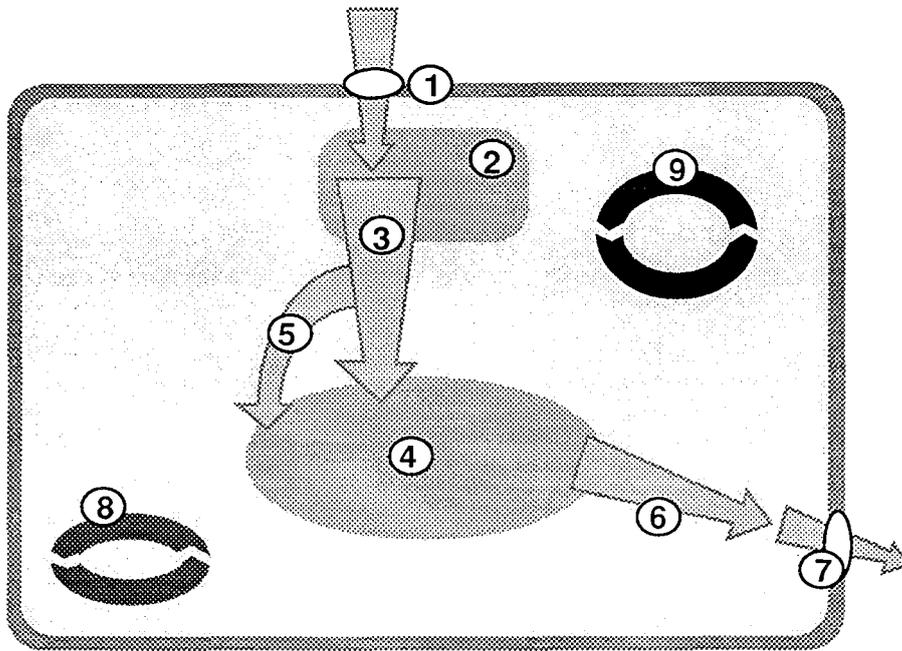


Figure I.1 : Schématisation du métabolisme bactérien sur glucose. Les voies (1) à (5) et (8), (9) sont appelées voies du métabolisme central.

- (1) système d'entrée du glucose dans la cellule
- (2) cycle des hexoses mono-phosphates (ou voie des pentoses phosphates)
- (3) glycolyse (ou voie d'Emden-Meyerhof-Parnas)
- (4) cycle cycle de Krebs (ou de l'acide tricarboxylique ou cycle de l'acide citrique)
- (5) voies anaplérotiques du système "Phospho énoyl-pyruvate-Pyruvate-Oxalo acétate-Malate"
- (6) voies de synthèse des métabolites secondaires (exemple du glutamate)
- (7) système d'excrétion des métabolites secondaires
- (8) chaîne respiratoire (régénération des cofacteurs oxydés)
- (9) systèmes de régénération des coenzymes et cofacteurs.

Métabolisme général des Corynébactéries sur glucose.

Le métabolisme cellulaire forme un réseau de quelques deux milles réactions biochimiques. Il peut être subdivisé en voies métaboliques, présentant chacune une grande fonction de catabolisme ou de synthèse pour la cellule : production d'énergie, synthèse de protéines, d'acides gras... Ce réseau, très dense, possède de nombreux points de connexion entre les différentes voies et de nombreux sites de régulation afin d'optimiser le métabolisme cellulaire. Une partie de ce réseau biochimique, appelé métabolisme central, est commun à toute cellule microbienne et constitue le point de départ de toutes les autres voies de biosynthèse. Seules la nature même des enzymes ou les régulations intervenant dans ce métabolisme commun peuvent différer d'un organisme à l'autre, voire d'une souche à l'autre. Un schéma simplifié du métabolisme central à partir du glucose est présenté figure I.1, que nous décrirons en détail dans ce chapitre, avec deux objectifs principaux :

- faire le point sur les connaissances relatives au métabolisme central, en particulier chez les Corynébactéries,
- mettre l'accent sur les points de controverse, en particulier les modes d'entrée du glucose dans la cellule, l'existence *in vivo* de certaines voies métaboliques (cycle glyoxylique, voies anaplérotiques) et la répartition du flux aux nœuds du réseau biochimique (glucose 6-phosphate, phospho éno-pyruvate et pyruvate).

I.1. Les voies du métabolisme central.

Depuis les années 1950, l'étude de la biochimie et du métabolisme des Corynébactéries a été menée à l'aide de deux souches principales : *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium flavum*. Bien que ces deux souches présentent des caractéristiques biochimiques très voisines, elles peuvent différer au niveau des propriétés cinétiques, enzymatiques, et des régulations métaboliques.

Les principales équipes de recherche ayant contribué à la connaissance de ce genre sont représentées par **R. Katsumata** (Tokyo, Japon), **M.P. Ruklish** (Institut de Microbiologie, Riga, Russie), **H. Sahm** et **R. Krämer** (Institut de Biotechnologie, Jülich, RFA), **I. Shiio** (Ajinomoto, Kawasaki, Japon), **A.J. Sinskey** (MIT, Cambridge, USA). Ces auteurs ont mis en évidence par

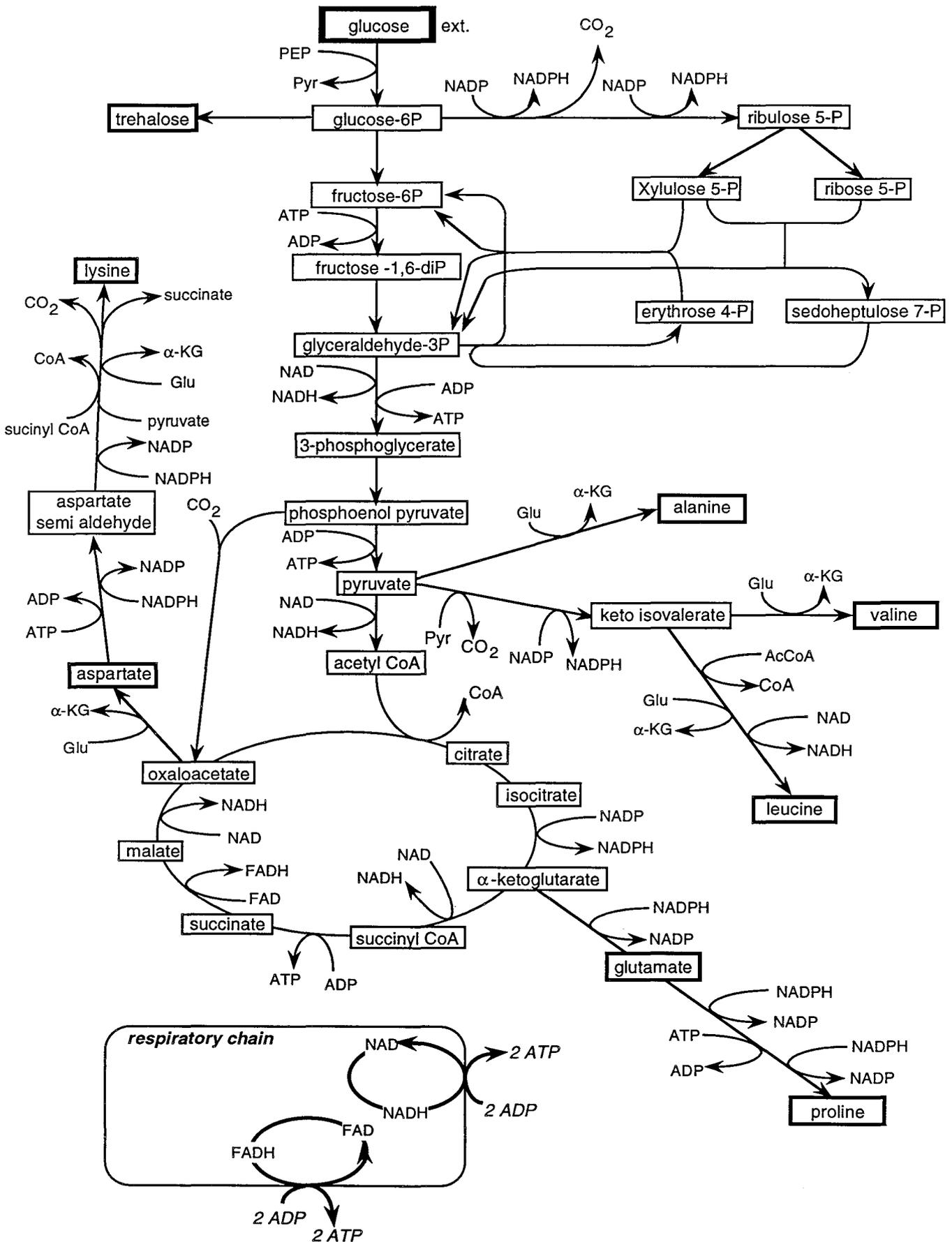


Figure I.2: Métabolisme des Corynebactéries.

dosages enzymatiques, marquages radioactifs ou encore mutagénèses, la présence des principales voies du métabolisme du glucose : glycolyse, voie des pentoses, cycle de Krebs, voies anaplerotiques (Shiio et coll., 1959 ; Su et coll., 1961a). L'analyse de la répartition du marquage du glucose radioactif lors de son catabolisme a démontré l'absence de la voie ED (Shiio et coll., 1960a). De même, une grande partie des études menées s'accordent pour affirmer l'inactivité du cycle de l'acide glyoxylique (shunt glyoxylique) lors du métabolisme du glucose (Shiio et coll., 1969). De nombreux travaux ont également été réalisés pour l'étude des voies de biosynthèse des acides aminés, en particulier de l'acide glutamique et de la lysine, puisque ces bactéries sont naturellement productrices. La figure I.2 présente le réseau biochimique tel qu'il est actuellement perçu chez les Corynébactéries.

I.1.1. Entrée du glucose dans la cellule.

Plusieurs mécanismes d'entrée du glucose dans les cellules procaryotes et eucaryotes ont été identifiés et rapportés dans la littérature (Kornberg, 1992). Deux grandes catégories peuvent être distinguées : les transports passifs (non consommateurs d'énergie) et les transports actifs (consommateurs d'énergie).

Des systèmes de transports passifs, ou perméases, ont été décrits en premier chez *Escherichia coli* pour le lactose. Ces systèmes sont couplés au transport d'un cation, généralement un proton. Ils se rencontrent principalement chez les microorganismes aérobies strictes, mais sont également présents chez les levures et les cellules eucaryotes. Les perméases sont spécifiques d'un sucre donné, qui devra ensuite être phosphorylé pour intégrer le métabolisme général. Par exemple, le glucose subit une phosphorylation en position 6 grâce à une glucokinase cytoplasmique ATP dépendante avant de rejoindre la glycolyse.

Deux types de transports actifs ont été décrits, se distinguant par la source d'énergie employée. Tout d'abord des systèmes dépendants de protéines de liaisons spécifiques, principalement rencontrés chez les bactéries à Gram négatif aérobies (Cocaign, 1992). Le sucre est complexé par une protéine de liaison périplasmique, qui interagit avec une protéine membranaire. Le passage du sucre dans la cellule par ce canal requiert ensuite de l'énergie sous forme de force proton-motrice, d'ATP ou encore d'acétyl-phosphate. Enfin, les systèmes phosphotransférasiques (PTS) découverts par Roseman et coll. (1964) sont des complexes multienzymatiques utilisant le PEP (Phospho Enol-Pyruvate) comme source d'énergie et de groupements phosphates. Contrairement aux deux systèmes précédents, les PTS se rencontrent principalement chez les microorganismes anaérobies qui intègrent ainsi directement le sucre dans le métabolisme carboné en le phosphorylant, tout en convertissant le PEP en pyruvate. De nombreux microorganismes aérobies, Gram⁺ ou Gram⁻, de même que des bactéries photosynthétiques, possèdent également des systèmes PTS, mais ce type de transport n'a encore jamais été observé chez les Eucaryotes.

Le mécanisme réactionnel général des PTS est présenté figure I.3. Le groupement phosphate est acheminé du PEP vers la protéine EII via les protéines EI, HPr et EIII. La protéine EII catalyse finalement l'entrée du sucre dans la cellule et sa phosphorylation. Il existe différents types de systèmes PTS, en fonction de leur structure multienzymatique, mais surtout de leur spécificité de substrat (figure I.4) :

- un PTS-mannose ou PTS-glucose, constitutif, qui présente également une forte affinité pour le glucose, la glucosamine et le 2-déoxyglucose,
- un PTS-fructose, inductible par le fructose, réprimé par le glucose, utilisé également pour le xylitol. Il présente par ailleurs une faible affinité pour le glucose,
- un PTS spécifique du saccharose.

Si les cellules utilisent préférentiellement un type de transporteur, elles peuvent cependant en posséder plusieurs. Ainsi, O'Brien et coll. (1980) ont montré l'existence de perméases en plus du PTS glucose chez *Klebsiella aerogenes* cultivée en aérobiose sur glucose.

Chez les Corynébactéries, les études ont principalement été menées chez *Brevibacterium flavum* (figure I.4). L'existence d'un PTS-glucose phosphorylant le glucose en position 6 a été montrée par Mori et Shio (1987a). Ces auteurs ont également mis en évidence un PTS fructose avec phosphorylation en position 1 (Mori et Shio, 1987b ; Sugimoto et Shio, 1989). Le fructose 1-phosphate rejoint ensuite la glycolyse via le fructose 1,6-bisphosphate. Shio et coll. (1990) ont finalement démontré la présence d'un PTS saccharose phosphorylant le saccharose en position 6 du glucose. L'hydrolyse qui suit libère ainsi du glucose 6-phosphate et du fructose. Ce dernier peut être phosphorylé par le PTS-fructose puis dégradé via la glycolyse. Des études cinétiques menées sur le PTS-glucose chez *Brevibacterium flavum* montrent, entre autres, une vitesse spécifique maximale d'entrée du glucose dans la cellule de 29 à 41 mmol.min⁻¹.mg⁻¹ de cellules (Ruklish, 1987).

Des études de Mori et Shio (1987b) démontrent la présence d'une activité glucokinase qui catalyse la phosphorylation ATP dépendante du glucose intracellulaire. Cette activité permettrait de phosphoryler le glucose qui proviendrait d'un autre type de transporteur que les PTS (comme les perméases par exemple), ou de l'hydrolyse d'un substrat complexe. Mais ces études, si elles tendent à l'affirmer, ne démontrent pas clairement l'absence des transports actifs et autres perméases. Des études menées par ailleurs chez *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* montrent que des mutants du système PTS-glucose ne possédant que l'enzyme EII peuvent croître sur glucose grâce à la présence de la glucokinase. L'enzyme EII du PTS pourrait donc se comporter en système de transport passif (d'après Kornberg, 1992). Des études très récentes de Coccagn-Bousquet et coll. (1996) ont permis de doser l'activité PTS lors de cultures continues de *Corynebacterium glutamicum* sur glucose. Ils montrent que cette activité est insuffisante pour expliquer la vitesse de consommation du glucose, laissant supposer l'existence d'un autre mode de transport de ce sucre, comme une activité de type perméase par exemple. Cet autre mode de transport pourrait représenter jusqu'à 15% du glucose consommé.

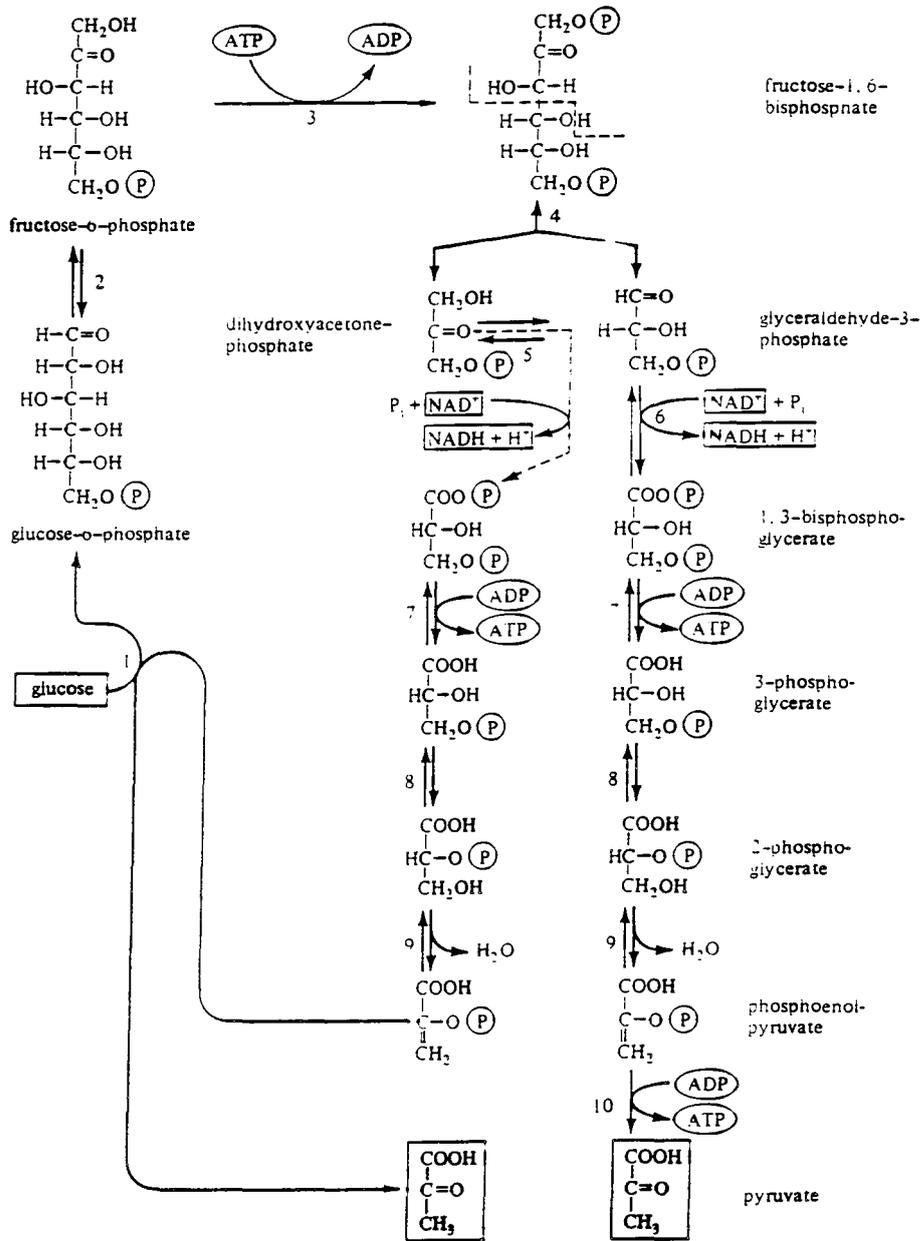


Figure I.5 : Schématisation de la glycolyse (d'après Gottschalk, 1986).

- 1, PTS-Glucose ; 2, Phospho Gluco Isomérase ; 3, 6-Phospho Fructo Kinase ; 4, Fructose BisPhosphatase ; 5, Triose Phosphate Isomérase ; 6, Glyceraldehyde 3-Phosphate déhydrogénase ; 7, 3-Phosphoglycérate Kinase ; 8, Phosphoglycérate Mutase ; 9, énolese ; 10, Pyruvate Kinase.

Conclusion :

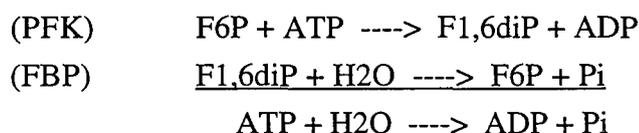
Malgré de nombreuses études chez les Corynébactéries, il reste encore des incertitudes concernant les mécanismes d'entrée des sucres dans la cellule, et en particulier du glucose. Pour ce dernier, le système PTS semble être la voie majoritaire sinon exclusive.

I.1.2. La Glycolyse.

La glycolyse est la voie énergétique qui catabolise le G6P en pyruvate, libérant 3 ATP et 2 NADH₂. Elle est schématisée en figure I.5, avec les enzymes qui s'y rapportent. Les points de communication majeurs avec le reste du métabolisme sont également indiqués. Il s'agit en particulier du G6P qui marque le départ de la voie des pentoses phosphates (synthèse des nucléotides et des acides aminés aromatiques), le F6P et le GAP qui en sont la sortie, le DHAP qui participe à la chaîne de synthèse des acides gras, le PEP, point de départ de la voie anaplérotique de la PEP Carboxylase et de l'Enzyme Malique. La glycolyse permet donc l'acheminement du glucose vers les voies de synthèse et vers la production d'énergie. Elle doit être strictement régulée, ce qui est possible en particulier au niveau des deux réactions irréversibles de la Phospho-Fructo-Kinase et de la Pyruvate Kinase. Chez *Brevibacterium flavum*, les différentes enzymes de la glycolyse ont été mises en évidence par Shio et coll. (1959).

I.1.2.1. La PhosphoFructo-Kinase (PFK) et la Fructose BisPhosphatase (FBP).

La PFK catalyse la réaction irréversible de phosphorylation ATP dépendante du F6P en F1,6-diP. La FBP catalyse la réaction réverse avec libération d'un phosphate inorganique. L'action conjuguée de ces deux enzymes crée ainsi un cycle futile hydrolysant l'ATP :



L'activité de ces enzymes doit donc être strictement contrôlée afin de conserver une logique cohérente de glycolyse ou de néoglucogénèse.

La PFK est un complexe enzymatique allostérique qui présente plusieurs activateurs et inhibiteurs, qui diffèrent selon les cellules considérées. Chez *Escherichia coli*, la PFK est inhibée par le PEP et activée par l'ADP (Neidhardt, 1987). La régulation de la PFK est différente chez *B. flavum*. L'ADP exerce une inhibition compétitive par analogie avec le substrat. La PFK ne serait ni inhibée par l'ATP, le citrate ou le PEP, ni activée par l'ADP, l'AMP ou le F1,6-diP (Sugimoto et Shio, 1989).

La fructose bisphosphatase est nécessaire chez *Escherichia coli* pour la croissance sur des substrats néoglucogéniques tels que le glycérol, le succinate ou l'acétate. C'est une enzyme constitutive, inhibée par l'AMP et le G6P (Neidhardt, 1987). En ce qui concerne *Brevibacterium flavum*, Ruklish et coll. (1978) ont montré que cette enzyme était constitutive, mais aucune étude sur la régulation n'a été réalisée.

I.1.2.2. Pyruvate kinase (PK).

La PK catalyse la réaction irréversible de conversion du PEP en pyruvate avec libération d'un ATP. Cette enzyme occupe une position clé entre glycolyse et cycle de Krebs, et présente une biochimie complexe.

Chez *Escherichia coli*, deux isoenzymes ont été isolées, la Pyk F (ou Pyk I) et la Pyk A (ou Pyk II). Elles diffèrent par leurs propriétés cinétiques, structurales et génétiques. Pyk F est induite sur glucose, activée par le F1,6-diP, mais pas suffisamment pour permettre la croissance sur des substrats néoglucogéniques tels que le succinate. En revanche, Pyk A est constitutive et activée par l'AMP. Des mutants d'*Escherichia coli* déficients pour l'une ou l'autre forme présentent des croissances normales sur différents sucres, mais un double mutant ne peut se développer que faiblement sur des sucres non assimilables par système PTS. Ainsi, ces derniers apportent suffisamment de pyruvate pour permettre une croissance normale (Neidhardt, 1987).

Chez *Brevibacterium flavum*, seule une PK de type Pyk A a été isolée lors de la croissance sur glucose. Elle est stimulée par l'AMP et inactivée par l'ATP, ainsi que par de fortes concentrations de divers acides organiques tels que les acides citrique, α -cétoglutarique, malique ou encore oxalique (Ozaki et Shii, 1969). Chez *Corynebacterium glutamicum*, la séquence nucléotidique, la structure, ainsi que les propriétés cinétiques de la Pyruvate Kinase ont récemment été étudiées (Jetten et Coll, 1994a). L'enzyme utilise l'ADP ou le GDP comme accepteur de groupement phosphate avec une préférence pour l'ADP, alors que l'inverse est observé chez *Escherichia coli*. D'autre part, cette PK est entièrement dépendante des ions Mn^{2+} ou Co^{2+} et non pas Mg^{2+} comme observé classiquement. Enfin, la PK de *Corynebacterium glutamicum* montre une activité spécifique très élevée, comparable à celle des cellules animales, c'est à dire 2 à 3 fois plus fortes que celle des autres bactéries.

Il semble que le pyruvate produit par la réaction du PTS suffise à la croissance des Corynébactéries, et que la PK ne soit pas indispensable. Mori et Shii (1987a) ont en effet montré qu'un mutant PK^- de *Brevibacterium flavum* se développe normalement sur glucose. De même, Gubler et coll. (1994a) ont observé que ni la croissance, ni la consommation du glucose ne semblent perturbées chez les mutants PK^- par rapport à la souche sauvage de *Corynebacterium glutamicum* ou *Corynebacterium lactofermentum*. Ces observations semblent valables pour tous les sucres assimilables par système PTS. En revanche, la PK semble indispensable pour la croissance de

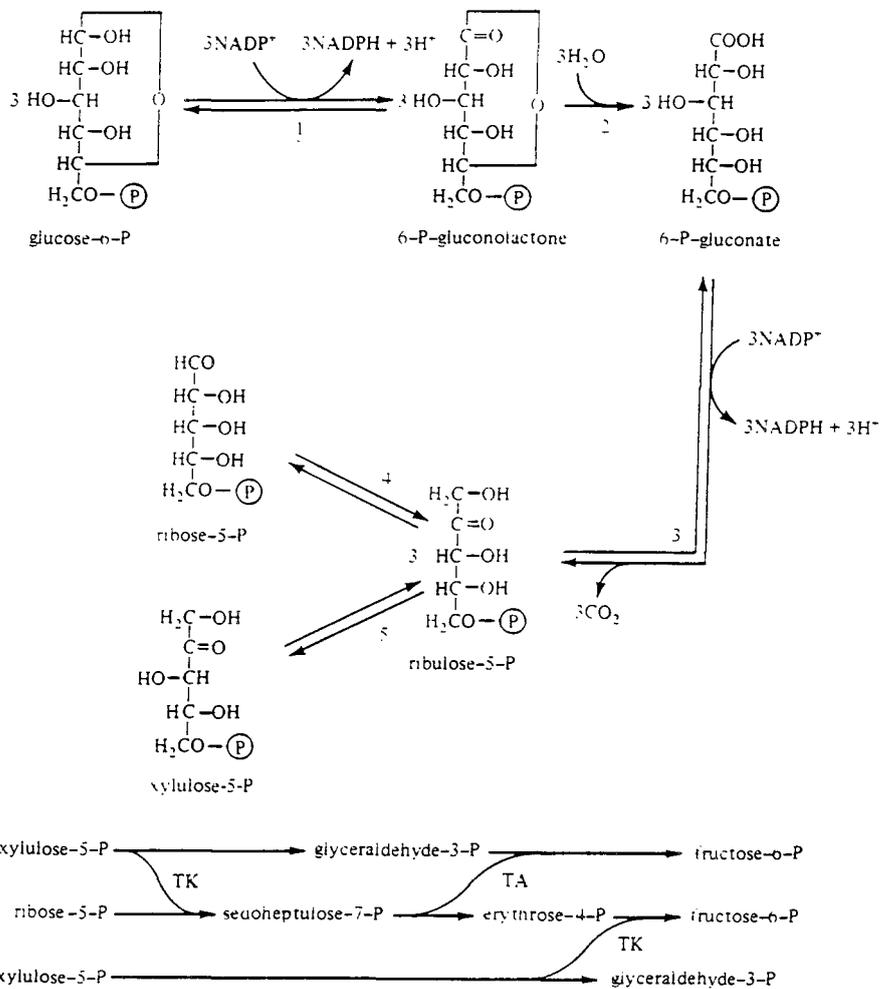


Figure I.6 : Schématisation de la voie des pentoses phosphates (d'après Gottschalk, 1986).

1, Glucose 6-Phosphate Déhydrogénase; 2, Lactonase ; 3, 6-Phospho Gluconate Déhydrogénase ; 4, Ribose 5-Phosphate Isomérase ; 5, Ribulose 5-Phosphate 3-épimérase ; TK, Transcétolase ; TA, Transaldolase.

Corynebacterium glutamicum sur ribose (non assimilable par PTS) et lors de la surproduction de lysine. L'inactivation de la PK chez une souche de *Corynebacterium lactofermentum* hyperproductrice de lysine conduit - sur glucose - à une forte diminution de la production de lysine et à l'accumulation d'intermédiaires de la glycolyse tels que le glycéraldéhyde ou le dihydroxyacétone en plus de l'acétate (Gubler et coll., 1994a). En conclusion, si le PTS autorise une croissance normale, le pyruvate ainsi formé ne permet pas de maintenir une forte production de lysine, rendant alors la PK indispensable.

I.1.3. La voie des Pentoses Phosphates (PPP).

I.1.3.1. Structure et fonctions biochimiques.

La voie des pentoses phosphates, encore appelée voie de l'hexose monophosphate, est une série de réactions biochimiques interagissant avec la glycolyse à trois niveaux : G6P, F6P et GAP. Cette voie est schématisée figure I.6. Elle conduit à la synthèse d'intermédiaires anaboliques tels que le ribose 5-phosphate (synthèse des acides nucléiques), et l'érythrose 4-phosphate (synthèse des acides aminés aromatiques) et interagit avec la glycolyse au niveau du F6P et du GAP. Elle peut se subdiviser en deux parties :

i- la partie oxydative, conduisant à la synthèse du ribose 5-phosphate à partir du G6P en trois étapes : une oxydation du G6P en 6-phosphogluconolactone par la G6P Déshydrogénase, avec production d'un NADPH ; une conversion irréversible du 6-phospho-gluconolactone en 6-phospho-gluconate grâce à la gluconolactonase, et une décarboxylation oxydative du 6-phosphogluconate en ribose 5-phosphate avec libération d'un CO₂ et d'un NADPH par la 6-phosphogluconate déshydrogénase. On notera donc l'existence d'une étape irréversible et de la production de deux molécules de NADPH.

ii- la partie non oxydative, qui consiste en une série d'interconversions de sucres phosphates à l'aide d'isoméras, épiméras, transcétolases et transaldolases. Toutes ces étapes sont réversibles et neutres énergétiquement.

La voie des pentoses phosphates remplit donc deux rôles importants : synthèse de précurseurs anaboliques et production de pouvoir réducteur sous la forme de 2 NADPH. Il est d'autre part évident que cette voie métabolique joue un rôle clé lors de la croissance sur gluconate ou sur pentoses comme sources de carbone et d'énergie.

Un mutant d'*Escherichia coli* dans la partie oxydative ne présente aucune difficulté de croissance, grâce à la réversibilité de la partie non oxydative et à la production de NADPH par d'autres voies. De même, un mutant de la G6P isomérase (G6P ---> F6P) n'influence pas la croissance d'*Escherichia coli*. En revanche, un double mutant de la G6P isomérase et de la partie oxydative de la voie des pentoses n'est plus capable de se développer sur glucose (Neidhardt, 1987). Ceci indique que le catabolisme du glucose chez *Escherichia coli* peut avoir lieu par la glycolyse aussi

bien que par la voie des pentoses, mais qu'une mutation dans la partie non oxydative peut entraîner l'incapacité de pousser sur pentoses ou une auxotrophie vis-à-vis des acides aminés aromatiques.

Toutes les enzymes de la voie des pentoses n'ont pas été spécifiquement mises en évidence chez les Corynébactéries. Cependant, de nombreuses expériences concourent à admettre l'existence de cette voie. En particulier, l'étude de la répartition de la radioactivité lors du métabolisme du glucose-¹⁴C chez *Brevibacterium flavum* (Shiio et coll., 1960) permet de suggérer la présence de la voie des pentoses et d'en évaluer la participation à 10%. L'existence de la partie oxydative a clairement été démontrée en étudiant la régulation des deux enzymes NADP dépendantes (Sugimoto et Shiio, 1987a et b). La première est très fortement inhibée par l'oxaloacétate - ce qui semble être une spécificité des bactéries glutamiques - et dans une moindre mesure par le F1,6-diP, le NADPH et l'AcCoA. La seconde quand à elle, est très fortement inhibée par le F1,6-diP et plus faiblement par de nombreux composés tels que le GAP, l'OA, l'AcCoA, le NADPH... Chez *Corynebacterium glutamicum*, Vallino et Stephanopoulos (1994a) confirment l'irréversibilité de la gluconolactonase et démontrent que la voie Entner-Doudoroff (ED) - voie parallèle à la voie des pentoses à partir du 6-phosphogluconate - n'intervient pas. Le gluconate utilisé comme source de carbone et d'énergie ne peut donc être métabolisé que par la voie des pentoses. D'autre part, l'impossibilité d'isoler un mutant PGI⁻ et le fait qu'une souche atténuée à 90% pour l'activité PGI montre une croissance très ralentie, semblent indiquer que la voie des pentoses ne peut se substituer à la glycolyse pour la croissance des Corynébactéries sur glucose. De même, le gluconate n'autorise qu'une faible croissance. Une explication proposée par les auteurs est que le NADPH, ainsi produit en large excès, inhiberait la croissance de ces souches, qui ne disposeraient pas des mécanismes appropriés à la dissimilation du NADPH excédentaire (en particulier, la transhydrogénase, qui permet la conversion NADPH <---> NADH).

I.1.3.2. Répartition du flux carboné entre EMP et PPP.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre et quantifier la répartition du flux carboné au niveau du G6P entre la glycolyse et la voie des pentoses. Différentes méthodes ont été utilisées telles que le suivi du glucose marqué radioactivement sur l'un ou l'autre des carbones, la RMN ou la modélisation des réseaux métaboliques. Les résultats sont très variables d'une souche à l'autre, d'un milieu de culture à l'autre et selon la méthode employée. Il faut également être très attentif à la manière dont est calculée la participation de la voie des pentoses, selon que la méthode prend en compte ou non le retour de flux carboné dans la glycolyse. Le tableau I.1 décrit les différents calculs possibles.

Bien que le calcul "A" semble le plus naturel, la participation de la voie des pentoses envisagée selon la méthode "C" est la plus couramment utilisée, car elle semble plus proche de la réalité physiologique. Cette formule a été déterminée grâce aux données expérimentales de RMN (Dawes et

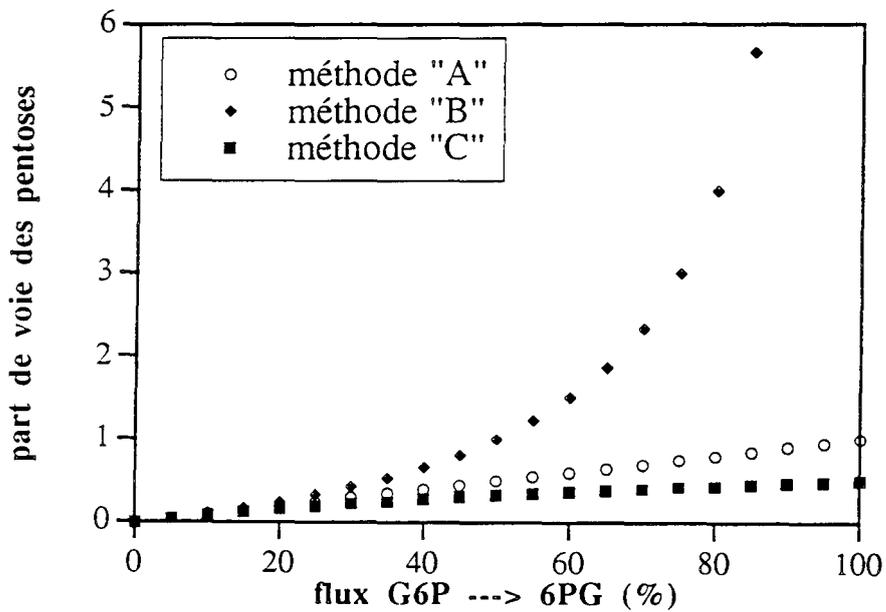
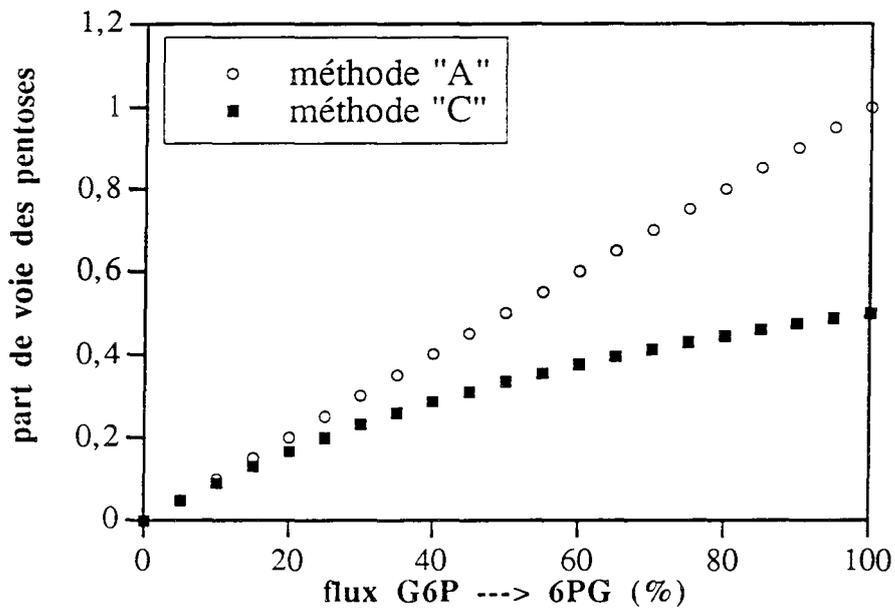


Figure I.7 : Représentation de l'évolution de la part de voie des pentoses phosphates en fonction du flux G6P ---> 6PG selon les différentes méthodes de calcul (se reporter au texte pour les expressions mathématiques).

coll., 1958). La figure I.7 propose la simulation de ces différentes méthodes en supposant (4)+(5)=(3), ce qui est généralement très acceptable. Ces trois méthodes conduisent à des résultats proches jusqu'à une valeur du flux (2) égale à 20 (unité arbitraire, pour un flux (1) égal à 100). Au-delà, elles diffèrent de plus en plus, la méthode "C" donnant les valeurs les plus faibles. Les corrélations entre les différentes méthodes sont les suivantes :

$$"B" = \frac{"A"}{1-"A"} \quad "C" = \frac{"A"}{1+"A"} \quad \text{et} \quad "C" = \frac{0,5 \cdot "B"}{0,5+"B"}$$

Tableau I.1 : Méthode de calcul de la répartition du flux carboné au nœud G6P.

	Méthode de calcul	Interprétation
	<p>méthode A : $\frac{(3)}{(1)}$</p> <p>méthode B : $\frac{(3)}{(2)}$</p> <p>méthode C : $\frac{(3)}{(1)+(4)+(5)}$</p>	<p>répartition nette</p> <p>répartition relative entre voie des pentoses et glycolyse</p> <p>répartition avec prise en compte d'un recyclage partiel du F6P dans la voie des pentoses</p>

Chez *Escherichia coli*, la participation de la voie des pentoses est généralement admise entre 15 et 30%. Csonka et coll. (1977) déterminent par exemple une valeur de 28%. D'autres études expérimentales (Model et coll., 1976) ou théoriques (Ko et coll., 1993) mettent en évidence que la participation de la voie des pentoses est inversement proportionnelle à l'oxygénation du milieu et varie de 7 à 57% (méthode "A").

D'une manière générale, la participation de la voie des pentoses chez les Corynébactéries est plus élevée que chez les autres microorganismes. Ceci s'explique par l'absence reconnue de transhydrogénase NADH <---> NADPH qui rend indispensable la voie des pentoses en temps que producteur de NADPH chez les Corynébactéries. Par RMN-¹³C du glucose et pour la phase de croissance rapide, Walker et coll. (1982) proposent une valeur de 13% (méthode "A") pour *Microbacterium ammoniophilum*, Rollin et coll. (1995) 53% (méthode "A") pour *Corynebacterium glutamicum melassecola*, alors que Shio et coll. (1960) estiment cette valeur à seulement 10% (méthode "A") chez *Corynebacterium glutamicum*. On notera dans ce dernier cas l'utilisation d'arsénite, qui bloque le métabolisme au niveau du pyruvate et peut donc engendrer des artefacts. En production de lysine chez *Corynebacterium glutamicum*, Yamaguchi et coll. (1986) proposent une

Tableau I.2 : Part de la voie des pentoses déterminée expérimentalement (fond blanc) ou par modélisation (fond grisé) pour différents types de cellules en mode discontinu.

<i>souches</i>	%PPP (méthode)	%PPP (méthode "C")	<i>référence</i>
Cellules animales	9,5 % ("A")	8,7 %	Zupke et coll. (1995)
(hybridomes)	8 % ("C")	8 %	Sharfstein et coll. (1994)
	4% ("B")	3,7%	Mancuso et coll. (1994)
<i>Escherichia coli</i>			
croissance sur glucose	28 % (?)		Model et coll. (1976)
en fonction de l'oxygénation (études théoriques)	7 à 57% ("A")		Ko et coll. (1993)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>			
croissance sur glucose	10 % ("A")	9 %	Shiio et coll. (1960)
	53 % ("A")	35 %	Rollin et coll. (1995)
	40 % ("A")	29 %	Sonntag et coll. (1995)
production de lysine	44 % ("B")	47 %	Yamagushi et coll. (1986)
	35 % ("C")	35 %	Ishino et coll. (1991)
	47 % ("A")	32 %	Sonntag et coll. (1995)
	66 % ("A")	40 %	Marx et coll. (1996) *
production de glutamate	16 % ("A")	14 %	Sonntag et coll. (1995)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (simulation)			
croissance sur glucose	54 % ("C")	54 %	Vallino et coll. (1990)
	27 % ("C")	27 %	Vallino et coll. (1993)
	47 % ("C")	47 %	"
	31 % ("C")	31 %	Vallino et coll. (1994)
	46 % ("C")	46 %	"
	82 % ("C")	82 %	Dominguez et coll. (1994)
	51 % ("C")	51 %	Péquignot (1995)
	58 % ("A")	37 %	Cocaign-Bousquet (1996)
	36 % ("A")	27 %	Cocaign-Bousquet (1996) *

* culture continue.

valeur calculée par RMN-¹³C de 44% pour la participation de la voie des pentoses (méthode "B"). Toujours chez *Corynebacterium glutamicum*, des études très récentes de cultures discontinues sur glucose proposent une participation de la voie des pentoses de 40% en croissance, 47% en production de lysine et 16% en production de glutamate (Sonntag et coll., 1995, méthode "A"). Enfin, Marx et coll. (1996) avancent une valeur de 66% mesurée par RMN pour la part de voie des pentoses lors de production de lysine en culture continue (méthode "A").

Les méthodes de modélisation des réseaux métaboliques et des flux intracellulaires permettent également d'évaluer la participation de la voie des pentoses. Ainsi, chez *Corynebacterium glutamicum*, Vallino et Stephanopoulos (1990 et 1993) proposent une valeur de 55 à 60% (méthode "C"), Dominguez et coll. (1993), 44%. Ces derniers ont également étudié l'effet de limitations en oxygène et aboutissent à une valeur de 23%. Coccagn-Bousquet et coll. (1996) calculent quant à eux une valeur de 36% en culture continue et de 58% en culture discontinue en phase exponentielle de croissance (méthode "A").

A titre de comparaison, la participation de la voie des pentoses est généralement inférieure à 10% pour les cellules animales. Des études RMN-¹³C du métabolisme du glucose pour différentes lignées d'hybridomes ont par exemple permis d'évaluer cette participation à 9,5% (méthode "A", Zupke et Stephanopoulos, 1995), 8% (méthode "C", Sharfstein et coll., 1994) ou encore 4% (méthode "B", Mancuso et coll., 1994).

Toutes ces données sont résumées dans le tableau I.2, avec conversion de toutes les valeurs en méthode "C".

Quelques études du métabolisme du fructose sont également disponibles dans la littérature. En particulier, Rollin et coll. (1995) estiment la part de la voie des pentoses à 20% chez *Corynebacterium glutamicum melassecola* par RMN-¹³C. Cette valeur semble faible par rapport à celles observées sur glucose, mais elle est totalement cohérente avec les observations de Dominguez (1994). Le fructose pénétrerait dans la cellule par un PTS-fructose à 80% avec formation de F1P, puis de F1,6-diP, qui rejoint la glycolyse. La FBP, considérée inactive dans des conditions de catabolisme des sucres, ne permet pas de "remonter" au F6P pour ensuite rejoindre la voie des pentoses. Ce seraient donc les 20% de fructose assimilés par le PTS-mannose (ou PTS-glucose) qui passeraient par la voie des pentoses. On remarquera ici l'influence prépondérante du mode d'assimilation de la source carbonée sur le métabolisme bactérien et en particulier sur le mode de production du NADPH. Ceci est fondamental car l'efficacité de certaines voies de biosynthèse dépend de la disponibilité du NADPH. Par exemple, Ishino et coll. (1991) ont montré une corrélation directe entre la vitesse de production de lysine et la participation de la voie des pentoses.

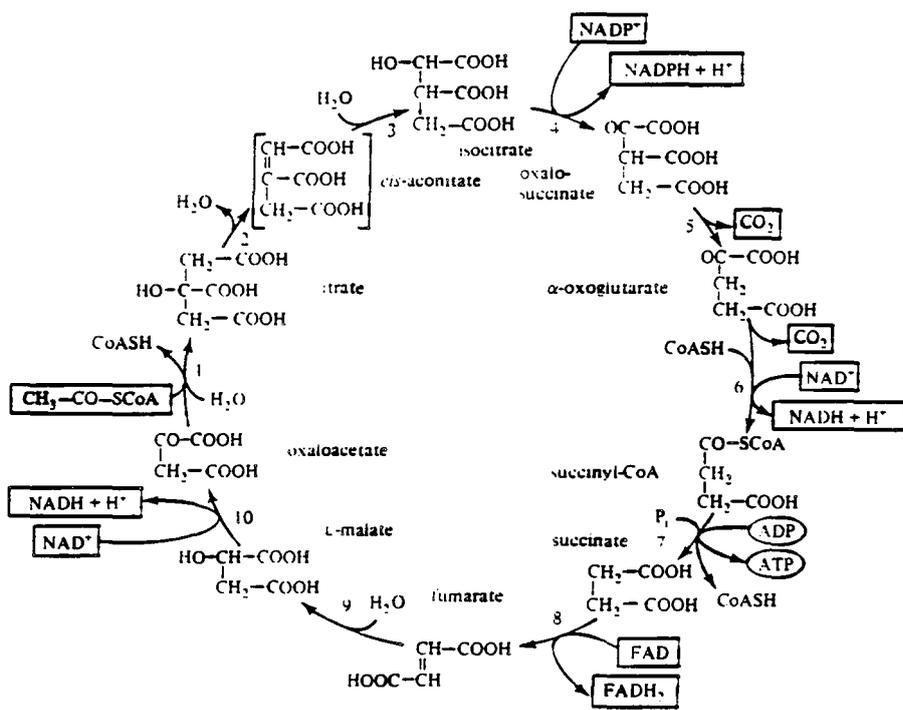


Figure I.8: Schématisation du cycle de Krebs (d'après Gottschalk, 1986).

1, Citrate Synthase ; 2 et 3, cis-Aconitate Hydratase ; 4 et 5, Isocitrate Dehydrogénase ; 6, complexe α -Cétoglutarate Dehydrogénase ; 7, Succinate Thiokinase ; 8, Succinate Dehydrogénase ; 9, Fumarase ; 10, Malate Dehydrogénase.

I.1.4. Le complexe Pyruvate Déhydrogénase (PDH).

La PDH permet de relier la glycolyse et le cycle de Krebs. Elle catalyse la réaction irréversible de condensation du coenzyme A réduit sur le pyruvate accompagnée d'une décarboxylation. Il en résulte la formation de l'acétyl coenzyme A, d'un CO₂ et d'un NADH. La PDH est en réalité un complexe composé de 3 enzymes différentes : la pyruvate décarboxylase (ou déhydrogénase), la dihydrolipoamide transacétylase et la dihydrolipoamide déhydrogénase. Ces deux dernières activités enzymatiques servent à régénérer les groupements prosthétiques TPP (Thiamine pyrophosphate) et lipoate associés à la réaction de décarboxylation.

Chez *Brevibacterium flavum*, la PDH n'a pas fait l'objet d'études approfondies. Shii et Ujigawa (1978) dosent une activité PDH dans des extraits cellulaires et montrent par la suite que cette activité est dépendante du TPP, du coenzyme A, du NAD et du pyruvate (Ozaki et Shii, 1983).

En ce qui concerne la régulation de la PDH, les études ont été menées chez *Escherichia coli*. Hansen et Henning (1966) ont montré que le complexe enzymatique était inhibé par le NADH, le lipoate et l'AcCoA au niveau de l'activité lipoate déhydrogénase. Shen et coll. (1970) confirment ces résultats et précisent que c'est le rapport NAD/NADH plutôt que le NADH seul, qui est responsable de l'inhibition *in vivo* du complexe. L'activation de la PDH peut se faire par l'AMP, mais aussi par divers intermédiaires de la glycolyse tels que le G6P, F6P, F1,6-diP, le PEP, le GAP, le DHAP (Shen et coll., 1970) et le pyruvate (Dietrich et Henning, 1970).

I.1.5. Le Cycle de Krebs (CK).

I.1.5.1. Structure et fonctions biochimiques.

La structure biochimique du cycle de Krebs (encore appelé cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ou cycle de l'acide citrique) est représentée sur la figure I.8. Il remplit deux rôles essentiels :

- un rôle énergétique, par l'oxydation de l'AcCoA issu de la glycolyse en CO₂, avec production de coenzymes réduits (NADH, NADPH, FADH) et d'ATP.
- un rôle anabolique, par la production d'intermédiaires de synthèses tels que l' α -cétoglutarate et l'oxalo-acétate.

Chez *Brevibacterium flavum* cultivé sur glucose, les différentes enzymes du cycle de Krebs - exceptées la citrate synthase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase - ont été mises en évidence par Shii et coll. (1959).

I.1.5.2. La Citrate Synthase (CS).

Elle catalyse la première étape du cycle de Krebs, c'est à dire la condensation de l'AcCoA et de l'OA pour former du citrate. La CS a été purifiée et étudiée pour les bactéries, les levures et les cellules animales et végétales.

Chez *Escherichia coli*, comme chez la plupart des bactéries Gram⁻, l'ATP et le NADH sont inhibiteurs (Neidhardt, 1987). D'autres études montrent que l'effet de l'ATP (de même que l'ADP et l'ATP) est fonction du pH : fortement inhibiteur en-deçà d'un pH de 7,6, il devient activateur au-delà. L'activité de la CS serait également sensible aux ions Mg²⁺.

Chez *Brevibacterium flavum*, ainsi que chez la plupart des bactéries Gram⁺, la CS présente une inhibition par l'ATP, le cis-aconitate et l'isocitrate, mais pas par le NADH (Shiio et coll., 1977). La synthèse de la CS est d'autre part réprimée par le glutamate, mais pas par l'aspartate (Shiio et Ujigawa, 1978). Chez *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium flavum* et *Corynebacterium lactofermentum*, Jetten et coll. (1994b) montrent également le rôle inhibiteur de l'ATP.

Quelle que soit la cellule concernée, les régulations observées confèrent à la CS un rôle modulateur clé de l'activité du CK. La CS peut donc apparaître comme l'étape limitante du CK, comme le suggérait déjà Krebs en 1960.

I.1.5.3. L'Aconitate Hydratase (AK).

Cette enzyme catalyse la transformation réversible du citrate en isocitrate, avec passage par un intermédiaire non relargué, le cis-aconitate, dont l'existence réelle est toujours controversée.

En ce qui concerne les Corynébactéries, seuls Ruklish et coll. (1987) se sont intéressés à cette enzyme chez *Micrococcus glutamicus* et *Brevibacterium flavum*. Ils proposent que l'AK exerce l'étape limitante du CK plutôt que la CS. Le glutamate exercerait un rôle inhibiteur de l'AK et deviendrait par là-même, le régulateur clé de l'activité du CK.

I.1.5.4. Le complexe Isocitrate Déshydrogénase (ICDH).

Cette enzyme est responsable de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate avec libération d'un coenzyme réduit (NADH et NADPH pour les cellules eucaryotes, NADPH exclusivement pour les bactéries).

Chez *Brevibacterium flavum*, l'ICDH est une enzyme NADP dépendante faiblement inhibée par l' α -cétoglutarate, le glyoxylate et l'oxalo-acétate (Shiio et Ozaki, 1968). En revanche, le mélange OA-glyoxylate exercerait une forte inhibition concertée de l'activité ICDH. D'autre part, l'ICDH ne serait ni inhibée, ni réprimée par le glutamate (Shiio et Ujigawa, 1978) et ne semble pas non plus présenter le système de régulation par phosphorylation-déphosphorylation identifié chez *Escherichia*

coli. Enfin, chez *Corynebacterium glutamicum* cultivé en réacteur continu sur pyruvate, Daridon (1988) montre une induction de l'ICDH par un métabolite proche du pyruvate (PEP, Pyr lui-même...)

I.1.5.5. L' α -Cétoglutarate Déhydrogénase (α -KGDH).

L' α -KGDH catalyse la réaction irréversible de décarboxylation oxydative de l' α -KG en succinyl-coenzyme A avec libération d'un NADH. C'est un complexe multi-enzymatique de structure et de mécanisme réactionnel très semblable à celui de la PDH. Ce complexe regroupe ainsi trois activités enzymatiques : l' α -cétoglutarate déhydrogénase, la dihydrolipoamide déhydrogénase et la dihydroxyloamide transacétylase. Cette dernière est rigoureusement identique à celle du complexe PDH, et ce sont les deux autres enzymes qui confèrent sa spécificité à l' α -KGDH.

Chez les Corynébactéries, l' α -KGDH a longtemps été considérée absente du fait de sa grande instabilité et de sa faible activité. Sa présence a été démontrée chez *B. flavum* par Shiio et Ujigawa-Takeda (1980) grâce à une procédure de cassage des cellules aux ultrasons avec stabilisation des enzymes par du glycérol. L' α -KGDH apparaît activée par l'AcCoA, et inhibée par le pyruvate ainsi que par divers intermédiaires du TCA (le cis aconitate, le succinyl CoA, l'OA). Elle est également inhibée par l'ATP, le NADH et le NADPH. Toutes ces régulations, provenant de produits du TCA en excès, concourent donc à en limiter l'activité et à réorienter le flux carboné vers la synthèse de glutamate (voir ci-dessous, synthèse du glutamate et GDH). Ruklish et coll. (1987) confèrent d'ailleurs à l' α -KGDH un rôle clé (avec l'AK) dans la régulation du TCA chez *Brevibacterium flavum* et *Micrococcus glutamicus*, puisqu'une diminution de son activité est le premier effet observé lors de variations des conditions de culture (excès de saccharose en limitation d'azote, augmentation ou diminution de l'aération).

I.1.5.6. Autres réactions du Cycle de Krebs.

Excepté leur mise en évidence chez les Corynébactéries par Shiio et coll. (1959) puis d'autres auteurs (Ruklish et coll., 1987), ces enzymes n'ont pas fait l'objet d'études très approfondies. Ceci provient certainement du fait qu'elles ne semblent pas exercer un rôle déterminant dans la croissance et/ou la production d'acides aminés.

I.1.6. Les Voies Anaplérotiques.

Les voies du métabolisme central (EMP, PPP, TCA) remplissent deux rôles fondamentaux :

- production d'intermédiaires de biosynthèse.
- production d'énergie et de coenzyme réduits.

Ces deux objectifs sont parfois inconciliables lors de métabolismes très actifs (croissance, production). La production d'énergie est en général privilégiée car primordiale pour la survie, la synthèse d'intermédiaires s'en trouvant donc affaiblie. Les voies anaplérotiques sont des voies

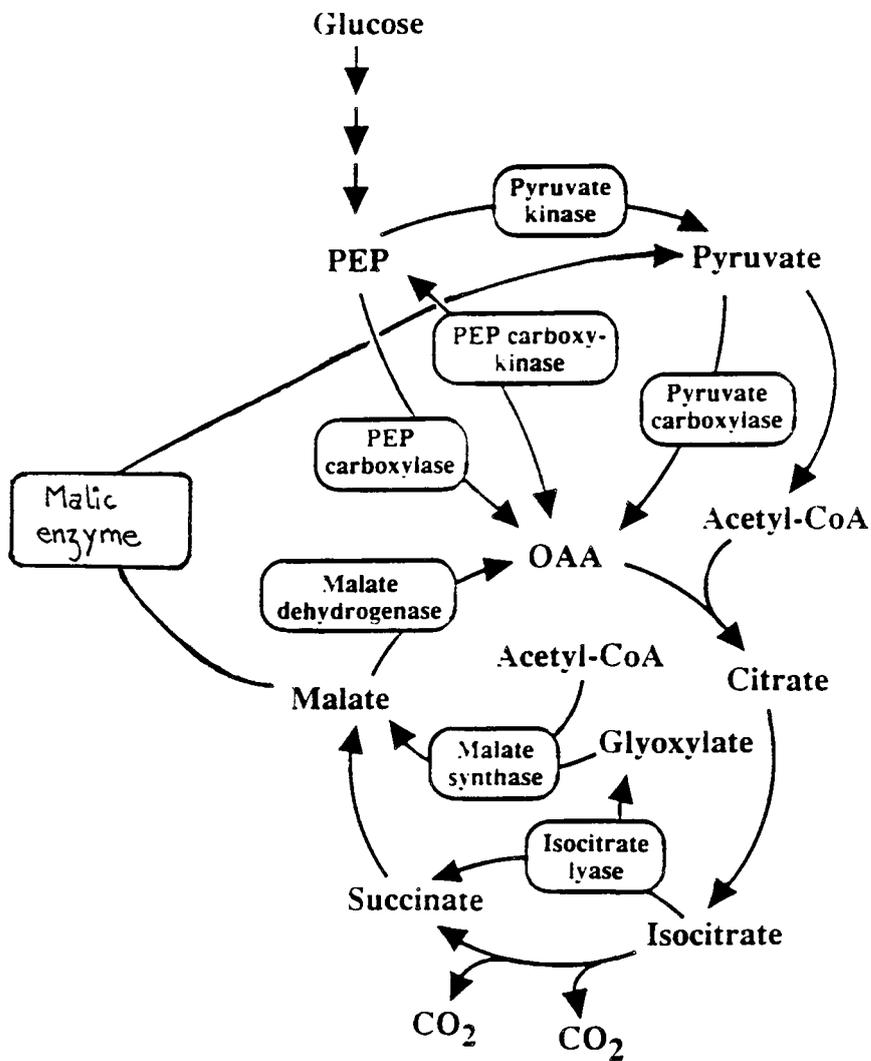


Figure I.9 : Schématisation des voies anaplerotiques.
(D'après Gubler et coll., 1994)

biochimiques parallèles à celles du métabolisme central, non consommatrices d'énergie et qui permettent de synthétiser les intermédiaires manquants au développement normal des processus biochimiques. Les principales voies anaplérotiques sont schématisées figure I.9.

I.1.6.1. Le cycle du glyoxylate (CG).

a. Biochimie.

Cette voie biochimique parallèle au TCA n'existerait pas lors du catabolisme du glucose car la synthèse des enzymes impliquées ne serait pas induite. Sur acétate, en revanche, le cycle est actif ce qui s'explique simplement par le fait que le shunt glyoxylique autorise la synthèse des acides organiques du TCA à partir de l'AcCoA, la seule molécule disponible sur acétate. La première étape du shunt glyoxylique est la production de glyoxylate et de succinate à partir d'une molécule de citrate par l'isocitratélyase (ICL). La malate synthase (MS) catalyse ensuite l'addition du glyoxylate et d'une autre molécule d'AcCoA pour former un malate. Ce dernier entre ensuite dans le TCA pour conduire à l'OA, qui lui-même peut donner du citrate, de l'aspartate, du PEP, du pyruvate... pour alimenter le métabolisme cellulaire.

L'ICL est fortement inhibée par le glyoxylate, par de nombreux intermédiaires du TCA (OA, malate, KG, succinate) dont les effets seraient additifs. Chez *Escherichia coli*, la synthèse et l'activité de l'ICL sont réprimées et inhibées par le PEP. Ceci expliquerait que le shunt glyoxylique ne fonctionne pas sur le glucose. Chez *Brevibacterium flavum*, Osaki et Shii (1968) montrent les mêmes caractéristiques de l'ICL, excepté l'inhibition par le PEP. Shii et coll. (1961) proposent une répression de l'ICL par le glucose et sa dérépression sur acétate, plutôt que l'hypothèse généralement admise d'une induction de la synthèse de l'ICL sur acétate. En revanche, à l'aide de cultures de *Corynebacterium glutamicum* en réacteur continu sur acétate ou pyruvate, Daridon (1988) propose respectivement une induction de l'ICL par un composé proche de l'acétate (Acétyl-phosphate, AcCoA, citrate...) et une inhibition par un composé proche du pyruvate (PEP ou pyruvate lui-même).

La présence du cycle glyoxylique sur glucose reste cependant une question débattue, Shii et coll. (1959) détectent une activité ICL dans des extraits acellulaires de *Brevibacterium flavum* cultivé sur glucose. De même, des études RMN-¹³C du métabolisme du glucose lors de la production de glutamate chez *Microbacterium ammoniaphilum* proposent une participation significative du cycle glyoxylique, invoquant les enrichissements C₂ et C₃ du glutamate. En revanche, Vallino et Stephanopoulos (1990 et 1993) de même que Schrupf et coll. (1992) ne détectent qu'une très faible activité du cycle glyoxylique dans des extraits acellulaires de *Corynebacterium glutamicum* cultivé sur glucose. D'autres auteurs (Reinscheid et coll., 1994, Rollin et coll., 1995) obtiennent également un pourcentage faible par RMN-¹³C pour des souches voisines, qu'ils attribuent à l'erreur de calcul. Tous ces auteurs concluent donc un cycle glyoxylique non fonctionnel sur glucose.

b. Répartition Cycle de Krebs et Cycle Glyoxylique.

La répartition du flux carboné entre TCA et cycle glyoxylique repose sur les régulations de l'ICDH et de l'ICL pour l'utilisation du substrat commun, l'isocitrate. Les études expérimentales montrent que la part TCA est généralement deux fois plus élevée que celle du cycle glyoxylique.

Une régulation complexe et toujours non entièrement élucidée a été proposée par Holms (1986) chez *Escherichia coli*. Une première constatation, qui favorise le TCA, est l'affinité beaucoup plus forte de l'ICDH pour l'isocitrate que l'ICL. En second lieu, l'ICDH dispose d'un mécanisme d'inactivation/activation par phosphorylation/déphosphorylation grâce à une unique enzyme bifonctionnelle : l'ICDH kinase/phosphatase. Cette dernière est inhibée dans son action phosphorylatrice - voire stimulée dans son action déphosphorylatrice - par de nombreux effecteurs (citrate, isocitrate, KG, OA, F6P, 3PG, PEP, Pyr, AMP, ADP, NADP, NADPH). Tous ces composés coucourent à activer l'ICDH, et donc à supprimer le cycle glyoxylique sur glucose. Lorsque ce dernier s'épuise, l'acétate devient substrat et réactive le cycle glyoxylique. L'OA et le glyoxylate inhibent fortement l'ICDH, mais au fur et à mesure de la synthèse des acides organiques du TCA, l'ICDH est progressivement réactivée par déphosphorylation et l'ICL inhibée. Le shunt glyoxylique s'arrête provoquant une réorientation complète du flux vers le TCA. Lorsque les intermédiaires du TCA s'épuisent, le shunt glyoxylique est à nouveau réactivé.

Chez *Brevibacterium flavum*, les mécanismes semblent similaires, bien que le système de phosphorylation/déphosphorylation de l'ICDH n'a jamais été démontré. La différence d'affinité pour l'isocitrate de l'ICDH et de l'ICL et les régulations classiques suffiraient à assurer la répartition 2/3 1/3 entre TCA et cycle glyoxylique (Ozaki et Shii, 1968). Chez *Corynebacterium glutamicum* cultivé en réacteur continu sur acétate ou pyruvate, Daridon (1988) propose que le PEP joue un rôle central dans la répartition entre ces deux voies, en activant l'ICDH et en inhibant l'ICL.

I.1.6.2. La PEP Carboxylase (PC).

La PEP Carboxylase catalyse la conversion irréversible du PEP en OA avec fixation d'un CO₂ et libération d'un phosphate inorganique. Son rôle anaplérotique se justifie par la production d'OA, intermédiaire du TCA et précurseur de la synthèse des acides aminés de la famille aspartate.

Chez *Escherichia coli*, l'activité PC a été détectée sur glucose, fructose, gluconate et pyruvate, mais pas sur fumarate ni acétate (Holms, 1986). Ceci suggère que la PC est une enzyme glycolytique qui n'intervient pas sur les substrats gluconéogéniques (ce qui est pleinement en accord avec l'irréversibilité de la réaction). La PC est inhibée par l'aspartate et le malate, et activée par l'AcCoA (diminue le Km par le PEP), le F1,6P-diP, le GTP, le ppGpp ainsi que par un certain nombre d'acides gras (Chao et Liao, 1993). La régulation au niveau du gène n'est pas encore élucidée. Le gène ppc a été cloné chez *Escherichia coli*, et sa surexpression sur milieu minimum avec le glucose

comme source de carbone n'a aucun effet sur la vitesse de croissance, ni sur la vitesse de consommation d'O₂, augmente le rendement de production de biomasse par rapport au glucose, diminue la consommation du glucose et la production de métabolites (Chao et Liao, 1993). D'une manière générale, cette surproduction de la PC permet une meilleure utilisation de la source de carbone pour la croissance.

Comme pour de nombreux autres microorganismes, la PC a été mise en évidence chez les Corynébactéries. Ses propriétés cinétiques ont été étudiées chez *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium flavum* et *Corynebacterium lactofermentum* (Jetten et coll., 1994b). La PC apparaît inhibée par l'aspartate et stimulée par l'AcCoA (par abaissement du Km pour le PEP comme chez *Escherichia coli*). Ces résultats sont en accord avec d'autres expériences réalisées chez *Corynebacterium flavum* (Mori et Shioo, 1985). Chez *Brevibacterium flavum*, Ozaki et Shioo (1968) ont identifié d'autres inhibiteurs tels que la thréonine et divers acides organiques intermédiaires du TCA (citrate, isocitrate, cétooglutarate, succinate, malate...). Enfin, Shioo et Ujigawa (1978) proposent une inhibition et une répression par le glutamate et l'aspartate (voir paragraphe sur le glutamate et l'aspartate).

Shioo et Ujigawa (1978) ont isolé un mutant PC⁻ de *Brevibacterium flavum* incapable de se développer sur glucose, ce qui semble indiquer un rôle indispensable de cette enzyme. Mais ce mutant est également auxotrophe pour le glutamate et l'aspartate, et il est probable que la technique de mutagénèse "au hasard" ait affectée d'autres fonctions vitales. Des études plus récentes ont permis d'obtenir des mutants PC⁻ de *Corynebacterium glutamicum* par mutagénèse dirigée (Peters-Wendisch et coll., 1993). Non seulement cette mutation n'affecte pas la croissance sur glucose (ni sur aucun des autres milieux testés) mais elle n'affecte pas non plus les paramètres cinétiques de croissance, ni de production de lysine. En résumé, cette mutation n'a aucun effet. Des résultats identiques ont été obtenus par Gubler et coll. (1994b) chez *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium lactofermentum* surproducteur de lysine.

I.1.6.3. Autres voies anapérotiques.

Dans le métabolisme central, un certain nombre d'autres réactions anapérotiques ont été identifiées chez divers microorganismes. Elles se résument à des réactions autour de l'OA et sont présentées ci-dessous (figure I.9) :

- 1) PEP Carboxykinase : $PEP + CO_2 \text{ ----> } OA + GTP$
- 2) PEP Carboxytransphosphorylase : $PEP + CO_2 + Pi \text{ ----> } OA + PPi$
- 3) Pyruvate Carboxylase : $Pyr + HCO_3^- + ATP \text{ ----> } OA + ADP + Pi$
- 4) l'OAA Decarboxylase : $OA \text{ ----> } Pyr + CO_2$
- 5) Enzyme Malique : $Pyr + CO_2 + NADPH_2 \text{ ----> } Malate + NADP^+$

a. La PEP Carboxykinase (PEPCK).

La PEPCK catalyse une réaction parallèle à celle de la PEP Carboxylase. Chez *Escherichia coli*, l'enzyme utilise de l'ADP et doit être activée par les ions Ca^{2+} . Elle est fortement inhibée par l'ATP (dans le sens de synthèse de l'OA) et par le PEP, ce qui en fait une enzyme de gluconogénèse par excellence (Chao et Liao, 1993 ; Medina, 1990). L'activité PEPCK est ainsi détectée sur fumarate et acétate, mais pas sur glucose, fructose, gluconate ou pyruvate (Holms, 1986). Le gène de la PEPCK a été cloné chez *Escherichia coli* et sa surexpression lors du métabolisme du glucose réduit de 40% la vitesse de croissance, la vitesse de consommation du glucose, le rendement de croissance et de moitié la vitesse de consommation de l' O_2 . En revanche, cette surexpression augmente la production de métabolites tels que l'acétate et le pyruvate (Chao et Liao, 1993) et semble donc favoriser la production de métabolites au détriment de la croissance. Les mécanismes responsables ne sont pas encore connus.

L'activité PEPCK a récemment été recherchée pour trois souches de Corynébactéries (*Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium flavum* et *Corynebacterium lactofermentum*) par Jetten et Sinskey (1993). Elle a été détectée dans des extraits acellulaires pour les trois souches lors de la croissance sur lactate, mais seulement chez *Corynebacterium glutamicum* cultivé sur glucose. De même, Shiiio et Ujigawa (1978) n'ont pu mettre en évidence l'activité PEPCK chez *Brevibacterium flavum* cultivé sur glucose. Chez un mutant PEPC^- de *Corynebacterium glutamicum*, Gubler et coll. (1994b) observent une progression de l'activité PEPCK, ce qui en fait un candidat idéal pour se substituer à la déficience en PEPC pour la synthèse d'OA lors du métabolisme du glucose.

La PEPCK de *Corynebacterium glutamicum* cultivé sur glucose a été partiellement purifiée pour des études cinétiques. L'enzyme se révèle totalement dépendante de l'IDP (et non de l'ADP comme chez *Escherichia coli*) et de la présence des ions Mg^{2+} lors de la formation d'OA. Elle n'est pas stimulée par l'AcCoA et n'est pas inhibée par l'ADP. En revanche, l'ATP inhibe fortement la formation de l'OA (Jetten et Sinskey, 1993). Le caractère gluconogénique apparaît à nouveau clairement. D'autres études confirment ces résultats (Peters-Wendisch et coll., 1993 ; Jetten et coll., 1994b).

En conclusion, la PEPCK détectée uniquement sur Glucose chez *Corynebacterium glutamicum* paraît remplir un rôle néoglucogénique mais semble capable de se substituer efficacement à la PEPC en cas de déficience de cette dernière.

b. L'Enzyme Malique (EM).

Parfois appelée malate déshydrogénase (induisant des risques de confusion avec une autre enzyme) elle catalyse la transformation réversible de décarboxylation du malate en pyruvate avec libération d'un coenzyme réduit. Chez *Escherichia coli*, deux enzymes maliques différentes ont été identifiées. Une première NAD spécifique, constitutive, inhibée par le CoA, l'ATP et l'AMPc, et activée par l'aspartate (Sanwal, 1970). Une seconde, NADP spécifique, réprimée sur glucose et induite sur malate. Elle est inhibée par le NADH, le NADPH, l'AcCoA, l'OA et l'AMPc (Sanwal et Smando, 1969 ; Sanwal et coll., 1968). Cette dernière enzyme semble également impliquée dans le métabolisme de l'acétate en présence d'un TCA incomplet (Holms, 1986). Elle apparaît donc plutôt comme une enzyme de type gluconéogénique.

L'enzyme malique NADP dépendante a également été détectée chez *Brevibacterium flavum* lors du métabolisme du glucose. Cette activité enzymatique, dépendante de la présence des ions K⁺, semble trop faible pour assurer la formation du pyruvate nécessaire à la croissance sur glucose, mais serait très élevée lors de la croissance sur glutamate (Shiio et coll., 1960b). Rollin et coll. (1995) ont également détecté cette activité enzymatique chez *Corynebacterium melassecola* sur glucose, alors que Shiio et Ujigawa (1978) n'ont pu la mettre en évidence chez *Brevibacterium flavum*.

Le rôle de l'enzyme malique reste ainsi ambigu. Elle serait plutôt impliquée dans le métabolisme gluconéogénique, hypothèse renforcée par le fait que son activité apparaît généralement en fin de fermentation, après des conditions particulières conduisant à un excès de malate (Cocaign, 1992) ou sur des substrats gluconéogéniques.

c. L'Oxalo Acétate Décarboxylase (OADC).

Cette enzyme est responsable de la décarboxylation irréversible de l'OA en pyruvate sans intervention de coenzyme. D'après Mori et Shiio (1987a), l'OADC ne serait pas impliquée dans le catabolisme du glucose chez *Brevibacterium flavum*. Si l'activité OADC a été détectée chez la souche sauvage, elle est très réduite chez un mutant PK⁻. Ces observations sont tout à fait en accord avec les résultats plus récents de Jetten et coll. (1994b) qui montrent que chez *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium flavum* et *Corynebacterium lactofermentum*, l'activité OADC n'a jamais pu être séparée de l'activité PK. Ils attribuent ainsi l'activité OADC à la PK elle-même, laissant sans réponse la question de l'existence d'une "vraie" OADC.

d. La Pyruvate Carboxylase (PyrC).

La pyruvate carboxylase catalyse l'addition d'un CO₂ sur le pyruvate pour former l'OA. Cette enzyme est ATP dépendante. Aucune activité Pyruvate Carboxylase n'a pu être détectée chez

Corynebacterium glutamicum (Peters-Wendisch et coll., 1993 ; Vallino et Stephanopoulos, 1994b ; Jetten et coll. , 1994b ; Gubler et coll., 1994b) *Corynebacterium flavum* ou *Corynebacterium lactofermentum* (Jetten et coll. , 1994) cultivées sur glucose ou sur lactate. En revanche, Rollin et coll. (1995), ont mis en évidence cette activité enzymatique chez *Corynebacterium melassecola*.

e. La PEP Carboxytransphosphorylase et PEP Synthétase.

La première activité enzymatique permet la conversion du PEP en OA par fixation d'un CO₂ et libération de pyrophosphate. Elle n'a encore jamais été détectée chez les Corynébactéries.

La seconde transforme le pyruvate en PEP avec consommation d'un ATP et production d'un AMP. Cette activité a été détectée chez *Escherichia coli* (Neidhardt, 1987) ainsi que chez *Corynebacterium glutamicum* cultivé sur glucose (Jetten et coll., 1994b). Elle est inhibée par le PEP et l'AMP et stimulée par l'ATP. Elle présente donc un caractère gluconogénique typique en plus de son rôle anaplérotique.

Avant de conclure sur les voies anaplérotiques, il faut encore mentionner les travaux de Coccagn-Bousquet et coll. (1996) sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en culture continue sur glucose. Ils remettent en cause la suprématie reconnue de la PC et proposent, suite à des dosages d'activités enzymatiques, l'intervention des enzymes suivantes : une PC majoritaire à faibles taux de dilution (inférieurs à 0,15 h⁻¹), cédant la place à l'enzyme malique jusqu'à une vitesse de croissance de 0,33 h⁻¹, pour être finalement remplacée par une activité de type OADC aux forts taux de dilution. Cette cascade nécessite un changement de "substrat anaplérotique", passant du PEP au pyruvate lorsque la vitesse de croissance augmente.

Conclusion :

Les connaissances sur la plupart de ces voies anaplérotiques apparaissent encore fragiles et nécessitent quelques approfondissements. Il semblerait que chez les Corynébactéries cultivées sur glucose :

- le shunt glyoxylique n'est pas actif, par répression de la synthèse des enzymes concernées.
- la PEP carboxylase est présente et active.
- la PEP carboxykinase, l'enzyme malique et la PEP synthétase sont inactives puisqu'elles interviennent dans le métabolisme néoglucogénique. La PEP carboxykinase et l'enzyme malique pourraient cependant pallier une déficience de la PEP carboxylase.
- l'OADC n'a pas encore été réellement mise en évidence. Cette activité serait confondue avec celles des autres enzymes pouvant remplir la même fonction telle que la PK par exemple.
- la pyruvate carboxylase de même que la PEP carboxytransphosphorylase n'ont pas été détectées.

I.1.6.4. Répartition du flux carboné au PEP.

La répartition entre PK et PEP semble guidée par les propriétés cinétiques. La PK montre une cinétique de type allostérique avec une vitesse de réaction maximale obtenue pour 2 mM de PEP, et une activité fortement stimulée par l'AMP. La PEP carboxylase montre une faible affinité pour le PEP en absence d'AcCoA. En revanche, l'activité PEPC est stimulée dès 0,1 mM d'AcCoA et augmente d'un facteur 5 avec 2 mM d'AcCoA. Ceci suggère donc un flux préférentiel via la PK (métabolisme énergétique et croissance) rapidement détourné via la PEPC (métabolisme de production (Jetten et coll., 1994b)).

La RMN-¹³C du métabolisme du glucose permet d'apprécier le pourcentage de répartition au nœud PEP. Cependant, aucune distinction ne peut être faite entre les différentes voies anaplérotiques car elles conduisent au même type d'enrichissement isotopique. On distinguera donc globalement entre la glycolyse ("PTS + PK") et les voies anaplérotiques. Cette répartition sera notée "PK/PC". Rollin et coll. (1995) proposent une répartition "PK/PC" de 62%/38% en phase de croissance sur glucose ou sur fructose chez *Corynebacterium melassecola*. Les études RMN de Sonntag et coll. (1995) sur des cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum* sur glucose conduisent à une participation des voies anaplérotiques de 24% en croissance, 36% en production de glutamate et 34% en production de lysine. En comparant avec les simulations d'un modèle métabolique, ces auteurs montrent également qu'une forte activité réverse de ces réactions est nécessaire *in vivo* pour satisfaire les données expérimentales. Ceci conduit à un flux réel des voies anaplérotiques *in vivo* nettement supérieur aux valeurs présentées.

Des méthodes de modélisation pure chez *Corynebacterium glutamicum* proposent 77%/22% (Dominguez et coll., 1993) pour PK/PC avec ici un rôle anaplérotique exclusivement rempli par la pyruvate carboxylase. De même pour Coccagn-Bousquet et coll. (1996) qui avancent une répartition de 76%/24% pour la croissance en culture discontinue sur glucose. D'autres études de modélisation (Vallino et Stephanopoulos, 1994b) postulent une répartition "PK/PC" égale à 76%/23% en conditions normales de croissance (phase exponentielle) et 81%/19% dans le cas où le métabolisme est perturbé par le fluoro-pyruvate (inhibition temporaire et réversible de la Pyruvate Déshydrogénase). A l'aide de cultures continues et de la modélisation intracellulaire, Kiss et Stephanopoulos (1991) étudient l'évolution du rapport "PEP ---> OAA / enzyme PEP" en fonction du temps de culture. Ce rapport est trouvé constant à 25% pour des valeurs de vitesse de croissance allant de 0,05 à 0,4 h⁻¹. Ceci indique une répartition "PK/PC" constante de 75%/25%. Toutes ces valeurs (extrêmement cohérentes) permettent de dire que le nœud PEP est sévèrement contrôlé (nœud rigide) pour assurer cette répartition quasi constante de 3/4 : 1/4 entre glycolyse et voies anaplérotiques.

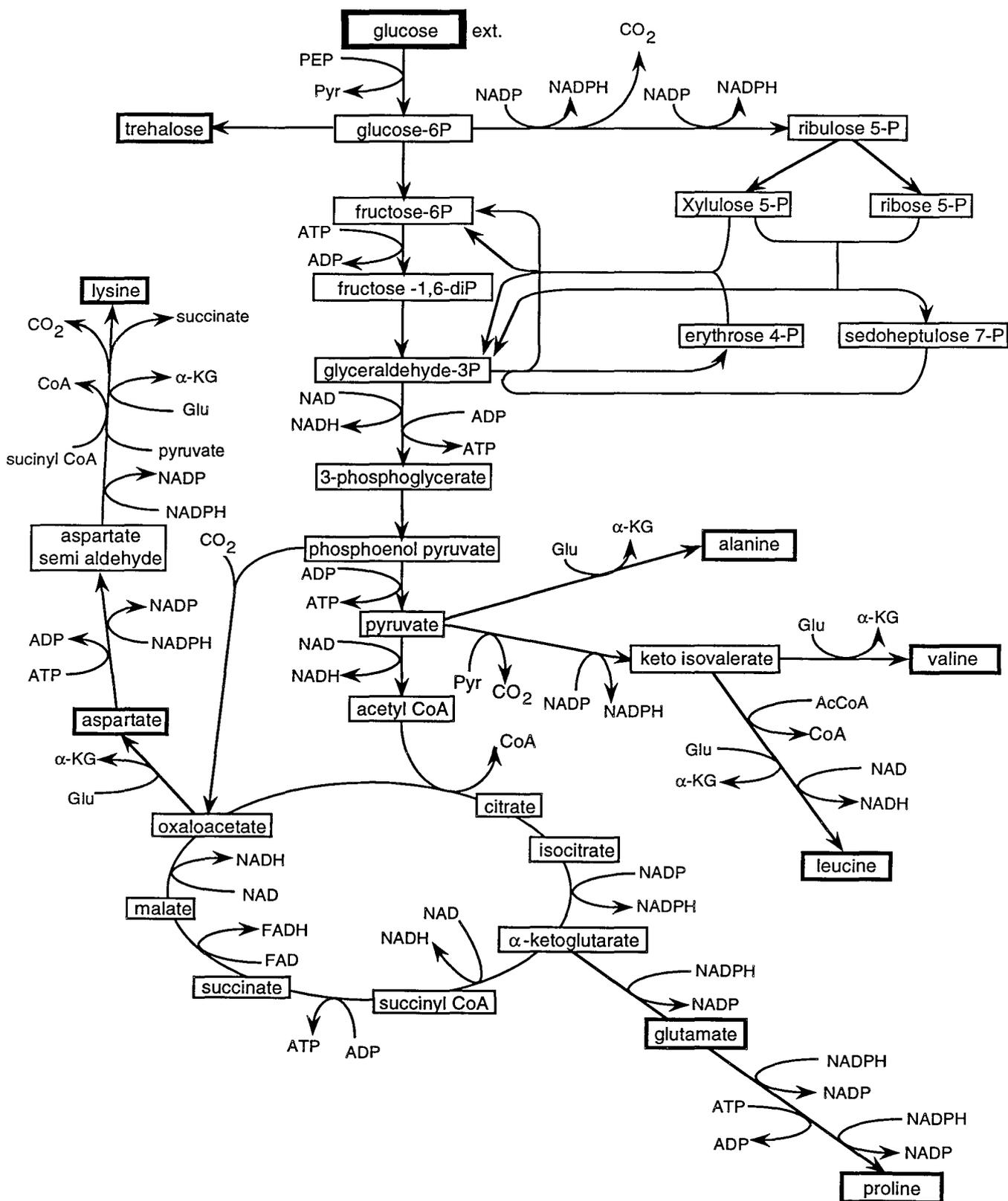


Figure I.10 : Biosynthèse des métabolites primaires chez les Corynebactéries.

I.2. Les voies de biosynthèse des métabolites primaires.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux métabolites détectés lors des cultures des Corynébactéries sur glucose, c'est à dire tréhalose, lactate, acétate et bien entendu les acides aminés : glutamate, aspartate, lysine, alanine, valine et leucine. Les voies de biosynthèse sont schématisées sur la figure I.10. En ce qui concerne les acides aminés, les Corynébactéries présentent des voies métaboliques peu compliquées (pas d'isoenzyme) avec des régulations simplifiées par rapport à d'autres bactéries. Ce sont donc des microorganismes de choix pour la production industrielle.

I.2.1. Lactate, Acétate et Succinate.

Ces métabolites apparaissent essentiellement lors de limitation en oxygène (Dominguez et coll., 1993). Le succinate est directement produit par le TCA, l'acétate est dérivé de l'AcCoA et le lactate est synthétisé à partir d'un pyruvate et d'un NADH grâce à la lactate déshydrogénase. Cette dernière est activée par le Fructose 1,6-diphosphate (Cocaign, 1992). Ces métabolites sont généralement reconsommés dès que l'oxygénation redevient suffisante.

I.2.2. Tréhalose.

La synthèse du tréhalose provient de la condensation de deux glucoses 6-phosphate grâce à une tréhalose synthétase. Le rôle du tréhalose est encore discuté. Il paraît évident qu'il intervient dans la synthèse des parois, mais certains auteurs lui prêtent également un rôle de composé de réserve (Wojcik, 1992). Il est à noter que le tréhalose ne peut pas servir de source de carbone et d'énergie, les Corynébactéries ne possédant pas de tréhalase. D'autres études montrent que la synthèse de tréhalose constitue un second système de lutte contre les stress hyperosmotiques lorsque le système de base "Glutamate/Proline" est déficient (Guillouet, 1996). Dans les conditions normales de croissance, la synthèse de tréhalose est relativement faible. Les systèmes de régulation n'ont pas encore été étudiés.

I.2.3. Glutamate et Proline.

I.2.3.1. Glutamate

Le glutamate est un acide aminé clé du métabolisme cellulaire. Il peut être incorporé dans les protéines, mais il sert également de substrat à la synthèse d'autres acides aminés (glutamine, proline) et de donneur de groupement ammonium (aspartate, lysine...). La biosynthèse du glutamate à partir du glucose s'effectue via la glycolyse puis le cycle de Krebs jusqu'à l' α -cétoglutarate. Ce dernier peut ensuite être utilisé par différentes enzymes pour former le glutamate. Chez les microorganismes, cinq réactions biochimiques peuvent conduire au glutamate (figure I.11) :

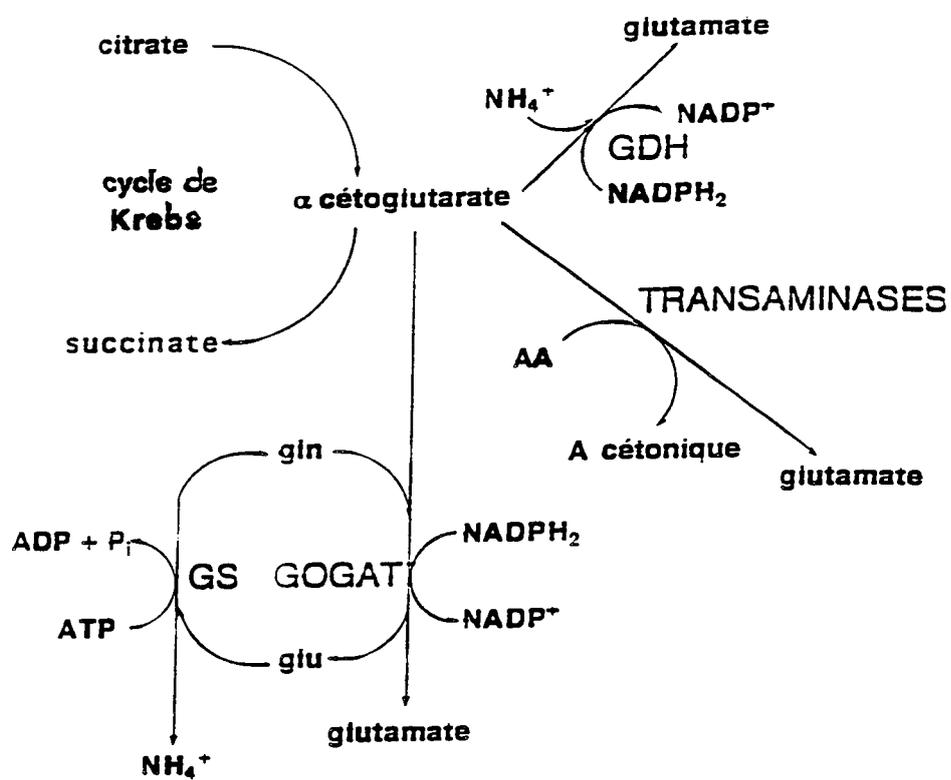


Figure I.11 : Voies de synthèse du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate.
 (D'après Delaunay, 1995) AA, acide aminé

1) la glutamate déshydrogénase (GDH) :



2) la glutamine amide 2-oxoglutarate amino-transférase (GOGAT) ou encore glutamate synthase :



Or la synthèse de glutamate via la GOGAT requiert la participation d'une activité glutamine synthétase (GS) :



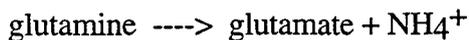
Le bilan des activités GS / GOGAT conduit donc à :



3) les transaminases :



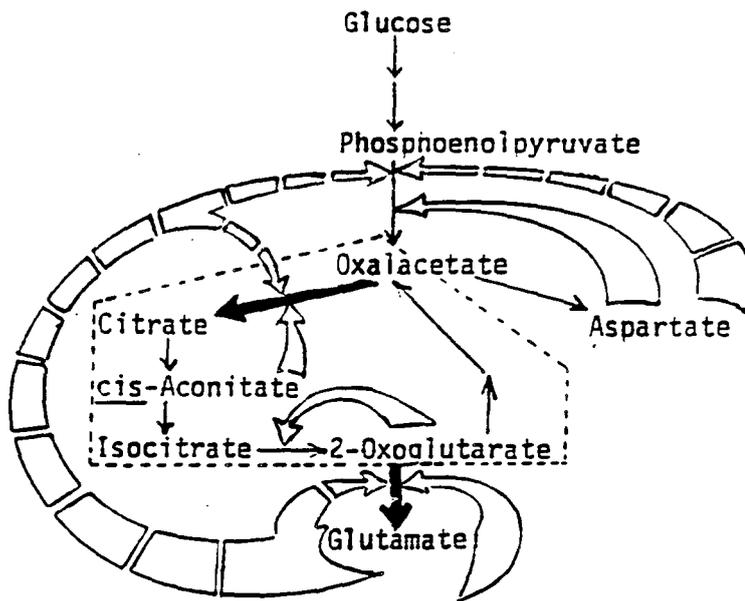
4) la glutaminase



5) diverses activités enzymatiques de dégradation des acides aminés (proline, arginine, histidine).

Les trois premières activités enzymatiques sont plus ou moins importantes selon les espèces bactériennes, et les deux dernières sont généralement considérées comme des voies de sauvetage qui ne sont pas utilisées par la cellule dans des conditions normales (Bostford et coll. 1994). Chez *Bacillus megaterium*, seule la GOGAT semble intervenir dans la synthèse du glutamate (Meers et coll., 1970), mais la plupart des microorganismes semblent posséder à la fois les activités GDH et GOGAT. C'est le cas d'*Escherichia coli* (Ankri, 1991), de *Klebsiella aerogenes* (Brenchley, 1972), mais aussi de *Brevibacterium flavum* (Sung et coll., 1984) et de *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992). Sung et coll. (1984) ont mesuré les trois activités enzymatiques GDH, GS/GOGAT et transaminases à partir d'extraits bruts de *Brevibacterium flavum* et il apparaît que la GS est largement plus active que la GOGAT et la GDH. Les travaux de Delaunay (1995) chez *Corynebacterium glutamicum* mettent également en évidence ces trois activités, mais avec une prépondérance pour la GDH puisque son activité représente 60 à 70 % de la somme des trois activités. Enfin, lors d'une culture en condition de production de glutamate, Delaunay montre une augmentation de la synthèse de GDH.

Chez les Corynébactéries, la GDH est spécifique du NADPH, l'enzyme étant inactive en présence de NADH uniquement (Oshima et coll., 1964 ; Shio et coll., 1970 ; Ankri, 1991). L'affinité relativement faible de la GDH des bactéries glutamiques pour l'ammonium suggère que l'enzyme n'est pas active aux faibles concentrations d'ammonium (Rosenberg et Brenchley, 1983). D'autre part, le glutamate est inhibiteur de l'activité GDH dès les plus faibles concentrations chez *Brevibacterium flavum* et chez *Corynebacterium glutamicum*, de même qu'il réprime la synthèse de la GDH (Shio et coll., 1970 ; Ankri, 1991). D'autres études proposent un rôle inhibiteur, mais dans une moindre mesure, du NADP sur l'activité GDH (Ertan, 1992). La GDH est supposée être



Regulation of glutamate and aspartate biosyntheses in *Brevibacterium flavum*. \rightleftharpoons , feedback inhibition (6, 8, 10, 11); $\square \rightleftharpoons$, feedback repression; \Rightarrow , preferential conversion \square , amphibolic pathway.

Figure I.12 : Régulation de la biosynthèse du glutamate (d'après Shiio et Ujigawa, 1978).

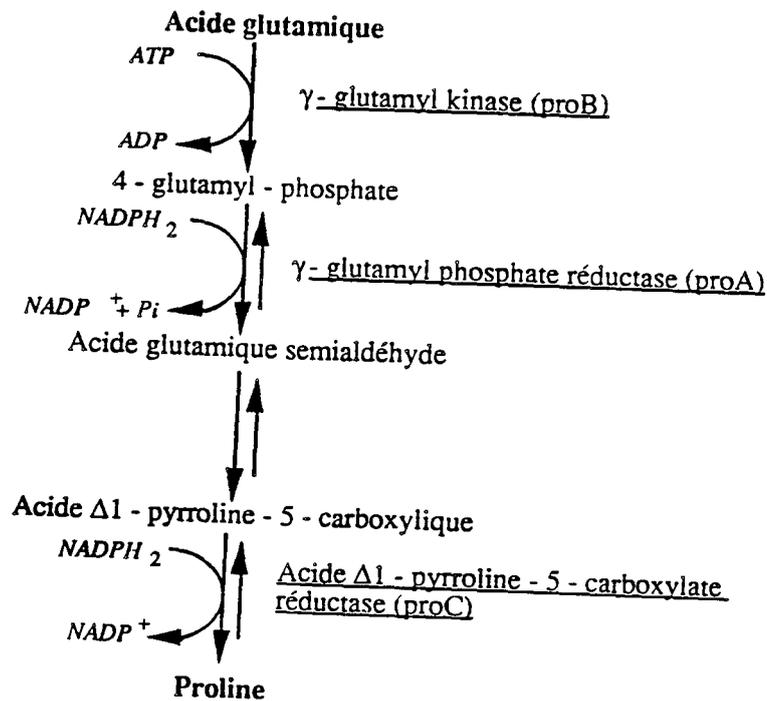


Figure I.13 : Biosynthèse de la proline à partir de l'acide glutamique.

l'activité enzymatique prépondérante pour la synthèse du glutamate *in vivo*. Cependant, Börman El Kholy et coll. (1993) ont montré qu'un mutant *gdh⁻* de *Corynebacterium glutamicum* pouvait croître normalement, montrant alors une forte activité GOGAT.

Le système GS / GOGAT n'a que peu été étudié en raison de son instabilité. Il a été mis en évidence chez *Corynebacterium glutamicum* par Börman-El Kholy (1993). Il semblerait que le glutamate et le NADP soient inhibiteurs de l'activité GOGAT, dépendant fortement de la souche considérée et que la synthèse de la GOGAT soit réprimée par les ions ammonium.

Les transaminases interviennent surtout dans le catabolisme du glutamate mais leur activité est réversible. L'activité transaminasique prépondérante chez *Brevibacterium flavum* et chez *Corynebacterium glutamicum* est l'aspartate transaminase (Shiio et Ujigawa, 1978 ; Ankri, 1991) qui catalyse la réaction $\alpha\text{-KG} + \text{aspartate} \rightarrow \text{glutamate} + \text{OA}$. Des activités faibles de la phénylalanine amino-transférase et de l'alanine transaminase ont également été trouvées chez les Corynébactéries (Shiio et coll., 1982 ; Kimura, 1962), mais leur rôle dans la synthèse du glutamate n'a pas été étudié.

Très peu de données sont disponibles concernant les régulations et les synthèses de ces enzymes. Une régulation essentielle de l'activité ou de la synthèse respective de ces enzymes semble donc être la présence des ions ammonium. D'après Meers et coll. (1970), la synthèse de GDH est réprimée en dessous de 1 mM, alors que celle du système GS/GOGAT est réprimée au dessus de 1 mM. On observe par ailleurs que chez *Brevibacterium flavum* cultivé sur glutamate comme seul donneur d'azote (limitation ammonium progressive), le niveau de GOGAT augmente (Sung et coll., 1984). Mais Delaunay (1995) n'a pas pu mettre en évidence l'effet ammonium, la synthèse de GDH n'étant pas réprimée lors d'une culture continue en limitation ammonium.

Shiio et Ujigawa (1978) proposent un schéma de régulation de la synthèse du glutamate et de l'aspartate (figure I.12). Le mécanisme repose sur une inhibition et une répression au niveau de la GDH par le glutamate, une répression de la synthèse de la citrate synthase et de la phospho-énol-pyruvate carboxylase par le glutamate, et enfin, une inhibition et une répression au niveau de la phospho-énol-pyruvate carboxylase par l'aspartate. La séquence des événements est typique d'un "mécanisme de contrôle préférentiel" : le flux carboné arrivant de la PEPC est orienté vers la synthèse du glutamate grâce à une affinité plus forte de l'oxalo-acétate pour la citrate synthase plutôt que pour l'aspartate transaminase, et de l' α -cétoglutarate pour la GDH plutôt que pour le complexe α -KGDH. L'accumulation de glutamate provoque une rétro-inhibition et une répression au niveau de la GDH, de la PEPC et de la CS. Le flux carboné est ainsi réorienté vers la synthèse d'aspartate. L'accumulation de ce dernier exerce alors une rétro-inhibition et une répression au niveau de la PEPC. Les intermédiaires du CK, le glutamate et l'aspartate s'épuisent et on retrouve l'état initial.

Il semblerait enfin que le chlorure de sodium et le chlorure de potassium aient une action inhibitrice sur l'activité GDH, mais pas sur celle de la GOGAT (Delaunay, 1995).

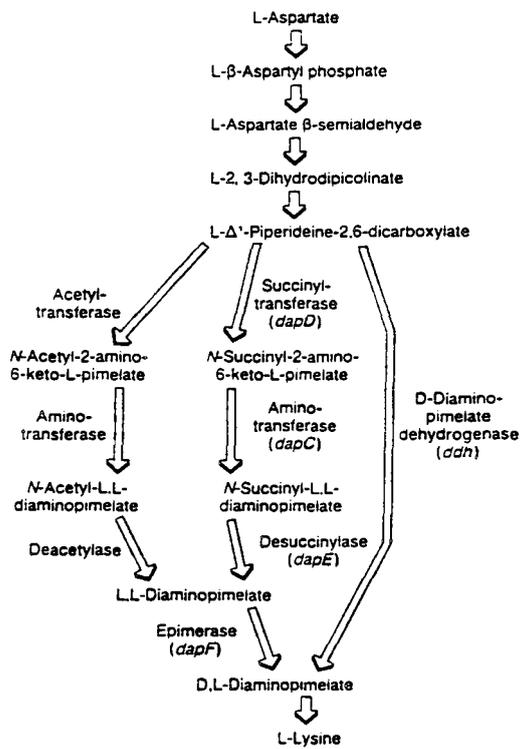


Figure I.14 : Biosynthèse de la lysine à partir de l'aspartate.
(D'après Sahm, 1995)

I.2.3.2. Proline

La proline est synthétisée à partir du glutamate selon le schéma proposé en figure I.13. Des voies de substitution ont été mises en évidence et font l'objet d'études approfondies (Serebrijski et coll., 1995). Seule une rétroinhibition de la glutamyl-kinase par la proline a été mise en évidence.

I.2.4. Aspartate et Lysine.

I.2.4.1. Aspartate.

L'aspartate est obtenu à partir de l'oxalo-acétate en une seule étape catalysée par l'aspartate transaminase. Chez *Brevibacterium flavum*, cette enzyme est essentielle à la formation d'aspartate puisqu'un mutant déficient en aspartate transaminase ne peut croître sans apport extérieur d'aspartate (Shiio et Ujigawa, 1978). L'aspartate exerce une action répressive de la synthèse de la PEPC, ainsi qu'un effet inhibiteur de cette enzyme (Shiio et Ujigawa, 1978 ; Daridon, 1988). Il participe ainsi à la régulation concertée de sa propre synthèse et de celle de glutamate selon le schéma proposé par ces auteurs (figure I.12).

I.2.4.2. Lysine.

Chez les Procaryotes, trois voies différentes ont été décrites pour la synthèse de la Lysine (figure I.14). Il s'agit i) de la voie succinylase (implique des intermédiaires succinylés), ii) de la voie acétylase (les intermédiaires sont acétylés et non plus succinylés) et iii) la voie déshydrogénase qui se caractérise par une seule étape enzymatique. Les trois voies ont en commun les quatre premières étapes, menant de l'aspartate au L- Δ^1 -pipérideine-2,6-dicarboxylate avec passage par le L-aspartate semi-aldéhyde (ASA), point de branchement de la synthèse des acides aminés de la famille de l'homosérine (Thr, Met, Ile). Elles partagent également la dernière étape de conversion du D,L-diaminopimélate en Lysine.

La plupart des études menées jusqu'à présent montrent qu'une seule de ces voies est utilisée chez les microorganismes, dépendant de l'espèce considérée. Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté l'existence simultanée des trois voies chez les Corynébactéries. En particulier, Schrumpp et coll. (1991) démontrent à l'aide de la mutagénèse dirigée l'existence des voies succinylase et déshydrogénase chez *Corynebacterium glutamicum*. La mesure des activités enzymatiques dans des extraits bruts indique une activité au moins dix fois supérieure de la deuxième voie par rapport à la première. Ces deux voies existent simultanément et semblent être spécifiques à la production de lysine. Il se pose alors la question de leur utilité relative *in vivo* ainsi que de leur régulation. Les premières expériences menées concluent que la voie déshydrogénase n'est pas nécessaire à la croissance, mais qu'elle est requise pour la surproduction de lysine (Schrumpp et coll., 1991). Des

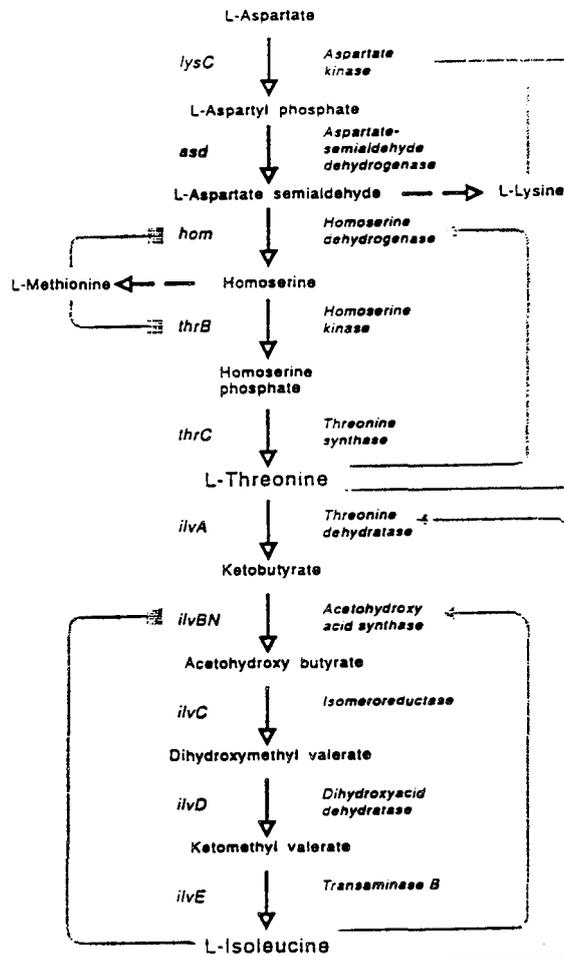


Figure I.15 : Biosynthèse de la thréonine et de l'isoleucine, et régulations.

(D'après Sahm, 1995) —▶ inhibition ; —■ répression

études complémentaires par RMN-¹³C du métabolisme du glucose chez *Corynebacterium glutamicum* surproducteur de lysine montrent une utilisation moyenne de la voie déshydrogénase de 30 à 40% de la quantité totale de lysine synthétisée (Yamaguchi et coll., 1986). Or des études plus fines en cours de culture indiquent que la part de la voie déshydrogénase varie de 72% en début de production à 0% en fin de culture. De plus, il est apparu que le fonctionnement de cette voie est entièrement tributaire de la présence d'ions ammonium (Sonntag et coll., 1993).

Les seules régulations identifiées pour ces différentes voies agissent sur les parties communes. L'aspartate kinase est inhibée par la thréonine et la lysine, et l'aspartate semi aldéhyde déshydrogénase est inhibée par la thréonine ou la lysine. Enfin, la synthèse de la diaminopimélate carboxylase est réprimée par la lysine.

I.2.5. Autres acides aminés.

I.2.5.1. Thréonine et Isoleucine.

Ces deux acides aminés sont également dérivés de l'aspartate. Leurs voies de biosynthèse sont schématisées figure I.15 avec leur régulation pour les Corynébactéries. D'une manière générale, ces acides aminés inhibent la première enzyme de chaque "branche" métabolique. Ainsi, l'aspartate kinase est inhibée par la thréonine (de concert avec la lysine), de même que l'homosérine déshydrogénase. L'isoleucine, quant à elle, inhibe l'homosérine déshydrogénase ainsi que les deux premières enzymes de sa voie de biosynthèse, la thréonine déshydratase et l'acétohydroxy-acide synthase, cette dernière étant également réprimée. La synthèse de l'homosérine déshydrogénase et de l'homosérine kinase serait réprimée par l'addition de méthionine dans le milieu de culture. On notera par ailleurs que seule la thréonine déshydratase est réellement spécifique de la synthèse de l'isoleucine, les quatre autres enzymes de la voie intervenant également dans la biosynthèse de la valine et de la leucine (Sahm et coll., 1995). De plus, la leucine dérègle la synthèse de l'homosérine déshydrogénase et l'active (Cremer et coll., 1988) favorisant la synthèse de thréonine et d'isoleucine. Un certain nombre d'études sur l'amplification de ces voies de production ont été menées avec plus ou moins de succès selon les modifications apportées (Sahm et coll., 1995).

I.2.5.2. Alanine, Valine et Leucine.

Ces trois acides aminés sont dérivés du pyruvate (figure I.10). Aucune donnée spécifique aux Corynébactéries n'a été publiée.

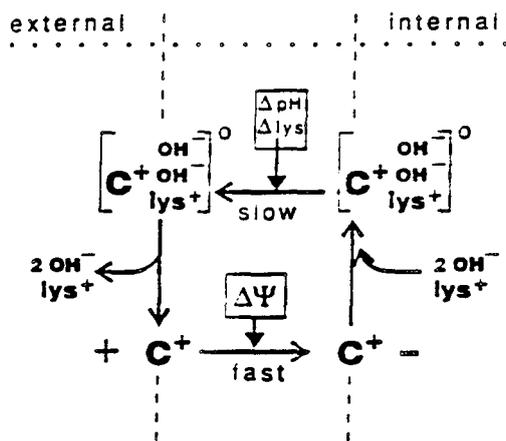


Figure I.16 : Modèle cinétique du système d'excrétion de la lysine chez *Corynebacterium glutamicum* (d'après Bröer et coll., 1991b)

I.2.6. Sécrétion des acides aminés.

Cet aspect de la production des acides aminés a longtemps été négligé pour des raisons plus ou moins justifiées : difficultés d'étude, sous-estimation du rôle réel de la sécrétion... Il était généralement admis que l'excrétion des acides aminés avait lieu par diffusion à travers la membrane, mais des études de plus en plus nombreuses remettent en cause ces idées préconçues. En particulier, des systèmes d'excrétion spécifiques ont été identifiés chez les *Corynebactéries* pour la lysine et le glutamate. L'étude de ces systèmes est d'autant plus importante qu'ils peuvent influencer fortement le métabolisme hyperproducteur s'ils sont consommateurs d'énergie. Une revue présentant la problématique de l'excrétion de métabolite et résumant succinctement les différents modes d'excrétion identifiés chez les bactéries est présentée par Krämer (1994). Cet auteur développe quelques exemples en s'appuyant plus particulièrement sur les *Corynebactéries*.

I.2.6.1. Lysine.

Le système spécifique d'excrétion de la lysine n'a été identifié que très récemment par Bröer et Kramer (1991a). Ce transporteur spécifique est un système de symport avec deux ions OH^- . Les caractéristiques cinétiques ont été étudiées en détail (Bröer et Krämer, 1991b). Il semble que le transporteur soit stimulé par une forte concentration en lysine, et que le potentiel membranaire soit la force motrice de l'excrétion. La vitesse de transport est modulée par le potentiel membranaire, le pH interne et externe et le gradient de lysine (figure I.16). Il semblerait d'autre part que l'excrétion soit stimulée par l'assimilation de dipeptides contenant la lysine (Erdmann et coll., 1993). Le mécanisme paraît simple : une fois assimilé, le dipeptide est clivé et l'augmentation de la concentration en lysine stimule la sécrétion comme indiqué ci-dessus. Mais il a été également constaté que la composition du milieu influence la sécrétion. Des études plus approfondies sur la régulation du transporteur montrent en effet une influence directe de la source de carbone utilisée sur l'activité du transporteur. Un changement de milieu dans la première heure de surproduction de lysine peut d'ailleurs stimuler l'excrétion (Erdmann et coll., 1994).

Finalement, les systèmes d'excrétions de trois souches de *Corynebacterium glutamicum* (une sauvage et deux mutants surproducteurs) ont été étudiés. Ces trois souches présentent des caractéristiques d'excrétion différentes, bien que potentiel de membrane, gradient de lysine et pH soient identiques. Les différences proviennent donc d'autres paramètres régulateurs non identifiés (Bröer et coll., 1993).

I.2.6.2. Glutamate.

Dans des conditions normales de fermentation, *Corynebacterium glutamicum* n'excrète pas de glutamate. La sécrétion doit être induite par des procédés qui semblent affecter l'intégrité membranaire. Parmi ces procédés, on trouve une limitation en biotine, l'addition de surfactants de la

famille des amines, l'addition de pénicilline ou encore la limitation de la synthèse des phospholipides. Le mode de sécrétion a donc été supposé de type passif par altération de la membrane. Cependant, il a été démontré que la membrane conservait ses propriétés vis à vis d'autres composés (H^+ , K^+ , acides aminés, acides carboxyliques) en particulier sous limitation biotine. De plus, l'excrétion pouvait avoir lieu à l'encontre du gradient glutamate, remettant en cause une diffusion passive et indiquant plutôt l'existence d'un transporteur spécifique. L'inversion du transporteur utilisé pour l'entrée du glutamate dans la cellule a parfois été invoquée, mais jamais réellement démontrée. Hoischen et Krämer (1989) proposent un troisième modèle avec l'existence d'un transporteur spécifique à l'excrétion du glutamate. Enfin, des études sur l'effet des surfactants sur des liposomes renforcent les hypothèses d'un transporteur spécifique et/ou d'une diffusion passive sans apporter de réponse définitive (Duperray et coll., 1992).

En conclusion, il apparaît que le ou les mécanismes de sécrétion du glutamate ne sont pas encore bien connus. Deux facteurs semblent indispensables : une surproduction de glutamate et une altération de la membrane plasmique (Krämer, 1994).

I.2.6.3. Autres.

Bien qu'aucune démonstration réelle n'ait été faite, certaines données expérimentales peuvent conduire à supposer que la phénylalanine, le tryptophane et l'isoleucine utiliseraient plutôt la diffusion passive, la lysine, l'aspartate et l'arginine plutôt un transporteur spécifique et d'autres (proline, alanine) un mélange des deux (Krämer, 1994). L'exemple du glutamate prouve cependant la complexité et/ou la multiplicité des systèmes qui entrent en jeu, indiquant qu'il est difficile de se fier aux prévisions.

I.3. Les cycles futiles.

Il est important de mentionner ces réactions biochimiques elles interviennent fortement dans l'évaluation du métabolisme énergétique et dans les conditions réactionnelles réelles au niveau de certaines étapes enzymatiques (Holms, 1986).

Un cycle futile est constitué de deux (ou plus) réactions biochimiques réversibles aboutissant à une dissipation nette de l'énergie cellulaire par la réaction $ATP \rightarrow ADP + P_i$. Si la présence de tels cycles a effectivement été démontrée chez les Eucaryotes, leur existence chez les Procaryotes n'a pas été clairement établie, bien que de nombreuses possibilités existent. L'existence même de ces cycles se justifie par l'hypothèse généralement admise qu'une cellule régule fortement son métabolisme énergétique. Certaines conditions de culture peuvent cependant entraîner des surproductions d'énergie que la cellule ne peut utiliser ni stocker sans modifier profondément son métabolisme (passage d'une

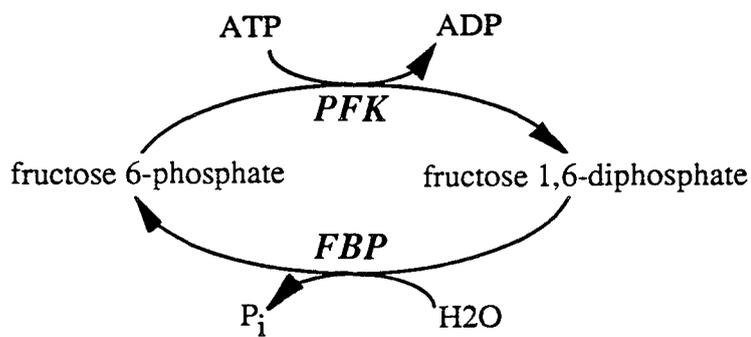


Figure I.17 : Cycle futile engendré par l'action reverse de la phosphofruktokinase (*PFK*) et de la Fructose 1,6-bisphosphatase (*FBP*).

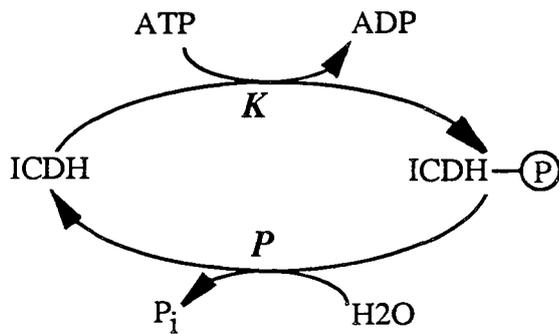


Figure I.18 : Cycle futile engendré par la régulation de l'ICDH pour la répartition du flux carboné entre cycle de Krebs et Cycle glyoxylique. *P*, ICDH phosphatase ; *K*, ICDH kinase.

dynamique globalement catabolique vers l'anabolisme). Il est donc nécessaire d'évacuer le surplus énergétique.

Un exemple typique de cycle futile est constitué par les réactions de phosphorylation pour lesquelles il existe une réaction réversible d'hydrolyse. C'est le cas du couple PFK / FBP (figure I.17). La régulation de l'ICDH chez *Escherichia coli* constitue un autre exemple (figure I.18), qui fait d'ailleurs partie d'un mécanisme plus complexe de régulation du métabolisme énergétique via la réorientation du flux carboné entre TCA (générateur d'ATP) et cycle glyoxylique (non générateur d'ATP).

Si ces cycles futiles peuvent exister transitoirement, leur activité permanente semble improbable. Deux réactions réverses sont généralement soumises à une régulation stricte par la dynamique globale du métabolisme. Lors du catabolisme du glucose par exemple, la Fructose Bisphosphatase est inhibée, de même que le cycle glyoxylique (Holms, 1986).

On notera par ailleurs l'existence d'autres mécanismes dissipateurs d'énergie. Par exemple, la pompe à protons ou ATPase, une enzyme membranaire régulant le pH intracellulaire et qui hydrolyse l'ATP lors du transport des protons. D'autres systèmes de transport peuvent également aboutir à une dissipation nette d'ATP comme la régulation du gradient K^+ chez *Escherichia coli* en limitation K^+ (Tempest et Neijssel, 1992).

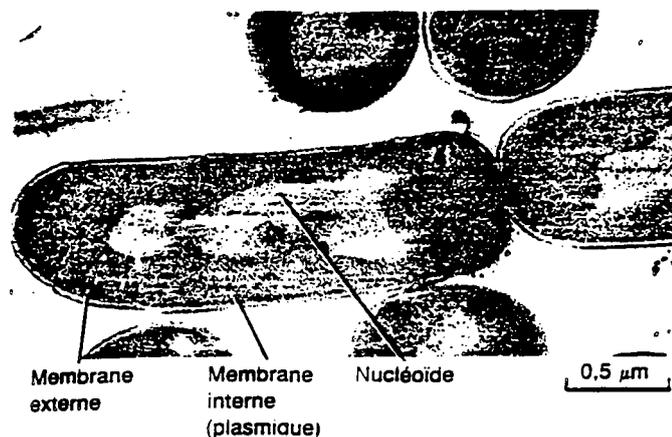


Figure I.19 : Coupe d'*Escherichia coli* montrant la structure d'une cellule bactérienne observée au microscope électronique.

Tableau I.3 : Compositions macromoléculaires comparées de *Escherichia coli* et de *Corynebacterium glutamicum* (en pourcentage massique de matière sèche : g/g de cellule).

	<i>E. coli</i>		<i>C. glutamicum</i>	
	Ingraham (1983)	Péquignot (1995)	Cocaign-Bousquet (1996)	
Protéines	55 %	48 %	52 %	
ARN	20,5	13,5	5	
ADN	3,1	3,5	1	
Lipides	9,1	11	13	
Lipopolysaccharide	3,4	0	0	
Peptidoglycane	2,5	5	19 (a)	
Polyamines	3,4	nd	nd	
Sérine libre	0,5	nd	nd	
Glycogène	2,5	nd	nd	
Glutamate libre	nd	5,5	nd	
Autres :				
Acides teichoïques et mycoliques	0	1,5 (b)	(a)	

(a) ensemble de la paroi (détails non fournis).

(b) non mesurée : valeur adaptée de la littérature.

nd : non déterminé.

La biomasse : *composition et biosynthèse*

On admet généralement que l'ensemble du métabolisme est orienté vers la synthèse de composés cellulaires afin d'assurer le renouvellement des structures internes et de préparer la division. De nombreux facteurs influencent ce processus de reproduction, tels que la biochimie du microorganisme, les cinétiques réactionnelles, les régulations, la composition cellulaire, les nutriments disponibles (source de carbone, d'azote, d'énergie...), les conditions environnementales... Ces facteurs ont été largement étudiés et sont maintenant relativement bien connus, à l'instar des quelques deux milles réactions biochimiques qui participent à la synthèse de la biomasse, en particulier chez les microorganismes modèles tels qu'*Escherichia coli*. Cependant, la modélisation du métabolisme cellulaire et de la synthèse de la biomasse reste une tâche extrêmement difficile à cause de la complexité, de la masse et de la diversité des informations à prendre en compte. C'est pourquoi la plupart des méthodes de modélisation métabolique font appel à des solutions simplifiées, intégrant plus ou moins d'informations, et qui peuvent être adaptées relativement facilement à la souche microbienne étudiée.

L'objectif de ce paragraphe est d'illustrer cette complexité au travers de deux aspects particulier de la composition cellulaire (structure de l'enveloppe et composition macromoléculaire) et de présenter deux approches différentes de modélisation de la synthèse de la biomasse, une approche simplifiée à partir d'un nombre réduit de métabolites précurseurs, et une approche détaillée.

I.4. La composition cellulaire

La figure I.19 présente une coupe d'*Escherichia coli* observée au microscope électronique. On distingue en particulier la masse nucléaire (ADN et ARN), le cytoplasme contenant entre autres des ARN et des protéines, les membranes interne et externe... Tous ces éléments sont communs à la plupart des cellules bactériennes et peuvent être dosés par différentes méthodes analytiques. En revanche, ces structures cellulaires varient dans leur propre composition et dans leurs proportions respectives. Le tableau I.3 présente une comparaison de la composition cellulaire entre *Escherichia coli* et *Corynebacterium glutamicum*. On remarquera en particulier que :

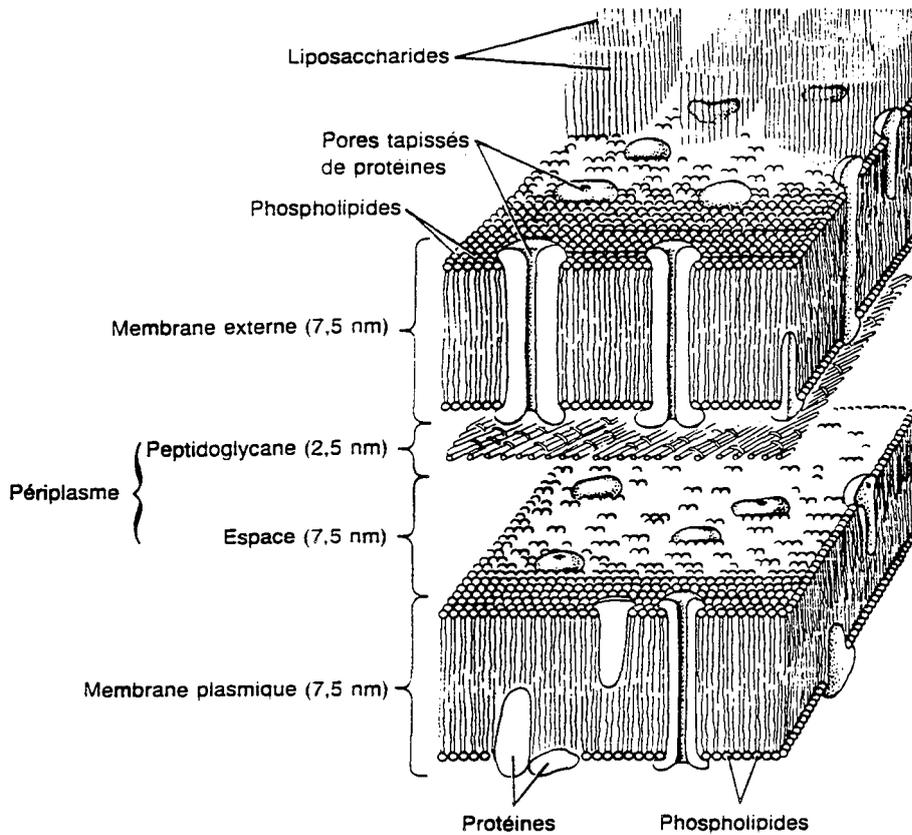


Figure I.20 : Représentation schématique de la structure de l'enveloppe cellulaire d'une bactérie à Gram⁻.

Acides teichoïques	Acides mycoliques
<p>Polymères de ribitol-phosphate ou de glycérol-phosphate, substitués par de la D-alanine et du D-glucose.</p> <p><i>n fois</i></p>	<p>Acides gras à longues chaînes.</p> $\begin{array}{c} \text{--- R --- CH --- CH --- COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{R}' \end{array}$ <p>(R proche de R')</p> <p><u>Longueur totale de la chaîne carbonée :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Corynébactéries : C₃₂ à C₃₆ - Nocardias : C₄₈ à C₅₈ - Mycobactéries : C₇₉ à C₈₅

Figure I.21 : Structures des acides teichoïques et mycoliques.

- les protéines constituent la moitié de la masse sèche cellulaire,
- le contenu en lipides et en ADN est relativement stable d'une souche à l'autre,
- de fortes variations sont observées pour les ARN et la paroi (peptidoglycane),
- une proportion non négligeable de glutamate libre est détectée chez *Corynebacterium glutamicum*, les Corynébactéries étant connues pour leur surproduction naturelle d'acides aminés.

Dans cette partie, nous examinerons plus particulièrement la structure de l'enveloppe et la composition des protéines en insistant sur les conséquences au niveau de la modélisation métabolique.

I.4.1. Structure de l'enveloppe cellulaire

La différence de structure de l'enveloppe des microorganismes est à l'origine de la détermination du type de Gram, un classement de base en microbiologie (figure I.20). Les bactéries Gram⁻ (telles que les Entérobactéries avec par exemple *Escherichia coli*) possèdent une couche lipidique supplémentaire au dessus de la paroi, le lipopolysaccharide (LPS), de structure identique à celle de la membrane plasmique et qui contient en plus des protéines et des lipoprotéines. Les bactéries Gram⁺ (telles que les Corynébactéries avec par exemple *Corynebacterium glutamicum*) ne possèdent pas ce LPS. Elles ont en revanche une paroi plus épaisse que les Gram⁻, caractérisée par la présence d'acides teichoïques et mycoliques. Les acides teichoïques sont des polymères de glycérol et/ou de ribitol, substitués par d'autres sucres et/ou de l'alanine. Les acides mycoliques sont des acides gras linéaires à longues chaînes (environ 30 carbones) (figure I.21). Selon différents auteurs, ces deux types de composés représentent 10 à 60% de la masse sèche de la paroi (nous avons arbitrairement choisi une valeur totale moyenne de 30%).

Cette différence de composition de la paroi entraîne que le terme de paroi ne désigne plus le même type de structure pour *Escherichia coli* et *Corynebacterium glutamicum*. Les voies de biosynthèse de ces parois ne sont donc plus strictement comparables. Nous avons modifié le "découpage" de la cellule et créé une classe "autres macromolécules", qui représente une "annexe" de la paroi et regroupe les acides teichoïques et mycoliques des Corynébactéries. Ainsi, chaque classe désignera la même structure biochimique chez les Gram⁺ et les Gram⁻, ce qui permettra de comparer qualitativement et quantitativement la composition cellulaire des deux souches bactériennes (tableau I.3).

I.4.2. Composition des protéines

Les protéines représentent le constituant majeurs de la cellule en terme de masse sèche. Leur composition en acides aminés peut donc être à la source de variations importantes du flux dans les voies du métabolisme central puisque les acides aminés en sont directement issus. Les aminogrammes de différentes souches sont reportés dans le tableau I.4. Dans l'ensemble, les valeurs semblent

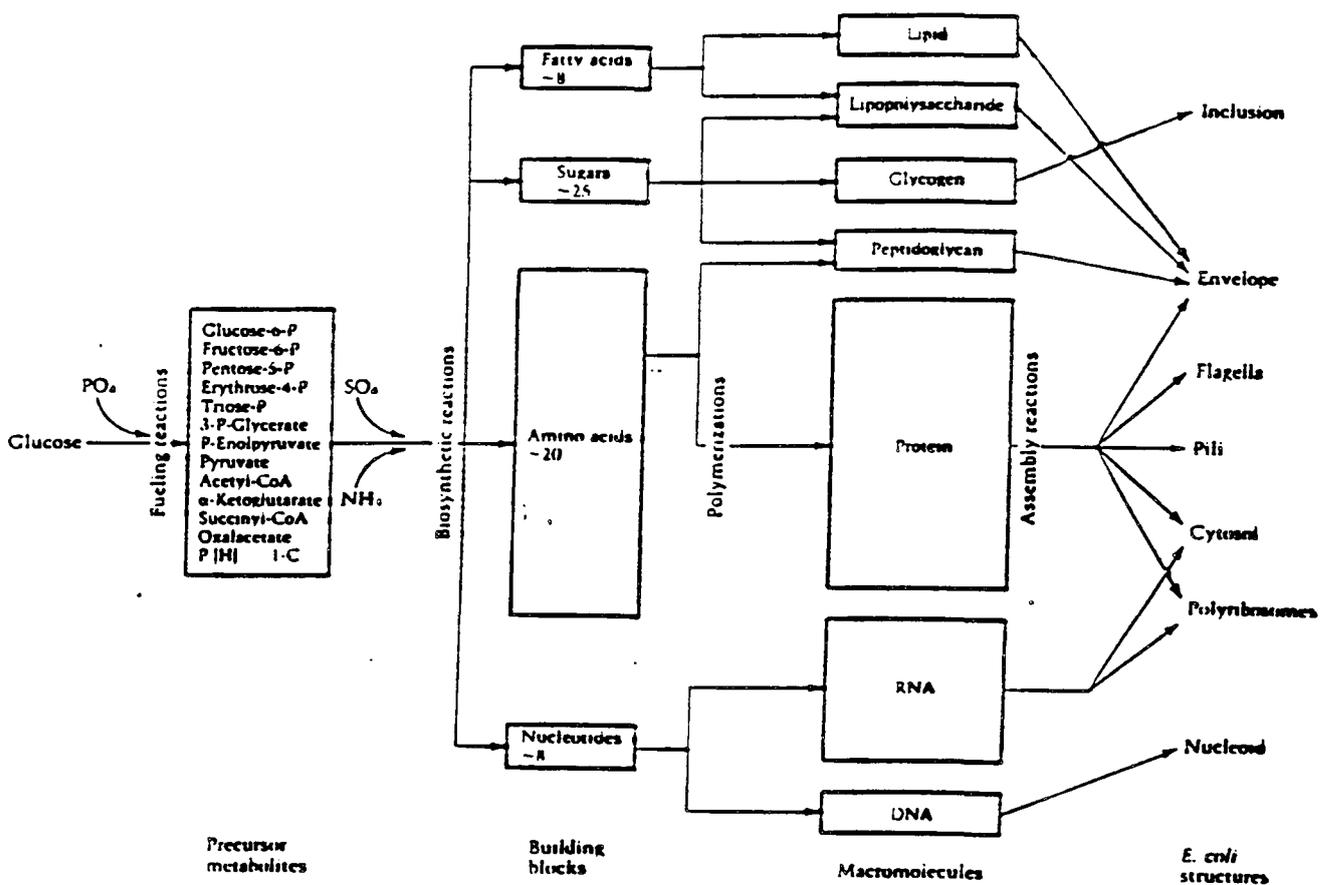


Figure I.22 : Schéma de synthèse de la biomasse à partir du glucose d'après la méthode simplifiée d'Ingraham et coll. (1983). La taille des rectangles est proportionnelle aux besoins du composé considéré pour la synthèse de 1 gramme d'*Escherichia coli*.

comparables, mais l'examen détaillé montre de nombreuses disparités entre les 4 aminogrammes, avec des variations d'au minimum 30%, même entre les différentes souches de Corynébactéries.

Tableau I.4 : Comparaison de l'aminogramme de *Escherichia coli* et de *Corynebacterium glutamicum* ($\mu\text{mole/g}$ matière sèche).

Acides aminés	<i>E. coli</i>		<i>C. glutamicum</i>	
	Ingraham, 1983	Nezondet, 1992	Cocaign-Bousquet, 1996	Marx, 1996
Alanine	488	766	725	606
Arginine	281	nd	190	189
Asparagine				
+ Aspartate	458	507	374	399
Cystéine	87	nd	1	87
Glutamate				
+ Glutamine	500	565	972	806
Glycine	582	412	344	361
Histidine	90	85	63	71
Isoleucine	276	212	175	202
Leucine	428	495	262	0
Lysine	326	216	171	202
Méthionine	146	nd	5	146
Phénylalanine	176	164	123	133
Proline	210	nd	148	170
Sérine	205	259	265	225
Thréonine	241	319	270	275
Tryptophane	54	nd	1	54
Tyrosine	131	108	74	81
Valine	402	314	262	284

nd : non déterminé.

I.5. Modélisation de la synthèse de la biomasse

I.5.1. Méthode simplifiée (méthode "Ingraham")

La méthode proposée par Ingraham et coll. (1983) pour représenter la synthèse de biomasse chez *Escherichia coli* se divise en trois étapes. Cette procédure est schématisée sur la figure I.22. Les auteurs ont tout d'abord décomposé la cellule bactérienne en structures macromoléculaires connues (protéines, paroi, acides nucléiques...). Puis en étudiant les voies de biosynthèse de ces macromolécules, ils ont déterminé la nature et la quantité de monomères et d'énergie requise (acides aminés, acides gras, acides nucléiques, sucres..., ATP, NADH et NADPH). Enfin, ils ont identifiés 11 métabolites précurseurs appartenant aux voies du métabolisme central, ainsi que 3 composés énergétiques, à partir desquels tous les monomères peuvent être synthétisés. Ces précurseurs sont le

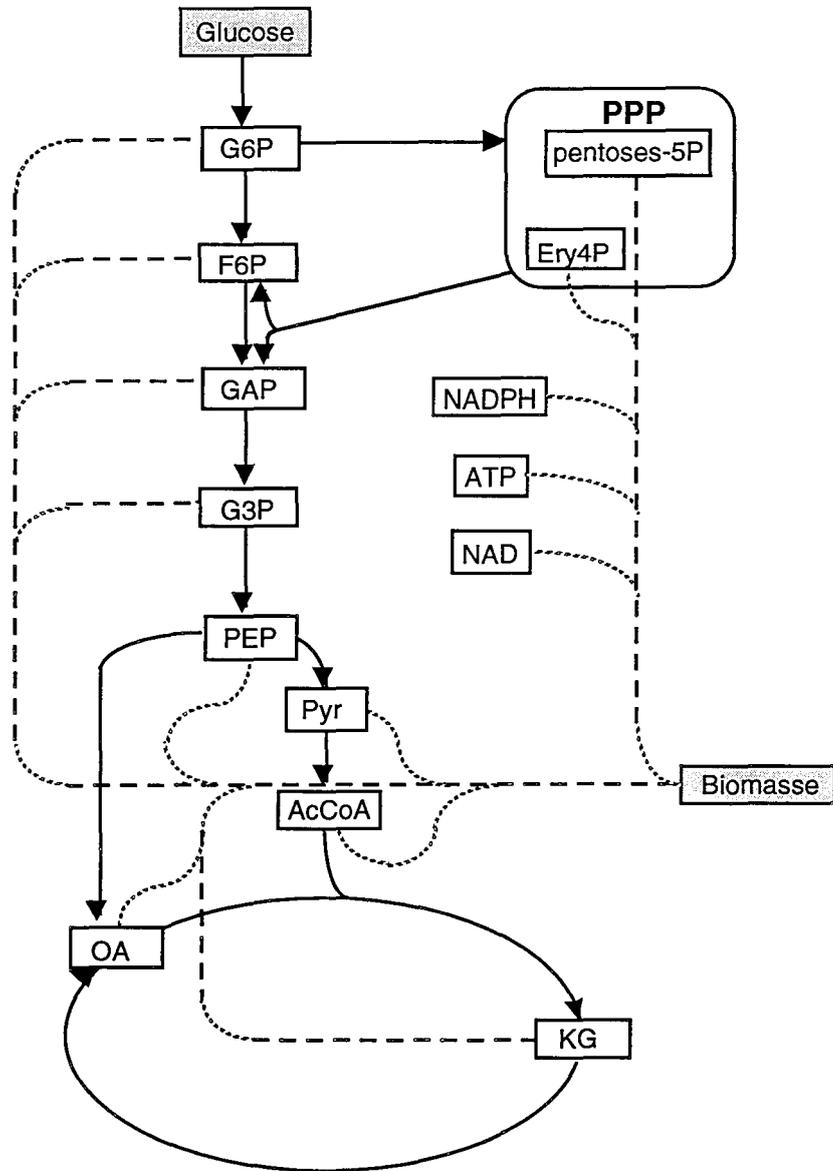


Figure I.23 : Schématisation de la méthode simplifiée de synthèse de la biomasse à partir du glucose. Les traits pleins symbolisent les voies du métabolisme central, les traits pointillés représentent les voies de passage des précurseurs à la biomasse.

glucose 6-phosphate, le fructose 6-phosphate, le glyceraldéhyde 3-phosphate, l'acide 3-phosphoglycérique, le phospho énoyl-pyruvate, le pyruvate, l'acétyl coenzyme A, l' α -cétoglutarate, l'oxalo acétate, les pentoses phosphates, l'érythrose 4-phosphate, l'ATP, le NADPH et le NADH.

La méthode simplifiée de biosynthèse de la biomasse consiste donc à produire les précurseurs à partir de la source de carbone et d'énergie, et de faire sortir la quantité requise au niveau du métabolisme central. Ces "fuites" de précurseurs sont directement rassemblées en biomasse, ce qui est schématisé sur la figure I.23 par les lignes pointillées. Les besoins en précurseurs déterminés par Ingraham sont exprimés en millimoles par gramme de matière sèche (tableau I.5, colonne 2). Il suffit de multiplier par la vitesse de production de la biomasse pour quantifier les flux des "fuites" de chacun des précurseurs.

La modélisation de la synthèse de la biomasse pour d'autres souches demanderait de reprendre la démarche d'Ingraham depuis le dosage des macromolécules jusqu'à la détermination des voies de biosynthèse et des précurseurs communs. Les bactéries présentent cependant des métabolismes très voisins et la grande majorité des données biochimiques sont valables pour tous les microorganismes. En revanche, deux paramètres peuvent subir des variations et influencer les besoins en chacun des précurseurs :

- la composition cellulaire qualitative et quantitative en macromolécules
- les variations biochimiques qualitatives et quantitatives dans les voies de synthèse "masquées", c'est à dire les voies de synthèse des monomères et des macromolécules.

Ainsi, les différents auteurs qui ont recours à la méthode simplifiée d'Ingraham apportent-ils leurs modifications aux besoins en précurseurs en fonction de leurs mesures et des informations à leur disposition. Le tableau I.5 rapporte certaines de ces valeurs. Vallino et Stephanopoulos (1990) utilisent, pour *Corynebacterium glutamicum* en production de lysine, les données d'Ingraham auxquelles ils rajoutent de la lysine (330 $\mu\text{mol/g MS}$), du glutamate (250 $\mu\text{mol/g MS}$) et de la glutamine (250 $\mu\text{mol/g MS}$). Pour compenser, ils diminuent des mêmes quantités les valeurs des précurseurs correspondants (tableau I.5, colonne 3). Ils enlèvent également la méthionine et la thréonine qui sont des acides aminés d'auxotrophie. Ils justifient leur choix par le fait que la production de biomasse ne requiert que 10 à 20% du glucose consommé, entraînant une faible sensibilité du calcul des flux à la biomasse. D'autre part, ils affirment avoir retrouvé des valeurs voisines de celles d'Ingraham dans le calcul des rendements de production de biomasse vis à vis des acides aminés d'auxotrophie. D'autres travaux menés par Nezonet (1992) proposent que les variations de composition en acides aminés par rapport à *Escherichia coli* n'entraînent pas de modifications significatives dans les besoins en précurseurs. Un écart maximum de 15% serait observé pour les besoins en oxalo acétate (OA) et en acide phosphoglycérique (PGA). Les quantités de précurseurs proposées par Ingraham sont donc reprises sans aucune modification pour l'évaluation des flux chez *Corynebacterium glutamicum* (tableau I.5, colonne 4). En revanche, Marx et coll.

Tableau I.5 : Comparatif des besoins en précurseurs dans la méthode de synthèse simplifiée de la biomasse (en mmol.gMS⁻¹).

	<i>E. coli</i>		<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
	Ingraham 1983	Vallino 1990	Nezondet 1992	Marx 1996	Cocaign-Bousquet 1996
G6P	0,21	0,21	0,21	0,21	0,32
F6P	0,07	0,07	0,07	0,07	0,13
GAP	0,13	0,13	0,13	0,13	0,06
PGA	1,50	1,50	1,50	1,29	0,87
PEP	0,52	0,52	0,52	0,53	0,46
Pyr	2,43	1,25	2,43	1,81	2,81
AcCoA	3,75	3,27	3,75	2,5	3,12
KG	1,08	0,58	1,08	1,25	1,39
OA	1,79	1,07	1,79	1,71	1,17
PP	0,90	0,90	0,90	0,88	0,68
E4P	0,36	0,36	0,36	0,27	0,20
ATP	16,4	3,89	16,4	nc	29,20
NADH **	-3,18	-3,12	-3,18	nc	0,39
NADPH	16,92	13,70	16,92	14,85	11,51

** le signe négatif indique une production
nc : non communiqué.

(1996) ont recalculé les besoins en précurseurs en combinant les informations apportées par l'aminogramme obtenu pour leur souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice de lysine, et les données d'Ingraham pour les autres macromolécules. Les valeurs "hybrides" ainsi obtenues (tableau I.5, colonne 5) sont utilisées pour le calcul des flux métaboliques. Finalement, Cocaign-Bousquet et coll. (1996) ont entièrement repris le calcul des besoins en précurseurs à partir de dosages expérimentaux pour l'adapter à une souche de *Corynebacterium glutamicum* en croissance (tableau I.5, dernière colonne).

Dans l'ensemble des travaux conservant tout ou partie des valeurs d'Ingraham, les ordres de grandeurs des besoins en précurseurs sont respectés, avec cependant quelques variations locales comme par exemple un besoin plus faible en pyruvate et en acétyl coenzyme A pour Marx et coll. Ces différences ne peuvent provenir que des variations dans la composition des protéines en acides aminés. En ce qui concerne les valeurs recalculées pour *Corynebacterium glutamicum*, les ordres de grandeur sont également respectés, mais les variations sont plus importantes et peuvent aller du simple au double. Dans ce cas, les différences s'expliquent non seulement par la variation de la composition en acides aminés, mais aussi par celle de l'ensemble de la composition cellulaire.

Remarque : L'influence de la variation de la composition macromoléculaire sera examinée en détail dans le chapitre V (paragraphe V.2.1.)

I.5.2. Méthode complète

Par opposition à la méthode simplifiée, certains auteurs tels que Péquignot (1995) ont développé une synthèse détaillée de la biomasse. Cette méthode complète consiste à exprimer clairement toutes les réactions de synthèse des précurseurs, des monomères et d'assemblage des macromolécules (ce dernier consistant simplement en une consommation d'énergie). Péquignot construit donc un réseau de quelques 50 réactions biochimiques décrivant la synthèse de biomasse chez *Corynebacterium glutamicum*, contre une seule dans la méthode "Ingraham" (remarque : le réseau biochimique complet développé par Péquignot compte 89 réactions, et 37 pour celui de Vallino). Le calcul des besoins en précurseurs n'est plus nécessaire, mais la composition cellulaire reste une donnée indispensable pour évaluer les flux dans les différentes réactions.

Cette méthode présente l'avantage d'une grande souplesse. D'une part, il est très facile d'intégrer des modifications ponctuelles dans une voie puisque toutes les réactions sont explicitées. D'autre part, il est possible d'exprimer plusieurs voies concurrentes et d'imposer des contraintes indiquant la répartition du flux dans chacune des voies lors de la résolution du système. Par exemple, toutes les voies anaplérotiques de la région "PEP-Pyr-OA" sont présentes. Cette option est particulièrement intéressante lorsque l'outil d'évaluation des flux est utilisé en simulation pour étudier l'influence de chaque voie anaplérotique par exemple. Un second avantage de cette méthode est

d'éviter les hypothèses simplificatrices de la méthode précédente, et d'être ainsi plus proche de la réalité physiologique.

Les applications proposées par Péquignot sur l'étude de l'influence de la source carbonée et des voies anaplérotiques conduisent à des résultats tout à fait cohérents. Mais il en est de même avec la méthode simplifiée, et comme les deux approches n'ont pas été comparées en détails, on retient surtout la complexité (apparente) de la méthode complète dont les avantages ne sont pas mis en valeur.

Résumé - Conclusion :

L'étude de la composition biochimique de la cellule bactérienne fait apparaître des variations non négligeables d'une souche à l'autre, en particulier entre Gram⁻ et Gram⁺. Ces variations se traduisent par des modifications significatives des besoins en précurseurs dans la méthode simplifiée et par des voies de biosynthèse particulières dans la méthode complète. La conséquence sur le calcul des flux métaboliques sera une répartition différente des "fuites" des intermédiaires du métabolisme central. Dans les deux cas, il est important d'adapter le système utilisé aux données disponibles afin de se rapprocher au mieux de la réalité biologique.

Analyse métabolique

L'analyse métabolique comporte deux axes de développement :

- un axe qualitatif, qui consiste en la mise au point de méthodes et d'outils pour explorer le métabolisme, et permettre l'identification de tous les chemins menant d'un composé à un autre,
- un axe quantitatif, qui a pour but la détermination de la répartition du flux de matière et d'énergie, et la quantification de ces flux.

Nous présenterons dans ce paragraphe une partie des outils dédiés à l'analyse du métabolisme cellulaire. Nous commencerons par l'analyse qualitative, puis nous définirons les principes de base, pour aborder ensuite un certain nombre d'applications avec leurs utilisations. Nous terminerons par l'étude du logiciel **Bionet**, qui s'impose actuellement comme la référence en matière d'évaluation de flux métaboliques.

I.6. Etude qualitative du métabolisme cellulaire

L'objectif et les applications de l'étude qualitative sont fondamentales pour l'analyse métabolique. Le but est de déterminer tous les chemins possibles conduisant à la synthèse d'un produit particulier à partir d'un substrat donné. Les applications qui en découlent sont les suivantes :

- exploration du métabolisme par la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques, non détectées par l'expérience et auxquelles seul l'outil informatique permet d'accéder. On pourra par exemple rechercher l'ensemble des cycles futiles qui sont difficiles à étudier par l'expérience.
- détection des métabolites ou des réactions obligatoires pour la synthèse de ce produit. Ces passages obligés pourront être étudiés pour leur rôle de régulation ou pour leur suppression si l'on désire éliminer le produit en question.
- à l'inverse, recherche des métabolites ou des réactions qui n'interviennent jamais dans la conversion désirée, qui pourront donc être manipulés sans altérer la synthèse du produit considéré.
- prédiction de l'effet d'une mutation particulière en étudiant les voies altérées. Cela pourra permettre de prédire le phénotype engendré par cette mutation.

Il est important de noter que ces analyses qualitatives, qui doivent explorer les bases de données métaboliques, n'ont pu être développées que grâce aux progrès de l'informatique. Elles font appel à des techniques mathématiques fastidieuses comme l'analyse combinatoire, qui réclament de

puissantes capacités de calcul pour traiter les milliers d'informations sur les métabolites, les enzymes et les réactions. Le premier algorithme de ce type, baptisé **MPS** (Metabolic Pathway Synthesis), a été créé par Seressiotis et Bailey (1988), mais il ne permettait pas de déterminer réellement tous les chemins possibles. Mavroviouniotis et coll. (1990) ont utilisé une approche différente intégrée dans le logiciel **CASBP** (Computer Aided Synthesis of Biochemical Pathways). En particulier, CASBP a permis de montrer que l'oxalo acétate était un intermédiaire obligatoire de la synthèse de la lysine. Nous mentionnerons enfin **Métalgen.db**, créé par Rouxel (1992), une base de données sur *Escherichia coli* développée sous le logiciel 4D pour Macintosh. Outre des interfaces graphiques très conviviales permettant de naviguer facilement dans le métabolisme d'*Escherichia coli*, Metalgen.db a permis de classer les gènes en fonction de l'utilisation des codons grâce à une connexion avec la base de données Colibri (base de données sur le génome d'*Escherichia coli*). Trois groupes correspondant à des niveaux d'expression différents ont ainsi été identifiés.

Ces algorithmes sont très importants pour leur propre intérêt, mais ils représentent également un développement indispensable pour les techniques d'évaluation quantitatives des flux métaboliques.

I.7. Etude quantitative des flux métaboliques

Les méthodes d'étude quantitative, expérimentales ou théoriques, évoluent et s'affinent avec le recul des limites de détection des mesures analytiques, l'apparition de nouvelles technologies et l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs. Dans cette partie, nous définirons tout d'abord des notions essentielles telles que le **principe des bilans matières** et la **notion de flux**. Nous aborderons ensuite brièvement les **méthodes expérimentales** (marquages radioactifs, RMN, mesures d'activités enzymatiques), puis les **méthodes de modélisation** avec les applications des bilans matière. Nous terminerons enfin par une présentation de la **Théorie du Contrôle Métabolique** (TCM), une méthode relativement peu connue et peu utilisée, souvent trop succinctement exposée car relativement complexe, et qui permet de déterminer le partage du contrôle de la répartition du flux dans un réseau donné.

I.7.1. La méthode des Bilans Matière

c'est une méthode extrêmement générale du génie chimique, qui trouve ici une application particulièrement intéressante pour l'évaluation des flux carbonés dans un réseau de réactions biochimiques. Ces développements peuvent par ailleurs s'appliquer au traitement de n'importe quel réseau de flux.

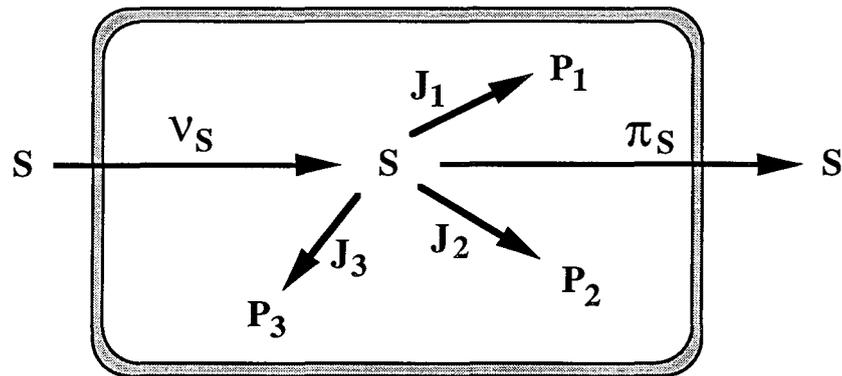


Figure I.24 : Schématisation des réactions biochimiques liées à un composé S au sein d'une cellule.

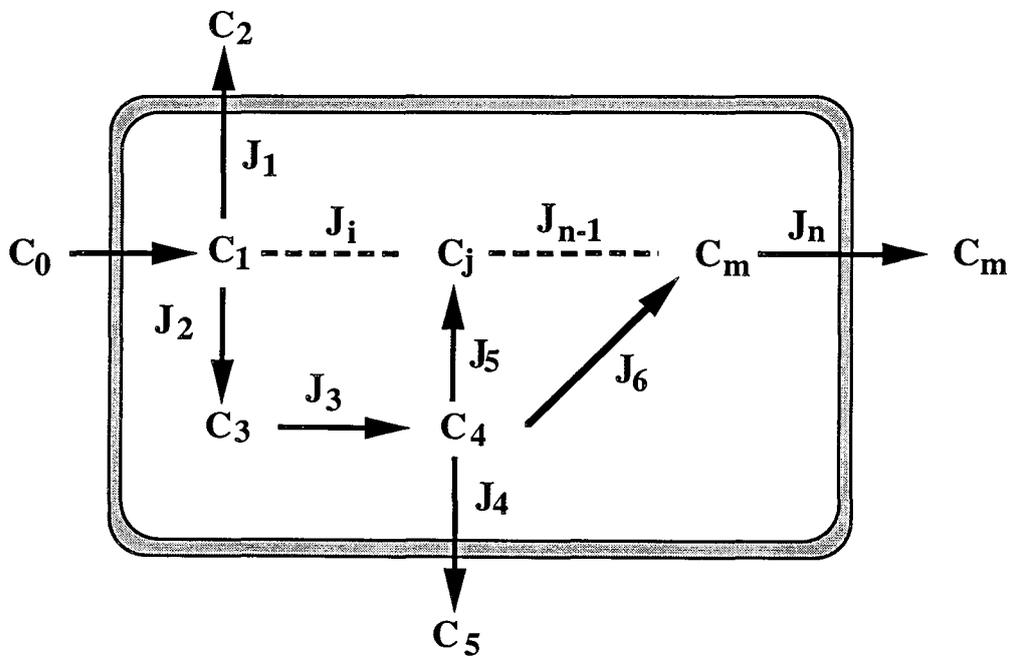


Figure I.25 : Schématisation d'un réseau de réactions biochimiques au sein d'une cellule.

I.7.1.1. Principe

Considérons un composé C dans un système ouvert. L'équation fondamentale des bilans matière appliquée au composé C sur ce système s'écrit :

$$\boxed{\text{Entrée C} + \text{Production C} = \text{Sortie C} + \text{Consommation C} + \text{Accumulation C}} \quad [\text{I.1}]$$

La figure I.24 schématise des réactions biochimiques au sein d'une cellule. La relation [I.1] appliquée au substrat S devient (relation [I.2]) :

$$v_S = \pi_S + \sum_{i=1}^n \alpha_{iS} J_i + \frac{d(V \cdot C_S)}{dt} \quad [\text{I.2}]$$

Le terme de sommation permet de prendre en compte chaque réaction i du réseau biochimique présenté. α_i est le coefficient stœchiométrique de S dans la réaction i . Cette formule peut être généralisée à l'ensemble des m métabolites j d'un réseau comprenant n réactions biochimiques i (figure I.25) conduisant à la relation [I.3].

$$v_j - \pi_j + \sum_{i=1}^n \alpha_{ij} J_i = \frac{dC_j}{dt}$$

$$r_j + \sum_{i=1}^n \alpha_{ij} J_i = \frac{dC_j}{dt} \quad j=1 \text{ à } m \quad [\text{I.3}]$$

avec $r_j = v_j - \pi_j$ la vitesse macroscopique (extracellulaire) de consommation ou de production du métabolite j .

On définit ainsi \mathbf{a} le vecteur (dimension m) des vitesses macroscopiques r_j de chaque métabolite j . Dans le cas de composés non échangeables (intermédiaires de biosynthèses) les r_j sont égaux à 0, et dans le cas de composés échangeables (source de carbone, produits terminaux excrétés...) les r_j sont donnés par les mesures expérimentales des vitesses de production. De même, on définit \mathbf{x} le vecteur (dimension n) des flux J_i de chaque réaction i . C'est le vecteur à identifier. Enfin, on définit la matrice \mathbf{M} (dimensions $(m \times n)$) regroupant les coefficients stœchiométriques de chaque métabolite j dans chaque réaction i du réseau métabolique. \mathbf{M} est totalement définie par la biochimie du microorganisme considéré. Dans le cas le plus général des bilans matière, on pourrait encore définir un vecteur regroupant les vitesses d'accumulation de chaque métabolite j dans la cellule. Cependant, ces données ne sont pas facilement accessibles et sont souvent négligeables devant le flux des réactions impliquant le métabolite en question. Il apparaît ainsi l'hypothèse fondamentale du calcul des flux par la méthode des bilans massiques : l'état pseudo-stationnaire (EPS), où l'on considère nulles toutes les vitesses d'accumulation des métabolites du réseau.

Tableau I.6 : Concentrations intracellulaires en fructose 1,6-diphosphate pour différents substrats carbonés (d'après Péquignot, 1995)

Source de carbone (g/l)	Fructose 1,6-diphosphate (mmol/l)	Souche bactérienne	Source
Glucose 10	15,9	<i>C. melassecola</i>	Bourrust (1993)
Fructose 10	28,9		
Glucose 15	35	<i>C. glutamicum</i>	Dominguez (1994)
Fructose 15	65		
Glucose 130	2,0	<i>C. glutamicum</i>	Shio et Coll. (1990)
Fructose 130	2,6		
Glucose / Fructose 65/65	2,0		

La relation [I.3] se résume donc à une équation matricielle (équation [I.4]) :

$$\boxed{M \cdot x = a} \quad [I.4]$$

I.7.1.2. Validité de l'hypothèse d'état pseudo-stationnaire

L'hypothèse EPS revient à imposer que l'ensemble des flux de production d'un métabolite j soit strictement égal à l'ensemble des flux de consommation. Comme mentionné précédemment, ceci est valable tant que la vitesse d'accumulation du métabolite est faible devant les flux réactionnels. Cette supposition est entièrement justifiée dans le cas du métabolisme cellulaire puisque le temps de renouvellement d'un métabolite intracellulaire est en général très inférieur au temps de génération d'une cellule.

Des expériences de dosages de métabolites intracellulaires ont été réalisées chez les Corynébactéries au niveau du métabolisme central (Péquignot, 1995). Dans l'ensemble, elles n'ont pas permis de mettre en évidence de fortes variations des intermédiaires métaboliques, renforçant la validité de l'hypothèse EPS, mais ont montré quelques exceptions. C'est le cas du F1,6-diP, intermédiaire de la glycolyse qui subit de fortes contraintes régulationnelles. Même si les dosages ne sont pas toujours rigoureusement comparables dans leur mise en œuvre, ils indiquent de fortes variations de concentration du F1,6-diP (tableau I.6).

Ces observations qui semblent invalider l'hypothèse EPS sont le résultat de conditions particulières et transitoires de passage d'un régime stationnaire à un autre. L'hypothèse EPS est donc tout à fait acceptable en dehors de ces zones de transition physiologique.

I.7.1.3. Contraintes de la méthode des Bilans Matière

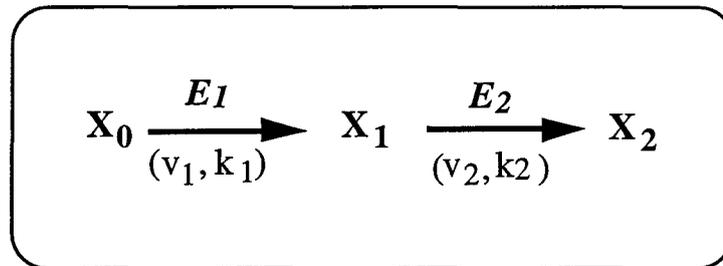
La méthode des bilans matière est beaucoup plus simple à utiliser que celle des cinétiques enzymatiques, puisqu'elle ne requiert pas autant d'information. Elle pourra donc concerner un réseau biochimique beaucoup plus dense. Mais la qualité et la quantité des informations recueillies ne sera pas non plus la même et cette méthode ne conduira qu'à la simple détermination des flux métaboliques, sans aucune indication régulationnelle.

Les données nécessaires aux bilans matière se résument aux vitesses des réactions macroscopiques (consommations et/ou productions), éventuellement à certains rendements de conversion, et à la stœchiométrie des réactions du réseau biochimique choisi. Ce dernier point peut poser des difficultés pour certaines voies peu connues ou simplifiées, et qui n'apparaissent pas avec la méthode enzymatique du fait de son domaine d'application moins large. C'est en particulier le cas de la synthèse de la biomasse, qui regroupe quelques 2000 réactions qui ne peuvent pas toutes être

prises en compte et pour laquelle des hypothèses simplificatrices seront nécessaires (cf paragraphe I.5).

I.7.2. Notion de flux métabolique

Lorsqu'on aborde la question des flux métaboliques, il importe de définir précisément cette notion de flux. On parlera de flux réactionnel quand il s'agira d'une réaction biochimique particulière, et de flux métabolique lorsqu'il s'agira du flux à travers tout un réseau de réactions biochimiques. Dans ce paragraphe, nous considérerons le schéma réactionnel simplifié décrit ci-dessous :



X_0 , X_1 et X_2 sont les composés intervenant dans le système réactionnel choisi ; ils ont des concentrations $[X_0]$, $[X_1]$ et $[X_2]$. Les deux réactions sont respectivement catalysées par les enzymes E_1 et E_2 avec les vitesses v_1 et v_2 . Pour simplifier, on supposera que les stœchiométries de réactions sont égales à 1 et que les enzymes montrent des cinétiques d'ordre 1 par rapport à leur substrat avec des constantes cinétiques k_1 et k_2 .

I.7.2.1. Flux réactionnel et activité enzymatique

Ces deux notions sont en réalité très proches. Elles décrivent toutes deux la vitesse de conversion d'un substrat en un produit. La différence fondamentale réside au niveau du "référentiel" choisi. Considérons la première réaction. Le bilan matière sur le composé X_0 s'écrit :

$$0 + 0 = 0 + v \cdot q_{X_0} + \frac{d(V \cdot X_0)}{dt} \quad \text{soit} \quad v_1 = \frac{dX_0}{dt} = -q_{X_0} = k_1 \cdot X_0 \quad [\text{I.5}]$$

On peut également écrire cette vitesse de réaction par rapport à l'enzyme :

$$v'_1 = \frac{v_1}{E_1} = \frac{k_1 \cdot X_0}{E_1} \quad [\text{I.6}]$$

La relation [I.5] est généralement exprimée en $\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$. Lorsqu'il existe un référentiel tel qu'une cellule par exemple, on parlera de **flux réactionnel** ou de vitesse de conversion volumique si elle est correspond à un volume réactionnel (moles de substrat converties par litre de milieu réactionnel et par heure) ou encore de vitesse de conversion spécifique si elle est fait référence à une masse (moles de substrat converties par gramme de matière sèche et par heure). Dans le cas où le

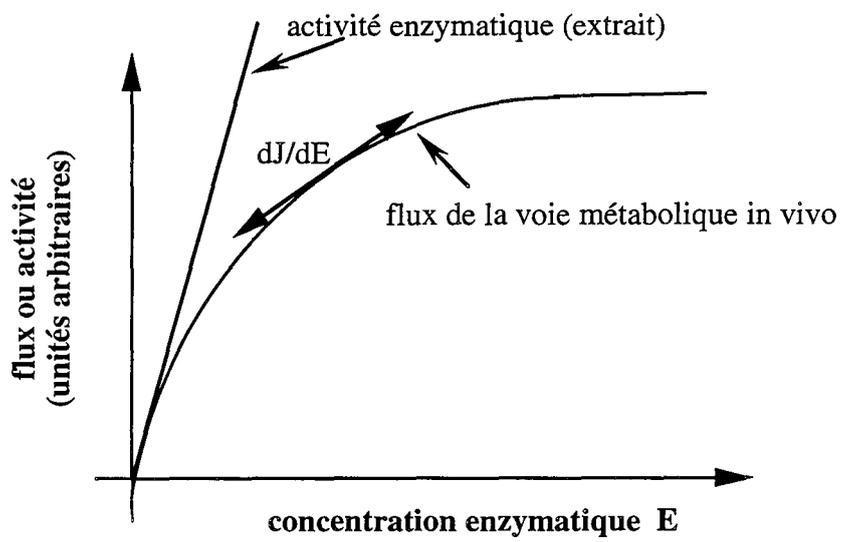


Figure I.26 : Représentation schématique de la corrélation entre le flux métabolique et une activité enzymatique particulière. (D'après Mazat, 1987)

référentiel considéré est la quantité de protéine enzymatique en masse ou en unité d'enzyme (relation [I.6]), on parlera d'**activité enzymatique**. L'activité enzymatique est généralement exprimée en millimoles de substrat converties par milligramme d'enzyme et par minute. (Toutes ces vitesses peuvent également s'exprimer en fonction de la quantité de produit de la réaction).

La conséquence de ces définitions est que le flux réactionnel est directement proportionnel à la concentration enzymatique. Le passage d'une grandeur à l'autre est donc possible en tenant compte de ce paramètre.

I.7.2.2. Flux métabolique et activité enzymatique

Considérons maintenant le système en entier. Le bilan matière sur X_1 s'écrit :

$$0 + V \cdot \pi_{X_1} = 0 + V \cdot q_{X_1} + \frac{d(V \cdot X_1)}{dt} \quad \text{soit} \quad \frac{dX_1}{dt} = \pi_{X_1} - q_{X_1} = (k_1 - k_2) \cdot X_1 = v_1 - v_2 \quad [\text{I.7}]$$

A l'état stationnaire, $\frac{dX_1}{dt} = 0$ et donc $v_1 = v_2 = J$ où J est appelé **flux métabolique** dans le réseau considéré. Le flux métabolique est constitué d'une succession de flux réactionnels et donc d'activités enzymatiques. Cette notion représente le flux général de matière (ou d'énergie) à travers une voie métabolique à un état stationnaire donné. Ce flux correspond au flux de l'étape réactionnelle limitante (entraînant l'état stationnaire) dans les conditions considérées. Ainsi, les notions de flux réactionnel et de flux métaboliques sont souvent confondues, ce qui est tout à fait fondé dans un contexte physiologique. En revanche, la relation entre le flux métabolique et une activité enzymatique particulière apparaît complexe. Une représentation schématique de cette relation est présentée Figure I.26.

Remarque : La relation entre la concentration en enzyme et l'activité enzymatique étant linéaire, on parlera indifféremment de l'une des deux notions pour la comparer au flux métabolique.

La figure I.26 montre deux phases distinctes : d'abord une corrélation parfaite entre flux métabolique et activité enzymatique, qui correspond à la zone pour laquelle le flux est limité par cette enzyme particulière. Puis les deux courbes se démarquent, l'augmentation de cette activité enzymatique perdant de l'influence et ne permettant plus l'augmentation du flux métabolique à elle seule. Ceci suggère l'intervention de l'effet limitant d'une (ou plusieurs) autre(s) étape(s) enzymatique(s). Enfin, le plateau décrit par la courbe du flux métabolique aux fortes concentrations en enzyme marque la zone où celle-ci n'a plus aucune influence.

Conclusion :

Il est important de bien définir les termes, le flux réactionnel - ou cinétique enzymatique - différant de la notion de flux métabolique par le référentiel choisi. Cependant, à l'état stationnaire *in vivo*, les deux notions sont équivalentes.

I.7.3. Traceurs radioactifs et RMN

Ces deux techniques ont l'avantage d'être utilisables *in vivo*, mais elles sont lourdes à mettre en œuvre et présentent un coût élevé. Elles permettent toutes deux d'accéder à des informations qualitatives et quantitatives. L'étude de la distribution de la radioactivité artificielle (cas des traceurs) ou naturelle (RMN) au niveau des métabolites donne en effet des indications sur les voies métaboliques empruntées à partir du substrat, et sur leur importance relative. Des études cinétiques peuvent également être réalisées pour obtenir une quantification de certains flux, en particulier au niveau de systèmes réactionnels simples (une ou quelques réactions enzymatiques).

L'utilisation des traceurs radioactifs semble actuellement en perte de vitesse alors que la RMN connaît un développement croissant. L'apparition récente de systèmes miniaturisés permet en effet de réduire les coûts et de réaliser des études *in vivo* et en temps réel. Nous verrons dans les paragraphes suivants que la RMN conduit en particulier à la détermination de la répartition du flux dans les voies du métabolisme central, au niveau du nœud glucose 6-phosphate et phospho énoyl-pyruvate. Mais aussi puissante soit-elle, cette technique requiert encore certaines hypothèses mathématiques lorsque subsistent des ambiguïtés sur des voies concurrentes et/ou non distinguables, comme les voies anaplérotiques du système "PEP-Pyr-OA" par exemple.

Nous mentionnerons cependant les travaux récents de Marx et coll. (1996). Ils développent un modèle métabolique uniquement basé sur le transfert de l'enrichissement isotopique des différents carbones des métabolites et sur le dosage de cet enrichissement (par RMN) au niveau de tous les acides aminés. Dans cette méthode, il n'est pas nécessaire de connaître ni les cinétiques enzymatiques, ni même de faire des hypothèses restrictives sur le métabolisme énergétique (rapport P/O, production d'ATP...) Tout est basé sur le transfert du marquage isotopique. Ils accèdent ainsi à l'ensemble des voies utilisées, mettant en évidence le fonctionnement de réactions réverses ou de cycles impossibles à intégrer dans les méthodes de modélisation par bilans matière. Par exemple, ils montrent une utilisation de la voie des pentoses en sens inverse pour produire de l'érythrose 4-phosphate, ou encore l'existence d'un flux non négligeable de l'oxalo acétate vers l'acétyl coenzyme A via le phospho énoyl-pyruvate ou le pyruvate. Ce type de modèle requiert en revanche une parfaite

connaissance de la biochimie et du fonctionnement moléculaire des réactions enzymatiques du microorganisme étudié.

I.7.4. Mesure de cinétiques enzymatiques

I.7.4.1. Cinétique enzymatique pour une réaction

De nombreuses données expérimentales et théoriques ont permis de décrire mathématiquement le comportement des enzymes. Qu'elles soient de type "classique" (ordre 0, ordre 1... par rapport au substrat, Michaelis et Menten) ou de type allostérique (Monod, Wyman et Changeux), ces équations permettent le calcul des activités enzymatiques en fonction de paramètres cinétiques (K_m , V_{max} , inhibiteurs et activateurs...), ou physico-chimiques (température, pH...). Elles constituent donc une forme de modélisation des flux réactionnels très complète.

Par exemple, Cortassa et Aon (1994) présentent un modèle cinétique de la glycolyse de la levure reposant sur les données cinétiques publiées dans la littérature. Nous en avons extrait l'équation [I.8], qui reproduit une modélisation de type Michaelis-Menten de la vitesse de réaction (v_{PGK}) de la phosphoglycerate kinase (diphosphoglycerate (DPG) \rightarrow PEP)

$$v_{PGK} = \frac{V_{PGK}^{max} \cdot DPG}{K_{DPG}^m + DPG} \quad [I.8]$$

avec $K_{DPG}^m = 0,002 \text{ mmol.l}^{-1}$, la constante d'affinité de l'enzyme pour le DPG

$V_{PGK}^{max} = 20,2 \text{ mmol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, la vitesse maximale de réaction.

Remarque : La valeur de la constante cinétique est tirée de l'expérience, mais celle de la vitesse maximale de réaction est le résultat d'une optimisation entre le modèle cinétique de la glycolyse et l'expérience. Une optimisation est réalisée pour chaque état stationnaire de la culture de levure sur glucose en chemostat. La valeur proposée ci-dessus est valable pour un état stationnaire en limitation glucose avec un taux de dilution de $0,16 \text{ h}^{-1}$.

Mais les cinétiques enzymatiques sont loin d'être toutes aussi simples. L'équation [I.9] présente une modélisation de l'activité de la phosphofructokinase, enzyme allostérique ayant pour principal effecteur l'AMP. L'effet du pH est également pris en compte. La complexité provient non seulement de la forme de l'équation, mais surtout du nombre de paramètres à déterminer (cette expression est donnée à titre indicatif, voir Cortassa et Aon (1994) pour la signification des paramètres).

$$v_{PFK} = V_{PFK}^{max} \frac{g_R \lambda_1 \lambda_2 R^{n-1} + q L g_T c_1 \lambda_1 c_2 \lambda_2 T^{n-1}}{R^n + L T^n} \quad [I.9]$$

Une masse conséquente de données expérimentales est disponible dans la littérature concernant de nombreuses enzymes et de nombreuses souches cellulaires. Ces informations contribuent à améliorer la connaissance scientifique sur le fonctionnement cellulaire. Cependant, ces données sont aussi caractérisées par leur grande hétérogénéité. Très souvent réalisées *in vitro* et dans des conditions réactionnelles optimales, les expériences ne correspondent pas à la réalité physiologique. Différentes études menées sur une même enzyme et a priori dans les mêmes conditions expérimentales peuvent conduire à des résultats cinétiques incohérents, voire contradictoires. La mise en oeuvre de telles études est en effet relativement délicate et dépend de nombreux facteurs pas toujours bien maîtrisés. De plus, la détermination des K_m et V_{max} est peu précise, conduisant à des marges d'erreur très importantes (souvent supérieure à 100%), ce qui explique qu'elles ne soient pas souvent indiquées.

Cependant, ces cinétiques sont largement acceptées et reconnues par la communauté scientifique et peuvent fournir de précieuses bases de réflexion à l'étude des flux métaboliques et de leur régulation.

I.7.4.2. Réseau de cinétiques enzymatiques

Les cinétiques des réactions biochimiques peuvent être combinées pour tenter d'évaluer la dynamique des flux métaboliques dans un réseau. Ce type de réseau est très difficile à manipuler et apparaît rapidement limité. Certains travaux rapportent cependant l'étude *in vitro* de voies métaboliques particulières telles que la glycolyse ou encore la biosynthèse de certains acides aminés. Ces études permettent de mieux comprendre les effets des concentrations en enzymes et en intermédiaires métaboliques, des inhibitions ou des activations de certains facteurs physico-chimiques sur la dynamique générale du réseau étudié, et non plus sur une seule étape enzymatique.

Cortassa et Aon (1994) présentent une modélisation cinétique de la glycolyse chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle est construit à partir des cinétiques enzymatiques *in vitro* collectées dans la littérature. L'application proposée est l'étude de la répartition du flux carboné entre la croissance et la production d'éthanol. Des expériences en chemostat sur glucose sous limitation carbone, azote ou phosphate viennent étayer les données pour les simulations de flux dans la glycolyse. Les paramètres des équations cinétiques de chaque enzyme sont issus des données de la littérature. Cependant, les auteurs ont réalisé une optimisation entre les données expérimentales et les résultats de simulation pour la détermination des vitesses maximales de chaque enzyme à chaque étape du chemostat. Outre la modélisation proprement dite, l'intérêt de ces travaux réside dans l'association du modèle et de la Théorie du Contrôle Métabolique afin de déterminer les points de contrôle du flux carboné dans la glycolyse (cf paragraphe I.7.5.).

I.7.4.3. Cinétique enzymatique et logique floue

Depuis quelques années, la théorie des sous-ensembles flous (Zadeh, 1965) offre de nouvelles possibilités en modélisation et en commande de bioprocédés (par exemple Yong Soo et coll., 1993). Cette technique a déjà été utilisée pour décrire des cinétiques microbiennes (par exemple Jitsufuchi et coll., 1992), et pourrait s'adapter aux modélisations de cinétiques enzymatiques, en remplaçant les équations classiques par des tables de décision. Ceci éviterait par exemple la détermination expérimentale des K_m et des V_{max} , et permettrait peut-être de faciliter la construction et l'étude des réseaux métaboliques.

Conclusion :

Reposant sur des théories largement acceptées et sur de nombreuses données expérimentales (*in vitro*), les cinétiques enzymatiques sont de précieux outils pour étudier la dynamique de voies métaboliques. La multitude des paramètres et des données pris en compte font la force de ces modélisations, mais également leur limitation.

I.7.5. Evaluation des flux par les bilans matière

I.7.5.1. Exploitation non matricielle des bilans matière

Cette méthode base l'algorithme de calcul des flux sur la réaction biochimique comme entité indépendante, en utilisant des équations de type [I.2] pour chaque métabolite du réseau et en appliquant l'hypothèse EPS. Le calcul des flux progresse de réaction en réaction, de la source carbonée vers les produits terminaux, les flux de ces derniers étant fournis par l'expérience. Il se pose alors le problème de la répartition du flux aux nœuds du réseau. Certaines sont clairement définies par la stœchiométrie de la voie métabolique (dans la voie des pentoses par exemple, répartition 2/3 1/3 du ribulose vers le ribose et le xylulose), mais d'autres (nœuds G6P et PEP) requièrent une connaissance externe sous la forme d'expertise ou de valeur arbitraire.

Cette méthode est simple à mettre en œuvre et à utiliser. Le fait d'imposer la répartition du flux à certains nœuds du réseau constitue son inconvénient majeur, car cela ne permet pas d'obtenir une vue *in vivo* des flux à partir des données expérimentales. Il faut procéder par itérations et faire coïncider simulations et expériences pour aboutir à la carte des flux *in vivo*. En revanche, cela présente une grande souplesse pour l'utilisation de l'outil en simulation pure. Certains auteurs ont utilisé cette méthode dans l'étude de la croissance de Corynébactéries sur différentes sources de carbone.

Cocaign (1992) a étudié le métabolisme comparé du glucose, du lactate, de l'acétate ou de mélanges lors de la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en cultures discontinues et continues. Cocaign a porté son attention sur les aspects énergétiques, mais aussi sur les différences dans les flux eux-mêmes suivant les sources carbonées. En particulier, elle a mis en évidence le rôle clé de la pyruvate déshydrogénase dans le métabolisme du lactate ; cette enzyme constituerait une étape limitante à forts taux de croissance et serait à l'origine d'une accumulation transitoire de pyruvate. Un second point, déjà soupçonné auparavant, a été renforcé par ces études. Il s'agit de l'intervention de perméases pour l'entrée du glucose dans la cellule en plus du système PTS.

Nezondet (1992) utilise le même modèle pour l'optimisation d'un procédé de surproduction de glutamine par *Corynebacterium glutamicum*. Cocaign s'est attachée à étudier les variations dans les rendements cinétiques en fonction des contraintes métaboliques et énergétiques. Il apparaît en particulier que le facteur limitant le rendement de production de l'acide aminé est la disponibilité du PEP et non la partition du flux au nœud PEP.

I.7.5.2. Exploitation matricielle des bilans matière

C'est actuellement la technique la plus utilisée pour l'évaluation de flux dans un réseau biochimique. La représentation matricielle (relation [I.4]) est en effet concise et complète. Le calcul matriciel est puissant et autorise des développements mathématiques aisés.

Comme la précédente, cette méthode repose sur une parfaite connaissance des réactions biochimiques et de leur stœchiométrie, et suppose également l'état pseudo-stationnaire du système biologique. Si elle utilise la réaction biochimique comme entité élémentaire d'information, la résolution du système est ici globale et simultanée. Tous les paramètres du réseau sont des résultats de calcul, y compris les répartitions du flux aux différents nœuds. Il n'est donc pas nécessaire de préciser ces données a priori comme dans la méthode précédente.

L'évaluation quantitative des flux *in vivo*, ainsi que la répartition du flux carboné dans le réseau, sont donc obtenues en réponse à des données expérimentales. Mais l'utilisation en simulation est également possible, en particulier par l'intervention d'une matrice de contraintes permettant d'imposer des conditions au système (par exemple, la répartition du flux au nœud G6P).

Cependant, cette méthode requiert une maîtrise importante du calcul matriciel. La figure I.27 présente les différents cas possibles suivant la structure de la matrice \mathbf{M} . La résolution de l'équation [I.4] est immédiate pour une matrice \mathbf{M} carrée inversible (figure I.27, première colonne ; l'orthogonalisation de \mathbf{M} n'est d'ailleurs pas nécessaire dans ce cas précis). Mais dans la pratique, la matrice \mathbf{M} est rarement carrée et présente des problèmes de redondance ou de manque d'informations. Dans tous les cas, une solution est de reconstruire le réseau biochimique de manière à satisfaire les

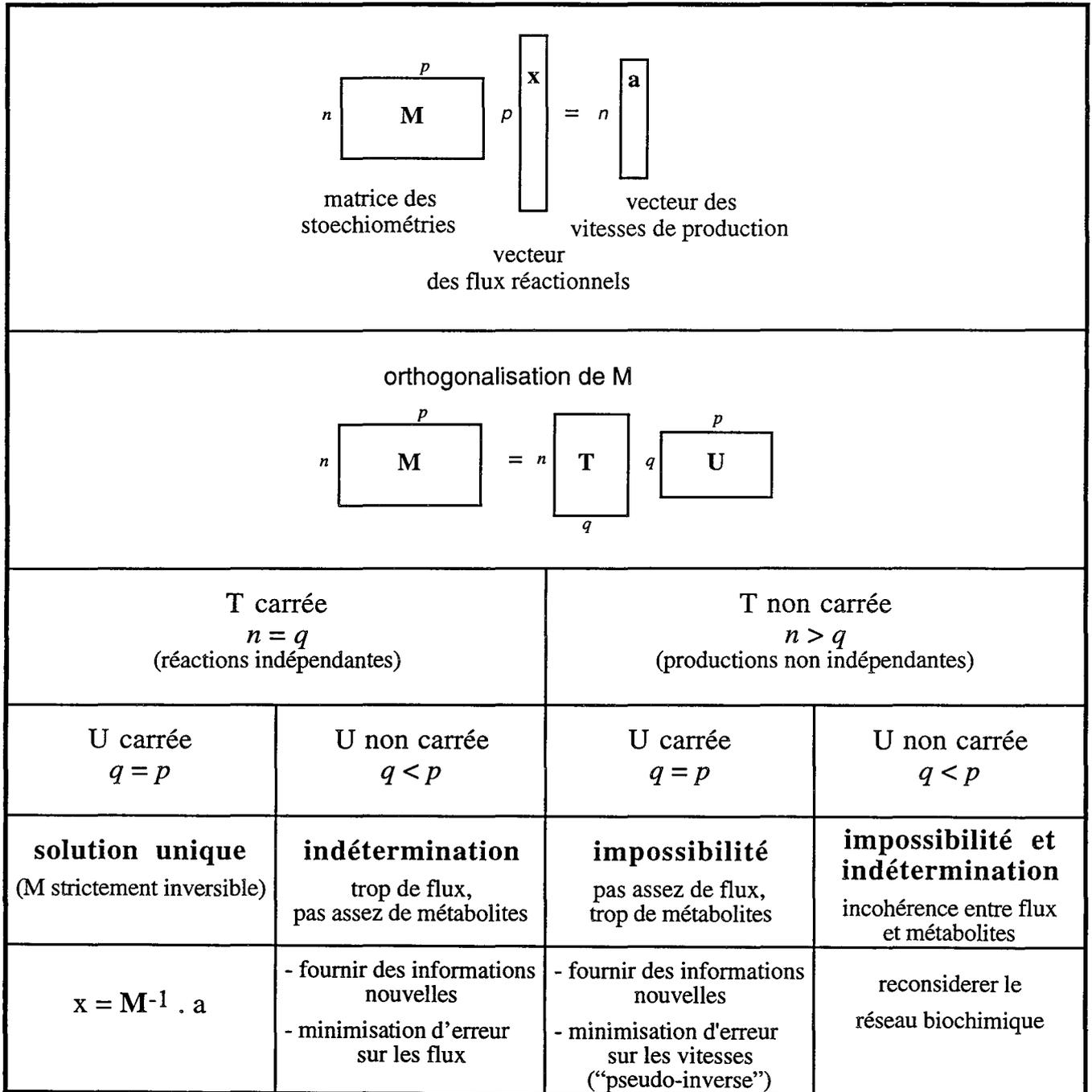


Figure I.27 : Schématisation de la résolution de l'équation matricielle $M \cdot x = a$.

conditions d'inversibilité. Des procédures mathématiques peuvent guider ces modifications, mais elles restent souvent empiriques. La seconde voie exploite les méthodes de calcul de l'algèbre linéaire.

Considérons les matrices **T** et **U** qui proviennent de l'orthogonalisation de **M**. Dans le cas général où **T** n'est pas carrée, les vitesses de production ne sont pas indépendantes. A cause de cette redondance, l'information fournie par la stœchiométrie est inférieure à ce que l'on croyait. A l'inverse, si **U** n'est pas carrée, ce sont les réactions (les stœchiométries) qui sont liées.

Dans le cas "T carrée et U non carrée" (colonne 2), le système est indéterminé : il y a trop de flux ou pas assez de composés. La solution consiste à fixer la valeur de certains flux ou à minimiser l'erreur commise sur les flux en utilisant une matrice de pondération par exemple.

Dans le cas "T non carrée et U carrée" (colonne 3), le système est impossible. Il n'y a pas assez de flux ou trop de composés. Le système peut quand même être résolu en utilisant la méthode de la pseudo-inverse qui consiste en une minimisation de l'erreur commise sur les vitesses de réactions (vecteur *a*).

Enfin, le cas "T non carrée et U non carrée" (colonne 4) traduit une incohérence totale dans le choix des flux et des composés, qui nécessite une reconstruction du système.

Vallino et Stephanopoulos (1990) ont les premiers développé cette méthode d'évaluation des flux par calcul matriciel. Ils proposent un logiciel baptisé Bionet, adaptable à tous systèmes, qui permet la construction du réseau réactionnel, l'analyse des redondances et le calcul des flux avec ou sans contraintes. Ils présentent par ailleurs plusieurs applications de Bionet adaptées à l'étude de la croissance et de la production de lysine par *Corynebacterium glutamicum* sur glucose (Vallino et Stephanopoulos, 1990 et 1993). Le réseau métabolique proposé contient 37 métabolites et 34 réactions, soit 34 flux à déterminer. Les principales voies du métabolisme central sont représentées dans Bionet (EMP, PPP, TCA), une seule voie anaplérotique (PEPC), certaines voies de biosynthèse d'acides aminés (Glu, Asp, Lys ...) et la synthèse de la biomasse. L'équation de biosynthèse de cette dernière est tirée des travaux d'Ingraham (1983) utilisant 11 précurseurs tous intermédiaires du métabolisme central décrit dans le réseau (la méthode Ingraham a été détaillée au paragraphe I.5.1). La résolution utilise une pseudo-inverse. Les métabolites extracellulaires considérés sont le glucose, la biomasse, la lysine, le CO₂ et l'O₂. Ces auteurs présentent ainsi les calculs des flux et suggèrent deux limitations possibles à la production de lysine : premièrement une trop grande part de glucose totalement oxydé en H₂O et CO₂, indiqué par une production d'ATP élevée, au détriment de la synthèse de lysine ; deuxièmement, une trop faible participation de la voie des pentoses, qui limiterait la synthèse de glutamate (donneur de groupement ammonium pour la lysine) par manque de NADPH. Ces mêmes auteurs se sont également intéressés à la régulation de la répartition du flux aux nœuds G6P et pyruvate (Vallino et Stephanopoulos, 1994a et b). A l'aide de mutant de la souche microbienne et de Bionet, ils concluent que le nœud G6P est "flexible", c'est à dire non soumis à des

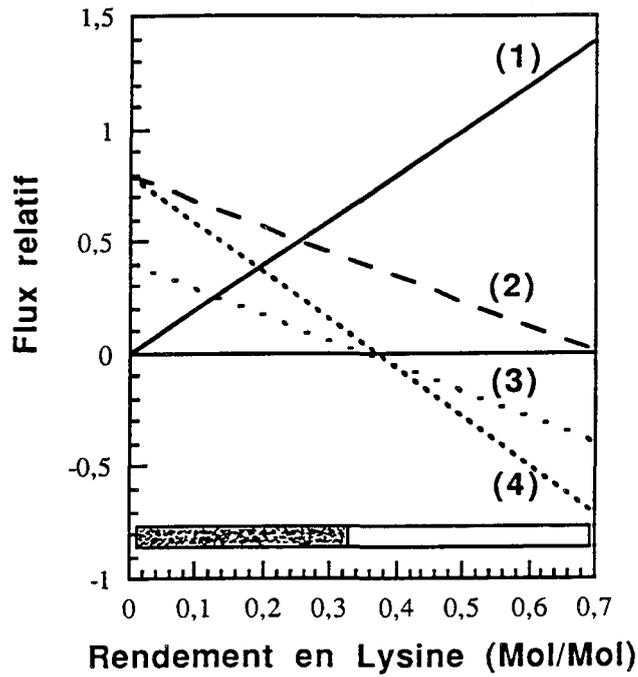
régulations limitant la production de lysine, et que cette dernière n'est pas non plus restreinte par la disponibilité du pyruvate. (remarque : une présentation détaillée de Bionet est proposée au paragraphe I.8).

D'autres études (Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995) utilisant la méthode matricielle font suite à de précédentes études de type non matriciel (Cocaign 1992, Nezondet 1992). Elles portent sur le métabolisme du lactate par *Corynebacterium glutamicum* en culture continue. L'évaluation des flux utilise le programme Bionet adapté au métabolisme du lactate. En particulier, certaines voies anaplérotiques ont été rajoutées comme le cycle de l'acide glyoxylique. Ces études mettent en évidence une accumulation du lactate aux forts taux de croissance, suggérant une limitation du flux au niveau de la pyruvate déshydrogénase. Les auteurs proposent en outre qu'un TCA "modifié" (malate --> pyruvate ---> oxalo-acétate, avec production de NADPH dans la première étape) prenne le relais du TCA "classique" pour subvenir aux besoins importants de NADPH.

Toujours chez les Corynébactéries, Péquignot (1995) a construit un imposant réseau métabolique regroupant une centaine de réactions et autant de métabolites. Outre les voies du métabolisme central, ce réseau très complet réunit toutes les voies anaplérotiques, toutes les voies de biosynthèse des acides aminés, et une synthèse détaillée de toutes les macromolécules (protéines, acides nucléiques, lipides ...) dont l'assemblage constitue la biomasse. Le calcul matriciel ne pouvant cependant pas résoudre les conflits entre certaines voies redondantes, une matrice de contraintes n'en laisse qu'une seule active ou impose la répartition entre ces voies (en particulier pour les voies anaplérotiques). Ces études permettent de proposer la PEP Carboxylase et le cycle de l'acide glyoxylique comme les voies anaplérotiques les plus probables sur glucose et sur fructose respectivement. D'autre part, la répartition du flux carboné entre la glycolyse et la voie des pentoses apparaît comme un paramètre clé de la répartition du flux dans le reste du réseau. Ceci est dû au rôle fondamental de synthèse du NADPH de la voie des pentoses.

De Hollander (1994) propose une application particulièrement intéressante en exploitant les possibilités de simulation de la méthode des bilans matière. Après avoir fixé les voies biochimiques du réseau, il visualise l'effet de la variation du rendement de production de lysine par rapport au substrat consommé ($Y_{lys/glc}$ mol/mol) sur la répartition du flux. Le tracé de l'évolution de certaines étapes réactionnelles en fonction de $Y_{lys/glc}$ permet de déterminer les configurations du réseau les plus probables physiologiquement. La figure I.28-a implique la glycolyse, la voie "linéaire" des pentoses (c'est à dire un seul passage), un cycle de Krebs ne produisant pas de NADPH, la PEPC comme enzyme anaplérotique et la voie de la succinylase pour la biosynthèse de lysine. Ce schéma métabolique montre une relation linéaire entre le flux de la voie des pentoses et le rendement $Y_{lys/glc}$ traduisant un besoin croissant de NADPH. Ceci avait déjà été observé expérimentalement par Ishino et coll. (1991). La partie grisée de la barre d'abscisse (la figure I.28) indique la zone de rendement compatible avec la physiologie ; on constate qu'un rendement maximum de 0,33 mol/mol est possible

(a)



(b)

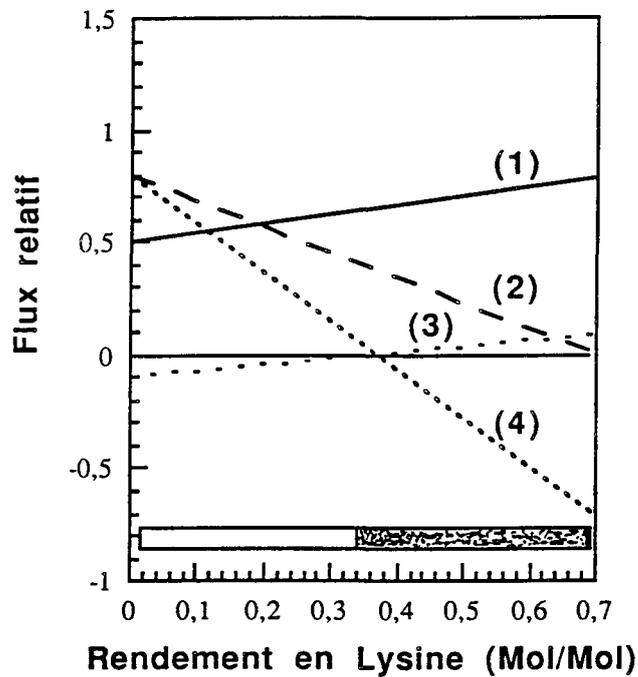


Figure I.28: Analyse métabolique du flux carboné en fonction du rendement de conversion du glucose en lysine par la méthode des bilans matière. La barre grisée indique la zone de rendement compatible avec la biochimie.

- (1) a, glycolyse - b, fonctionnement cyclique de la voie des pentoses
- (2) fonctionnement "linéaire" de la voie des pentoses
- (3) citrate synthase
- (4) succinyl-coenzyme A synthase

avec ce réseau. Des valeurs supérieures impliquent en effet un fonctionnement reverse de la glycolyse, ce qui est impossible dans des conditions générales de catabolisme du glucose. La figure I.28-b montre une simulation où la glycolyse de l'exemple précédent est remplacée par une voie des pentoses cycliques. Ce schéma ne devient physiologiquement possible qu'à partir d'une valeur de 0,32 du rendement $Y_{lys/glc}$, la voie des pentoses ne pouvant pas fonctionner à l'envers. A $Y_{lys/glc}$ supérieur à 0,7 mol/mol, c'est le flux de la citrate synthase qui devient négatif, ce qui est impossible puisque c'est une étape irréversible. Ces simulations permettent de déterminer qu'un rendement maximum de 0,78 mol/mol est possible avec une voie des pentoses cycliques et la PEPC comme voie anaplérotique. C'est la surproduction d'énergie qui devient alors le facteur limitant en bloquant le catabolisme général du glucose.

Ces méthodes sont de plus en plus employées et de nombreux travaux apparaissent dans la littérature, qui ne concernent pas seulement les bactéries. Par exemple, la méthode matricielle a été appliquée chez *Penicillium chrysogenum* pour l'étude de la production de pénicilline (Jørgensen et coll., 1995) ou encore chez des hybridomes producteurs d'immunoglobuline G anti-fibronectine humaine (Zupke et Stephanopoulos, 1995).

I.7.5.3. Comparaison simulations et données expérimentales

Le tableau I.7 rassemble les simulations des évaluations de flux métaboliques concernant les Corynébactéries sur glucose. Seuls quelques flux bruts et les pourcentages de répartition du flux carboné aux nœuds G6P et PEP sont présentés. Le tableau I.8 regroupe des données expérimentales sur la répartition du flux au nœud G6P obtenues par RMN-¹³C pour différentes cultures de Corynébactéries.

La part de voie des pentoses en phase de croissance sur glucose varie de 26 à 80% conduisant à une moyenne de 50% avec un écart type de 20%. Si l'on écarte les résultats extrêmes qui semblent très faible pour Stephanopoulos (26%) et très élevé pour Dominguez (80%), la moyenne passe à 48% avec un écart type de 5%. Ces derniers chiffres sont pleinement en accord avec les 45% avancés par Rollin (1995) suite à des expériences de RMN. En production de lysine, la part de voie des pentoses oscille entre 31 et 46%, en adéquation totale avec les 30 à 40% obtenus par RMN. Lors de la production de glutamate, la part de voie des pentoses semble diminuer puisqu'une valeur expérimentale de 20% mesurée en RMN est proposée par Shiiro (1990).

Au niveau du nœud PEP, les simulations effectuées sur la phase de croissance aboutissent à 75 à 86% pour la "Pyruvate Kinase" et 15 à 24% pour les voies anaplérotiques. Les valeurs expérimentales correspondantes proposées par Rollin (1995) sont de 62% et de 38% respectivement. En production de lysine, la part de "Pyruvate Kinase" varie de 66 à 78% et celle des voies anaplérotiques de 22 à 34%. Aucune donnée expérimentale n'est disponible pour confirmer ces

Tableau I.7 : Méthode des bilans matière : évaluation des flux métaboliques et répartitions aux nœuds chez les Corynébactéries.

	Dominguez (1994)		Péquignot (1995)		Nezondet (1992)	
méthode	matricielle		matricielle		non matricielle	
			croissance		production de glutamine	
état physio.	croissance	maximale	moyenne	croissance	production	
qs	5,34	9,4	6,8	4,38	1,34	
6PG	4,27	4,8	3,5	1,75 (a)	0,54 (a)	
%PPP	82%	51%	51%	40%	40%	
F6P	0,94	4,6	3,4	2,43	0,62	
%EMP	18%	49%	49%	60%	60%	
PEP	7,67 (b)	14	10,2	6,86	2,06	
PK	6,5	10	7,2	5,34	1,34	
%PK	79%	75%	74%	79%	66%	
VA	1,69	3,4	2,5	1,39	0,71	
%VA	21%	25%	26%	21%	34%	
entrée CK	1,15	4,3	3,1	3,74	1,12	
Glutamate	0,51	1,3	0,9	0,68	0,68	
Glutamine	nd	0	0	0,16	0,66	
Lysine	nd	0	0	0	0	
ATP	nd	36,5	26,6	7,6	1,6	

	Vallino (1993)			Vallino (1994)	
méthode	matricielle			matricielle	
	production de lysine			production de lysine	
état physio.	croissance	croiss+prod	production	GPI att (c)	PDC att (d)
qs	3,35	2,83	2,04	0,97	2,17
6PG	0,84	1,95	0,83	0,26	0,98
%PPP	27%	73%	47%	31%	46%
F6P	2,28	0,71	0,94	0,58	1,13
%EMP	73%	27%	53%	69%	54%
PEP	4,8	4,13	3,1	1,6	3,66
PK	4	2,86	2,38	1,25	2,72
%PK	86%	71%	77%	78%	75%
VA	0,67	1,16	0,71	0,35	0,9
%VA	14%	29%	23%	22%	25%
entrée CK	2,31	1,3	1,43	0,88	1,78
Glutamate	0,34	0,14	0,06	0	0,09
Glutamine	0,08	0,04	0,01	0	0
Lysine	0	0,85	0,59	0,35	0,76
ATP	22,3	15,2	16,9	10,7	20,6

nd : non déterminé

(a) part de voie des pentoses fixée à 40%

(b) flux GAP ----> PGA et non PGA ----> PEP

(c) mutant atténué pour la Glucose 6-phosphate Isomérase

(d) mutant atténué pour la Pyruvate Decarboxylase.

données. Ainsi, même si elles présentent un écart type de 10% environ (ce qui correspond à l'ordre de grandeur des erreurs de simulation), les valeurs obtenues par simulation pour les pourcentages de répartition aux différents nœuds sont homogènes et cohérentes avec les mesures expérimentales disponibles.

Les flux bruts sont plus difficiles à comparer car ils sont influencés par les conditions opératoires. Ils apparaissent cependant relativement homogènes. En particulier, la vitesse de consommation de glucose en croissance montre une moyenne de $5,0 \pm 1,2$ mmol/gMS.h. Les données de Péquignot semblent très fortes par rapport aux autres données (dont la moyenne est plutôt $4,6 \pm 0,8$). En production, la consommation de glucose chute fortement avec une moyenne de $1,7 \pm 0,5$, tous acides aminés confondus.

Zupke et Stephanopoulos (1995) ont mené des études RMN- ^{13}C parallèlement à l'évaluation des flux par la méthode matricielle des bilans matière chez les hybridomes. Ils observent également une bonne corrélation entre les simulations et les données expérimentales.

Conclusions :

Les deux méthodes présentées possèdent chacune des avantages et des inconvénients :

- méthode non matricielle : simplicité de mise en oeuvre, modifications aisées (ajouts ou délétions de réactions biochimiques), mais nécessité d'imposer a priori les répartitions aux nœuds et utilisation en simulation peu puissante.
- méthode matricielle : mathématique compliquée, modifications aisées, mais qui risquent d'engendrer des problèmes de redondance ou de non inversibilité, évaluation *in vivo* directe, utilisation en simulation puissante, facilitée par la matrice des contraintes. Mais l'avantage majeur de la méthode matricielle réside dans sa puissance de calcul et dans ses développements mathématiques aisés (analyse de sensibilité par exemple), ce que ne permet pas la méthode non matricielle.

Quelle que soit la méthode utilisée, les simulations montrent une bonne homogénéité dans les résultats et une bonne cohérence avec les données expérimentales. L'efficacité de ces méthodes apparaît ici clairement, non seulement dans l'évaluation des flux métaboliques, mais aussi dans la visualisation de la répartition des flux carbonés. Ce sont donc des outils précieux d'étude et de compréhension du métabolisme cellulaire, bien qu'ils n'intègrent pas encore les phénomènes de régulation. Enfin, ils apparaissent comme des techniques de choix pour l'amélioration de souche par ingénierie métabolique.

Tableau I.8 : Etudes expérimentales de la répartition du flux carboné au nœud du Glucose 6-phosphate par la RMN-¹³C chez les Corynébactéries.

	voie des pentoses	glycolyse	référence
<i>C. melassecola</i> croissance sur glucose	45%	55%	Rollin (1995)
<i>C. melassecola</i> croissance sur fructose	20%	80%	Rollin (1995)
<i>C. glutamicum</i> production de lysine	30 - 40%	60 - 70%	Ishino et Shiio (1991)
<i>C. glutamicum</i> production de glutamate	20%	80%	Ishino et Shiio (1991)
<i>B. ammoniagenes</i> production de glutamate (limitation biotine)	30%	70%	(a)
<i>B. ammoniagenes</i> production de glutamate (excès biotine)	40%	60%	(a)
<i>C. glutamicum</i> croissance et production de lysine	44%	56%	Yamagushi et Ishino (1986)
<i>M. ammoniaphilum</i> croissance et production de glutamate	13%	87%	(a)

(a) D'après Vallino et Stephanopoulos (1993)

I.7.6. Notion de flexibilité et de rigidité des nœuds du réseau

Stephanopoulos et Vallino (1991) ont récemment proposé une réflexion très complète sur le rôle des régulations cellulaires dans l'amélioration génétique des souches microbiennes. Le génie génétique est en effet un outil puissant en théorie, mais dont les applications industrielles réelles sont encore limitées en partie parce que les promesses n'ont pu être tenues. Les modifications génétiques (amplification d'un gène, dérégulation...) sont généralement réalisées au niveau même de la voie de biosynthèse du composé d'intérêt, mais le métabolisme constitue un système généralement équilibré pour maintenir un ratio plus ou moins constant des constituants cellulaires afin de permettre une synthèse de biomasse optimale. Ceci requiert une architecture complexe des régulations, pouvant s'effectuer d'une voie à l'autre et pas uniquement dans la proximité, et qui engendre une certaine capacité à s'opposer aux modifications "anarchiques" de flux. Cette capacité de résistance a été baptisée **rigidité du réseau biochimique**.

Les nœuds d'un réseau métabolique peuvent être classés en trois catégories suivant leur réponse à une perturbation de flux. Un nœud **flexible** est un nœud où la répartition du flux dans chaque branche peut changer pour s'adapter à la demande. Dans un tel cas, les enzymes de chaque branche présentent des caractéristiques cinétiques voisines (affinité pour le métabolite du nœud, vitesse de réaction). Le flux dans chacune des branches est contrôlé par une rétroinhibition exercée par le métabolite terminal correspondant. En conséquence, la répartition du flux peut varier de 0 à 100% dans chaque branche en fonction des besoins en métabolites terminaux. C'est le cas par exemple du nœud "Aspartate semi aldéhyde", dont le flux peut totalement être réorienté vers la synthèse de lysine en supprimant la rétroinhibition concertée de la lysine et de la thréonine sur l'aspartokinase. Un nœud sera dit **faiblement rigide** si la répartition du flux est dictée par une seule des branches, par une très forte affinité de l'enzyme pour le métabolite du nœud par exemple, ou par une très forte activité de cette enzyme. Cette suprématie sera encore renforcée si le métabolite terminal de cette branche n'exerce pas de rétrocontrôle inhibiteur. Ainsi, quelles que soient les conditions, une majorité du flux passe dans cette voie. Un exemple est fourni par le nœud isocitrate, carrefour entre le cycle de Krebs et le Cycle glyoxylique. Dès que l'on ajoute du glucose dans une culture d'*Escherichia coli* sur acétate, l'ICDH du cycle de Krebs devient dominante, réduisant à zéro le flux dans le cycle glyoxylique (sa constante d'affinité pour l'isocitrate est 75 fois inférieure à celle de l'ICL du cycle glyoxylique). La troisième catégorie concerne les nœuds **fortement rigides**. Ils sont caractérisés par une régulation stricte, résultant de la combinaison de plusieurs rétroinhibitions et/ou de l'activation croisée des enzymes par un (ou plusieurs) métabolite d'une autre branche. La répartition du flux dans ce type de nœud est ainsi extrêmement stable. Des exemples ont été décrits, comme dans la synthèse du tryptophane chez *Bacillus subtilis*.

La connaissance du type de chaque nœud est primordiale et permet d'estimer les chances de succès d'une modification génétique. Les nœuds flexibles et faiblement rigides sont manipulables en amplifiant, en atténuant ou en dérégulant une branche (la branche dominante dans le cas des nœuds faiblement rigides). En revanche, il est très difficile de modifier un nœud rigide fort à cause de la complexité de sa régulation.

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de déterminer la nature d'un nœud. La première nécessite la connaissance détaillée des cinétiques enzymatiques du réseau biochimique considéré. Un modèle mathématique peut alors être construit et utilisé pour simuler le flux au travers du réseau et analyser le comportement de chaque nœud. De tels modèles ont par exemple été développés pour la glycolyse et la respiration (Galazzo et Bailey, 1990 ; Cortassa et Aon, 1994). Une autre méthode repose sur la théorie du contrôle métabolique (Kacser et Burns, 1973, dont une présentation plus détaillée sera faite dans le paragraphe suivant) ou de la théorie des systèmes biochimiques (Savageau, 1976). Ces méthodes nécessitent également la connaissance parfaite des cinétiques enzymatiques, et réalisent un calcul de sensibilité de chaque réaction à une perturbation de flux ou de concentration en un métabolite. Un coefficient de sensibilité élevé indique un nœud. Ces techniques ont en outre des domaines d'applications restreints. Une dernière méthode fait appel à la modélisation du réseau biochimique par la méthode des bilans matière. Comme nous l'avons vu précédemment, les seules informations requises sont la biochimie du réseau et la mesures des composés extracellulaires consommés ou produits. Il faut alors créer des perturbations de manière à en apprécier l'effet sur les calculs des flux par rapport à la situation normale. Ces perturbations peuvent être l'atténuation d'une activité enzymatique grâce à un inhibiteur spécifique, l'amplification ou l'atténuation d'une activité enzymatique par génie génétique, un stress environnemental comme le changement de source de carbone par exemple, ou encore la dérégulation de voies compétitives. Cette méthode a été employée par Vallino et Stephanopoulos pour caractériser les nœuds G6P et PEP d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* surproducteur de lysine (Vallino et Stephanopoulos, 1994 a et b). Le nœud G6P est flexible et le nœud PEP rigide fort.

Chacune de ces méthodes possède des avantages et des inconvénients, mais elles peuvent aider à localiser les points de contrôle du métabolisme et à définir les stratégies pour les éliminer pour finalement parvenir à l'amplification d'une production donnée.

I.7.7. La Théorie du Contrôle Métabolique

La Théorie du Contrôle Métabolique (TCM) développée par Kacser et Burns (1973) est encore appelée Analyse du Contrôle Métabolique (ACM). Cette théorie est très proche de celles proposées par Heinrich et Rapoport (1974) ou Savageau (1976). Ces techniques ne sont pas des méthodes d'évaluation des flux métaboliques au sein d'un réseau de réactions biochimiques, mais des méthodes

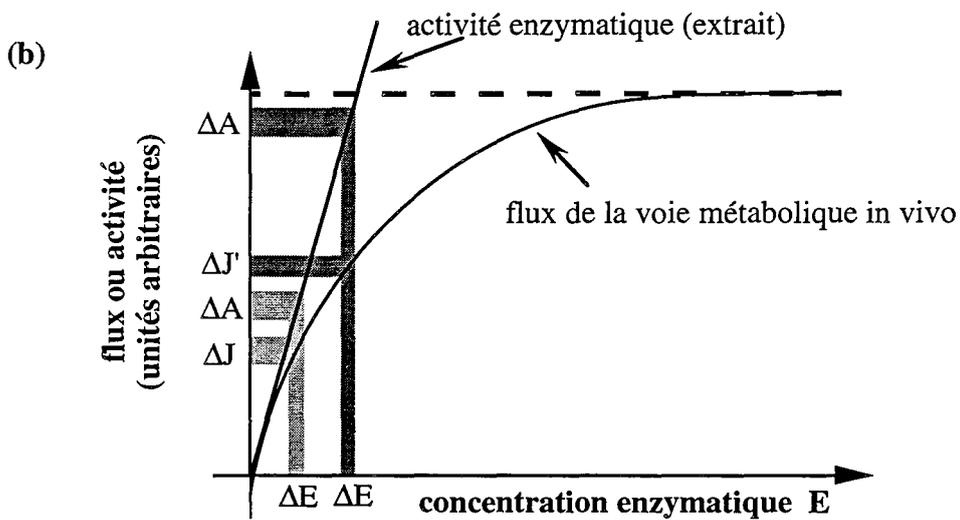
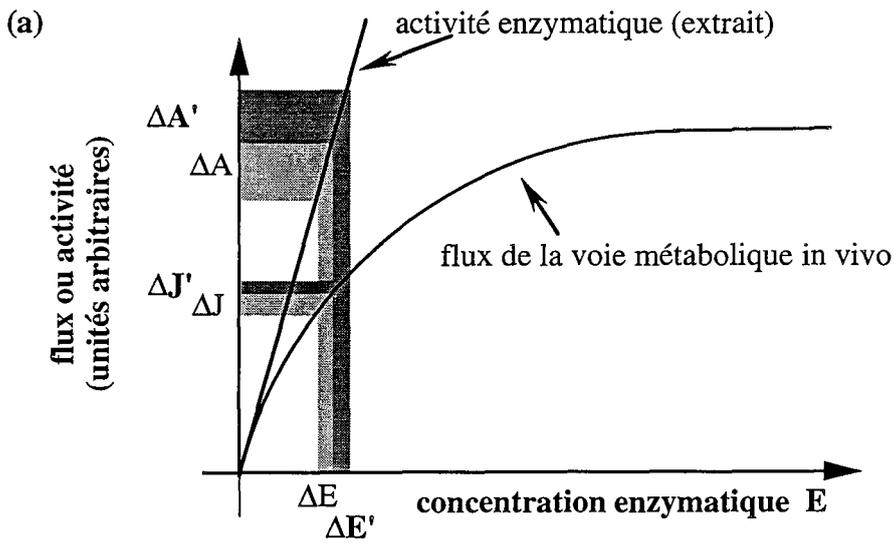


Figure I.29 : Effet de variations dans l'activité enzymatique sur le flux métabolique au sein d'un réseau. (D'après Mazat, 1987)

pour étudier la répartition du contrôle des flux par les enzymes ou par les métabolites. Elles reposent sur un certain nombre d'hypothèses de départ :

- le réseau biochimique est linéaire,
- la stœchiométrie de chaque réaction est égale à 1,
- une seule enzyme catalyse chaque réaction, et elle est différente pour chaque réaction,
- la vitesse de chaque réaction est du premier ordre par rapport à la concentration en enzyme,
- le système est à l'état stationnaire,
- enfin, on suppose qu'il existe une solution unique au problème.

Des développements plus récents de la TCM (que nous ne présenterons pas ici) ont permis de contourner ces hypothèses très restrictives en appliquant la méthode aux réseaux biochimiques branchés par exemple.

I.7.7.1. Développements théoriques

Dans la TCM, on considère une chaîne de réactions biochimiques, indépendantes entre elles, et qui engendrent, à l'état stationnaire, un flux métabolique J . L'examen de la figure I.26 fournit deux renseignements. Premièrement, l'effet phénotypique (c'est à dire sur le flux global de la chaîne réactionnelle considérée) d'un changement dans l'activité enzymatique dépend de la taille du changement réalisé, à cause de la non linéarité de la relation. La figure I.29-a montre que le rapport des variations de flux $\Delta J/\Delta J'$ n'est pas proportionnel au rapport des variations d'activité enzymatique $\Delta A/\Delta A'$. Nous avons posé $\Delta E'=2\Delta E$ (soit $\Delta E/\Delta E'=1/2$). Ceci se traduit par $\Delta A/\Delta A'=1/2$, mais par $\Delta J/\Delta J' < 1/2$. Deuxièmement, l'effet dépend de l'endroit de la courbe où ce changement est effectué. Ainsi, un changement d'activité enzymatique au niveau du plateau à peu d'effet sur le flux, alors que le même changement sur la partie ascendante de la courbe aura un effet plus important (figure I.29-b, $\Delta J' < \Delta J$ pour un même ΔA).

Le rapport $\Delta J/\Delta E$ fournit donc une mesure de l'effet d'un changement d'activité enzymatique ΔE sur le flux J . Or cette mesure est peu maniable, d'abord parce qu'elle dépend des unités, ensuite parce que le rapport va dépendre de la valeur absolue du changement ΔE . On préférera donc la forme de l'équation [I.10]

$$\frac{\Delta J}{J} \bigg/ \frac{\Delta E}{E} \text{ avec } \Delta E \rightarrow 0, \quad \text{soit } C_{E_i}^J = \frac{dJ}{J} \bigg/ \frac{dE_i}{E_i} = \frac{D \ln J}{D \ln E_i} \quad [\text{I.10}]$$

remarque : D symbolise ici la dérivée totale.

Ce rapport $C_{E_i}^J$ est appelé coefficient de contrôle du flux J par l'activité enzymatique E_i . De la même manière, on définit les coefficients de contrôle des concentrations, notés $C_{E_i}^{S_j}$, c'est à dire l'effet d'une variation de l'activité enzymatique E_i sur la concentration du métabolite j (équation [I.11]) :

$$C_{E_i}^{S_j} = \frac{\frac{dS_j}{S_j}}{\frac{dE_i}{E_i}} = \frac{D \ln S_j}{D \ln E_i} \quad [I.11]$$

Ces deux types de coefficients fournissent une quantification de l'importance d'une enzyme particulière E_i sur un flux J_j ou sur la concentration d'un métabolite S_j . Si la valeur du coefficient est très faible, alors l'enzyme n'exercera pas de contrôle significatif sur les variables qui en dépendent : un changement important de l'activité enzymatique correspondante n'entraînera en général qu'un changement négligeable dans les flux. En revanche, une valeur élevée indique un contrôle important de l'enzyme sur l'étape considérée. Rappelons enfin que les valeurs des coefficients sont obtenues pour un état stationnaire donné et qu'elles seront différentes pour un autre état stationnaire.

● Théorème de sommation :

Pour tout flux à l'état stationnaire, on peut définir autant de coefficients de contrôle de flux qu'il y a d'enzymes dans le système. On peut alors démontrer théoriquement - et cela a été vérifié dans de nombreux cas expérimentaux - que la somme des coefficients de contrôle est égale à 1 (équation [I.12])

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^J = 1 \quad [I.12]$$

rappel : cette relation n'est valable que pour des cinétiques de réactions d'ordre 1 vis à vis de la concentration en enzyme.

Ce théorème a deux conséquences importantes :

- le contrôle des flux peut être partagé entre plusieurs étapes d'une voie métabolique,
 - la distribution du contrôle entre les différentes étapes peut changer quand l'état stationnaire est changé, c'est à dire que les coefficients de contrôle varient tout en conservant leur somme égale à 1.
- Un changement dans l'activité ou la concentration d'une enzyme quelconque aura pour conséquence un changement dans les flux et les concentrations des intermédiaires métaboliques, changement transmis d'une étape à une autre à travers le réseau jusqu'à atteindre un nouvel état stationnaire. Cette transmission dépendra des réponses locales de chaque vitesse V_j aux changements des métabolites qui participent à la réaction. Cette réponse est appelée coefficient d'élasticité de la vitesse V_j par rapport au métabolite S_i (équation [I.13]) :

$$\varepsilon_i^j = \frac{d \ln V_j}{d \ln S_i} \quad [I.13]$$

Les coefficients d'élasticité sont liés par la propriété de connexion (relation [I.14]) qui traduit le fait que la réponse d'un système est le résultat de l'ensemble de toutes les réponses locales.

$$\sum_{j=1}^n C_{E_j}^J \varepsilon_i^j = 0 \quad [I.14]$$

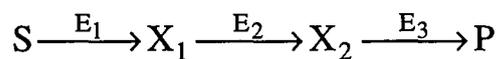
Les deux propriétés de sommation et de connexion sont fondamentales et donnent les contraintes selon lesquelles le contrôle métabolique est distribué dans un système (linéaire).

I.7.7.2. Applications de la TCM

La mise en œuvre de la TCM implique la détermination expérimentale des coefficients de contrôle ou des coefficients d'élasticité. Le principe est de faire varier une activité enzymatique ou un substrat pour observer la réponse sur le flux. Plusieurs méthodes ont été proposées et appliquées, comme l'utilisation de manipulations génétiques plaçant l'expression d'une enzyme sous la dépendance d'un promoteur inductible contrôlable, l'emploi d'inhibiteurs spécifiques modulant l'activité enzymatique, ou le recours à des modifications environnementales (limitations, stress...).

La TCM a tout d'abord été illustrée par des exemples de chaînes linéaires, même si les théorèmes de sommation et de connexion avaient été montrés applicables à tout réseau métabolique à l'état stationnaire. L'application à une chaîne branchée fut démontrée par la suite (Kacser, 1983). L'approche similaire de Heinrich et Rapoport (1974) fut aussi appliquée d'abord à des chaînes linéaires puis à des branches et à des cycles (Heinrich, Rapoport et Rapoport, 1977). Cependant, ces illustrations se rapportaient à des chaînes modèles simples. Une méthode générale a ensuite été développée pour traiter des réseaux complexes et permettre le calcul des coefficients de contrôle de la manière la plus simple possible (Fell et Sauro, 1985). Ces auteurs ont eu recours à un formalisme matriciel présenté ci-dessous.

Considérons la chaîne suivante :



et les relations

$$C_1^j + C_2^j + C_3^j = 1 \quad [I.15]$$

$$C_1^j \varepsilon_1^1 + C_2^j \varepsilon_1^2 + C_3^j \varepsilon_1^3 = 0 \quad [I.16]$$

$$C_1^j \varepsilon_2^1 + C_2^j \varepsilon_2^2 + C_3^j \varepsilon_2^3 = 0 \quad [I.17]$$

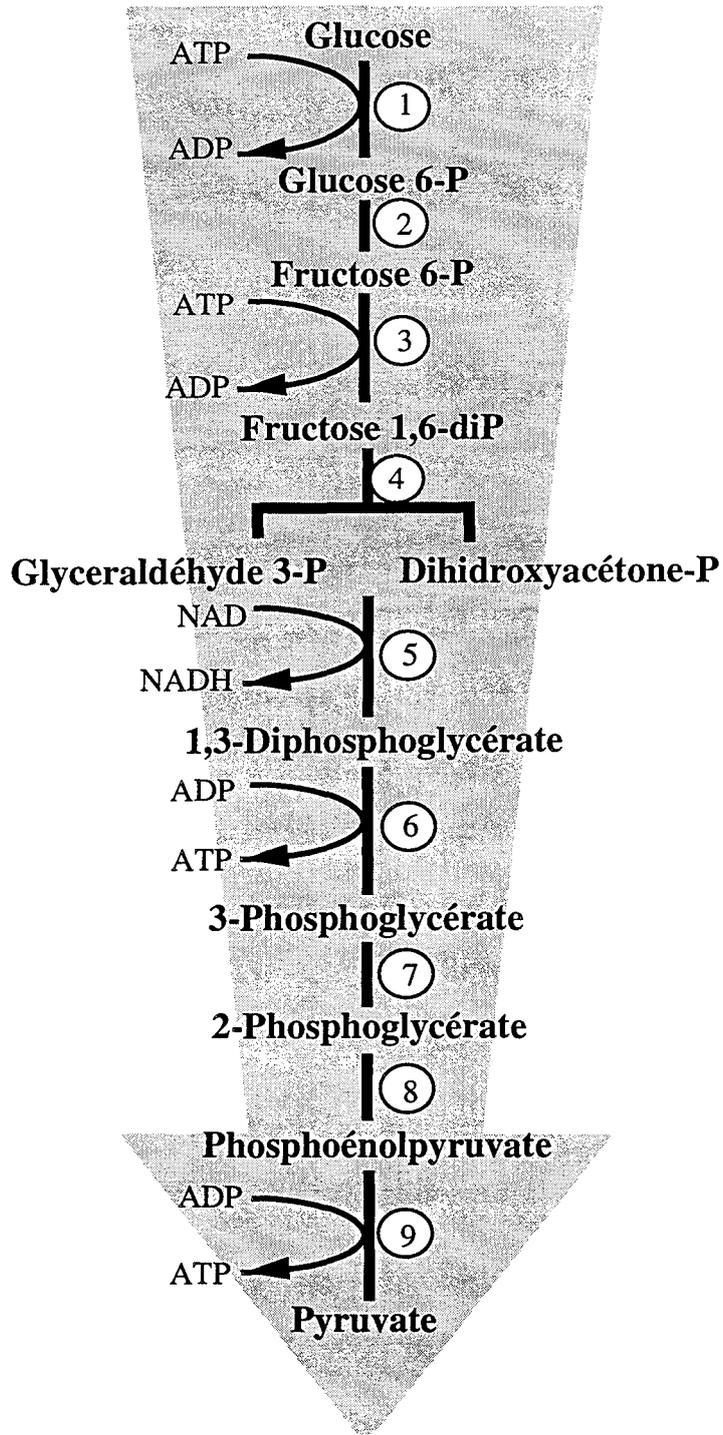


Figure I.30 : Schématisation de la glycolyse chez la levure.

- (1) perméase, (2) phosphohexose isomérase, (3) phosphofruktokinase,
 (4) aldolase, (5) GAP déshydrogénase, (6) phosphoglycérate kinase,
 (7) phosphoglycérate mutase, (8) énoïase, (9) pyruvate kinase.

La relation [I.15] exprime le théorème de sommation pour les coefficients de contrôle de flux, et les équations [I.16] et [I.17] traduisent les deux relations de connexion faisant intervenir les coefficients de contrôle de flux et les élasticités des enzymes par rapport aux métabolites X_1 et X_2 . Ces trois équations permettent le calcul des coefficients de contrôle des flux en termes de propriétés des enzymes, les élasticités.

Les trois équations peuvent être écrites sous forme matricielle [I.18]

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \varepsilon_1^1 & \varepsilon_1^2 & 0 \\ 0 & \varepsilon_2^2 & \varepsilon_2^3 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} C_1^j \\ C_2^j \\ C_3^j \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad [\text{I.18}]$$

qui permet de condenser les données du problème et de le résoudre facilement par une simple inversion matricielle (à condition que les contraintes du calcul matriciel soient respectées).

De la même manière, les coefficients de contrôle des concentrations peuvent être introduits dans la matrice et calculés simultanément aux coefficients de contrôle de flux.

I.7.7.3. Exemple de la glycolyse de la levure

Cet exemple est proposé par Sauro et coll. (1987). La glycolyse de la levure constitue une chaîne métabolique linéaire pour laquelle les concentrations en métabolites ont été mesurées et pour laquelle les cinétiques des enzymes sont assez bien connues (figure I.30). Les hypothèses de base sont les suivantes :

- le glucose intracellulaire est la source de la chaîne, le pyruvate en est le produit terminal,
- les quantités de nucléotides adényliques et du couple NAD/NADH sont maintenus constants par des mécanismes externes à la glycolyse.

Un système de 9 enzymes et de 8 métabolites est ainsi obtenu. Les élasticités des enzymes vis à vis des métabolites ont été calculées par différenciation numérique des lois de vitesses pour des concentrations en métabolites fournis par la littérature, en ajoutant une inhibition de l'hexokinase par son produit (le G6P) avec un K_i de 9 mM. Ces données permettent d'écrire la matrice E, de dimensions 9 x 9 (tableau I.9). Les colonnes correspondent aux enzymes, la première ligne est réservée aux valeurs 1 du théorème de sommation et les 8 autres aux relations de connexion des 8 métabolites. Ainsi, l'élément de la ligne 2 colonne 1 est l'élasticité de l'hexokinase par rapport à son produit le G6P. (Remarque : les élasticités vis à vis des substrats sont positives alors qu'elles sont négatives vis à vis des produits). Les éléments non nuls se trouvent donc logiquement sur la diagonale. On notera cependant l'élément de la ligne 4 et de la colonne 9 qui traduit l'inactivation de la pyruvate kinase par le F1,6-diP.

Tableau I.9 : Matrice des élasticités des enzymes vis à vis des métabolites pour la glycolyse de la levure (d'après Fell, Sauro et Rankin, 1987).

	HK	PGI	PFK	Aldolase	GAPDH	PGK	PGM	Enolase	PK
sommation	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G6P	-0,036	3,98	0	0	0	0	0	0	0
F6P	0	-3,98	0,031	0	0	0	0	0	0
FBP	0	0	0	3,53	0	0	0	0	0,0026
DHAP+GAP	0	0	0	-6,87	0,025	0	0	0	0
DPG	0	0	0	0	0	0,48	0	0	0
3-PG	0	0	0	0	0	-0,05	0,39	0	0
2-PG	0	0	0	0	0	0	-0,29	0,96	0
PEP	0	0	0	0	0	0	0	-0,60	0,68

Tableau I.10 : Matrice des coefficients de contrôle pour les enzymes de la glycolyse de la levure (d'après Fell, Sauro et Rankin, 1987).

	C_{flux}	C_{G6P}	C_{F6P}	C_{FBP}	C_{D+G}	C_{DPG}	C_{3PG}	C_{2PG}	C_{PEP}
HK	0,46	15,0	14,9	36,0	18,4	1,13	1,62	0,82	0,54
PGI	0,004	-0,12	0,13	0,33	0,17	0,01	0,01	0,007	0,004
PFK	0,54	-14,9	-15,0	41,8	21,4	1,31	1,88	0,95	0,63
Aldolase	0,0	0,0	0,0	-0,28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,001
GAPDH	0,0	0,0	0,0	-77,8	-40,0	0,01	0,10	0,19	0,30
PGK	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,08	0,0	0,0	0,0
PGM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,27	-2,56	0,0	0,0
Enolase	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,06	-0,56	-1,04	0,0
PK	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,05	-0,50	-0,92	-1,47

La résolution du calcul matriciel conduit à la matrice C donnée tableau I.10. La première colonne indique les coefficients de contrôle de flux de chaque enzyme. On remarque les trois coefficients non nuls pour l'hexokinase (0,46), la phosphogluco-isomérase (0,004) et la phosphofructokinase (0,54). Tous les autres sont nuls parce qu'aucun terme d'inhibition par le F1,6-diP ne les concerne. Ces coefficients ont par ailleurs été mesurés expérimentalement pour la glycolyse dans des extraits de foie de rat (Torres et al, 1986). Les valeurs observées (respectivement 0,77, 0 et 0,24) suggèrent que les calculs fournissent des résultats vraisemblables malgré les simplifications.

Les coefficients de contrôle des concentrations sont donnés par les colonnes suivantes. Il apparaît ainsi que les niveaux de G6P et F6P sont seulement influencés par les trois premières enzymes. Le F1,6-diP montre des coefficients particulièrement élevés pour l'HK, la PFK et la GAPDH, ce qui souligne le fait que le contrôle des concentrations peut être distribué différemment du contrôle des flux. Les très grandes valeurs parfois obtenues suggèrent une sensibilité excessive de ces "états stationnaires" aux perturbations, ce qui mériterait d'être approfondi.

I.7.7.4. Récents développements

Fell (1992) et Liao et Delgado (1993) présentent des revues sur les récents développements de la TCM. Cette méthode a permis l'étude de la régulation de nombreux systèmes biologiques : glycolyse de la levure, glycolyse de l'hépatocyte du rat, néoglucogénèse à partir du lactate dans l'hépatocyte du rat, contrôle de la synthèse d'ATP par le transporteur de phosphate dans les mitochondries de levure, effet du pH du milieu et de l'immobilisation des levures sur la production d'éthanol (Galazzo et Bailey, 1990)... Des études ont également été menées afin de faciliter la mise en oeuvre de cette technique : méthodes de détermination des coefficients de contrôle à partir des données expérimentales (Delgado et coll., 1993 ; Schlosser et coll., 1993), logiciel d'aide aux calculs des différents coefficients (Letellier et coll., 1991)... ou pour de nouvelles applications telles que l'étude des interactions microbiennes en culture mixte (Allison et coll., 1993) ou l'optimisation de procédés (Torres, 1994).

Conclusion :

Malgré les récents développements et les applications de plus en plus nombreuses, la TCM reste une méthode peu employée et peu connue. Ceci provient certainement du fait d'une théorie et de calculs relativement complexes, mais aussi des connaissances requises, qui sont difficiles à obtenir et souvent sujettes à controverses. Mais la TCM apparaît comme un outil puissant pour élucider les mécanismes de contrôle de systèmes biologiques et en particulier du flux dans un réseau métabolique.

I.7.8. Conclusion générale sur l'analyse métabolique

La connaissance parfaite de la biochimie cellulaire est la base nécessaire à des études fiables. Malgré des connaissances bien établies, il reste encore de nombreuses incertitudes rendant indispensables les études enzymologiques classiques et la recherche théorique de nouvelles voies métaboliques. Les traceurs radioactifs et surtout la RMN sont des outils de choix pour tester l'existence réelle de ces nouvelles voies, mais également pour apprécier la répartition du flux dans l'ensemble du réseau métabolique. Mais les méthodes mathématiques d'évaluation des flux sont les seuls moyens actuellement disponibles pour étudier un réseau complexe de réactions biochimiques.

Dans l'attente de la technique idéale permettant de mesurer individuellement les flux métaboliques *in vivo*, il est donc nécessaire de combiner et de comparer les différentes approches expérimentales et théoriques mises à la disposition de la recherche.

I.8. Etude de Bionet

Bionet est un logiciel destiné à faciliter la construction et l'analyse de réseaux de réactions biochimiques. Il permet également d'évaluer la distribution du flux métabolique dans un réseau à partir de mesures expérimentales. Ce programme a été développé en 1991 par Vallino et Stephanopoulos. Il peut être obtenu (gratuitement) en contactant les auteurs ("Chemical Engineering Department", Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Etats Unis).

Ce programme informatique est écrit en Fortran pour un microordinateur PC (640 Ko de mémoire vive, coprocesseur mathématique). Un moniteur couleur est préférable pour la lisibilité des instructions, mais une carte graphique n'est pas nécessaire.

I.8.1. Présentation générale

Le principe de base du calcul des flux employé par Bionet a été décrit dans le paragraphe précédent (I.7.4.2.). La méthode repose sur les bilans matière à chaque nœud du réseau biochimique ; l'hypothèse de l'état pseudo-stationnaire est invoquée pour tous les métabolites intracellulaires et la résolution du système est matricielle, de type $A \cdot x = r$. L'objectif de cette partie sera de présenter l'aspect "utilisation" de Bionet, sa convivialité, ses capacités et ses limites.

L'organisation générale de Bionet suit l'ordre logique des événements :

- construction du réseau de réactions biochimiques, abrégé BRNE (BioReaction Network Equation),
- tests mathématiques et corrections éventuelles du BRNE,
- construction du fichier de mesures expérimentales,
- test mathématique du fichier de mesures,

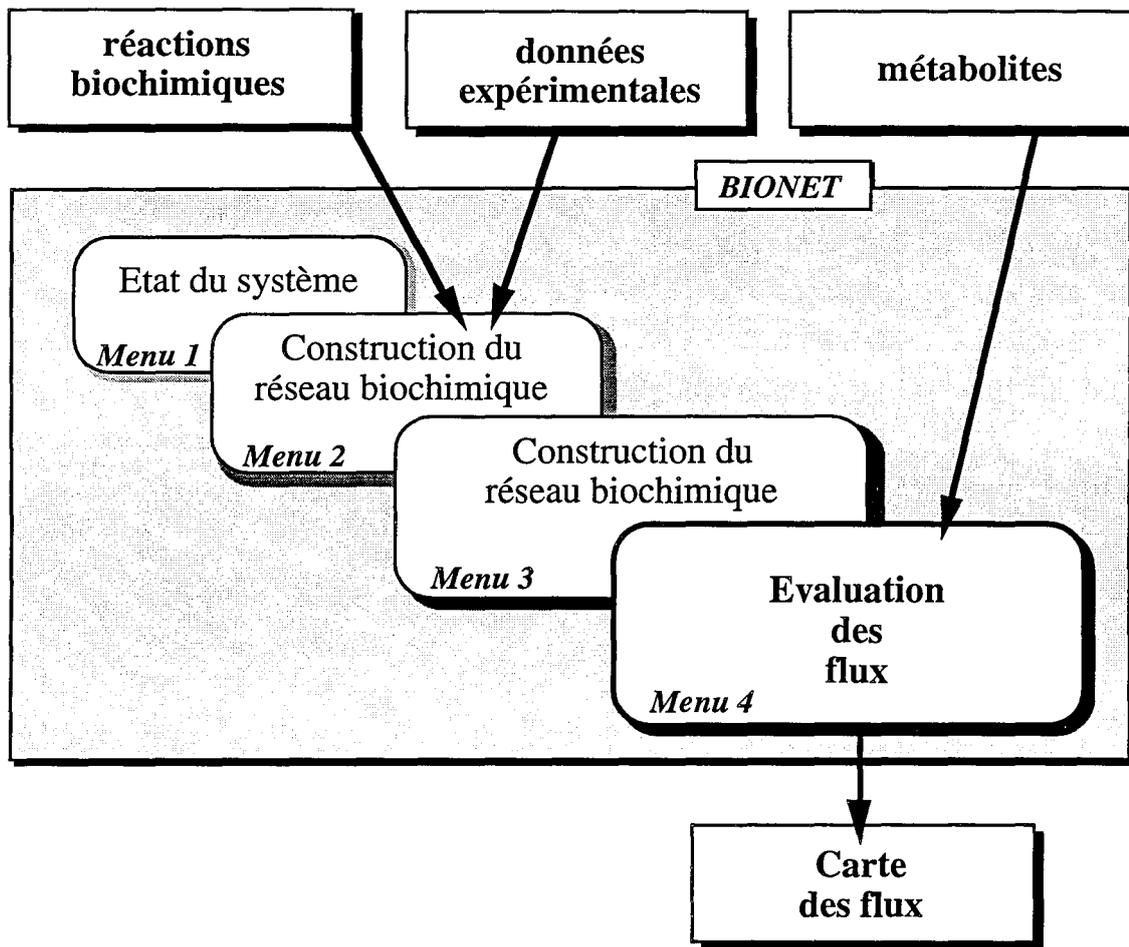


Figure I.31 : Organisation générale de Bionet.

- calcul des flux réactionnels.

Ces différentes séquences sont réalisées grâce à une série d'instructions regroupées en 4 menus principaux (figure I.31) :

- **Menu 1** : - présentation de l'état physique (défini ou non défini) des variables du système
- déplacement dans l'arborescence mémoire afin d'accéder au répertoire contenant les fichiers de l'utilisateur
- **Menu 2** : - construction du BRNE à partir des fichiers de données
- **Menu 3** : - analyse du BRNE
- construction de la matrice de consistance du BRNE
- **Menu 4** : - construction du vecteur de mesures expérimentales
- analyse de consistance des mesures
- résolution du BRNE en fonction des mesures.

Les différents fichiers utilisés ou construits par Bionet sont caractérisés par leur extension de nom de fichier. L'utilisateur pourra ainsi aisément distinguer ces fichiers et leur rôle (Tableau I.11).

Tableau I.11 : Description des fichiers informatiques utilisés dans Bionet.

<i>contenu du fichier</i>	<i>extension</i>
liste des réactions biochimiques	*.BIO
liste des composés intracellulaires	*.CMP
matrice de description du réseau biochimique et matrice des contraintes	*.ACB
matrice de redondances	*.Z
matrices résultant de l'analyse de singularités	*.UP
valeurs singulières de la matrice du réseau	*.SVD
analyse de sensibilité des flux par rapport aux mesures	*.DXR
analyse de sensibilité des flux par rapport aux réactions	*.DXA
vecteur des mesures expérimentales	*.R
variances sur les mesures	*.VAR
vecteur des flux	*.FLX

Un certain nombre d'individus mathématiques- matrices et vecteurs - sont manipulés par Bionet dont les noms, dimensions et contenu sont décrits dans le tableau I.12.

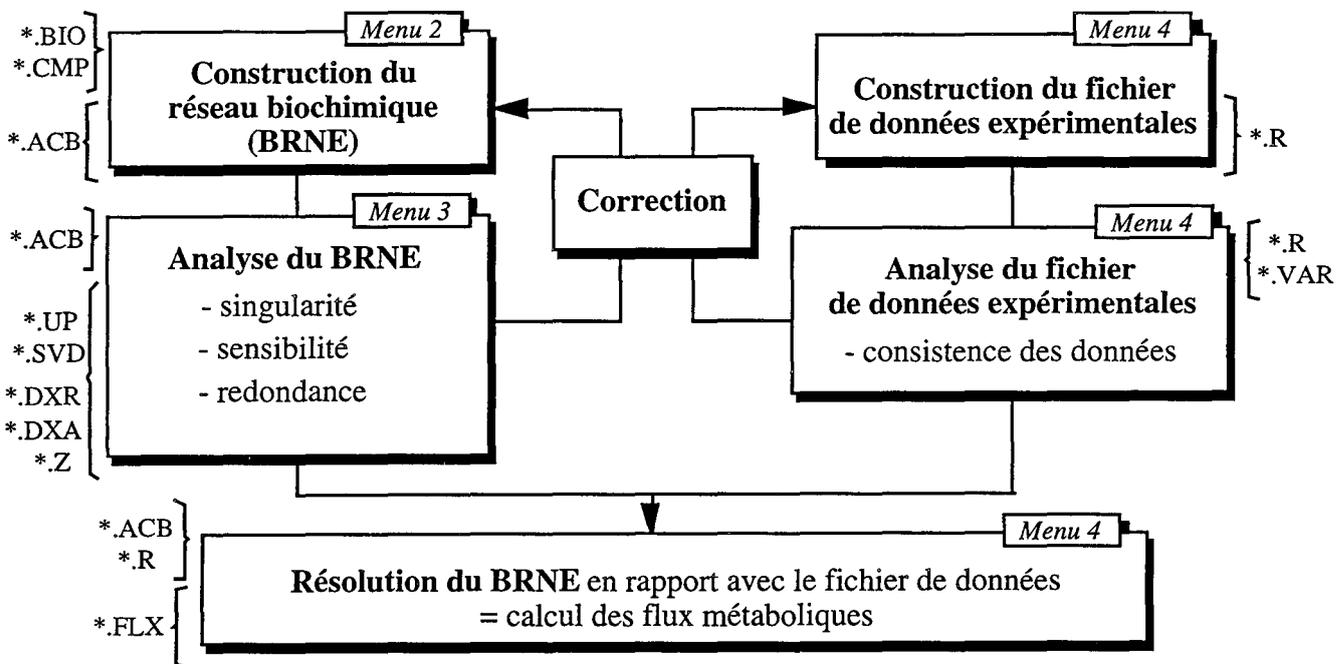


Figure I.32 : Algorithme général de Bionet.

Tableau I.12 : Description des individus mathématiques (variables) manipulés par Bionet

<i>Variables principales</i>	<i>Dimensions</i>	<i>Description</i>
A	$m * n$	Matrice des stœchimétries de réactions
x	n	Vecteur des flux métaboliques
r	mr	Vecteur des vitesses d'accumulation
Z	$l * mz$	Matrice des redondances
b	k	Vecteur des contraintes
C	$k * n$	Matrice des stœchiométries de contrainte

L'algorithme général utilisé dans Bionet est présenté sur la figure I.32. Cette figure montre également les endroits où interviennent les fichiers précédemment décrits.

I.8.2. Construction du BRNE

I.8.2.1. Description

Elle est accessible par le Menu 2. Il s'agit de construire la matrice des stœchiométries des réactions du réseau biochimique (matrice **A**) ainsi que l'équation des contraintes (matrice **C** et vecteur **b**), telles que $A \cdot x = r$ avec $C \cdot x \geq b$.

La matrice **A** est construite automatiquement à partir des fichiers des réactions biochimiques (*.BIO) et des composés intracellulaires (*.CMP). Ces derniers doivent être fournis par l'utilisateur. Bionet compare ensuite le fichier des réactions et celui des composés à la recherche des métabolites cités dans le fichier "composés" et n'apparaissant dans aucune réaction. Si le cas se présentait, cela se traduirait par une ligne de 0 dans la matrice **A**, engendrant une matrice dite singulière non résoluble (un des flux ne serait pas défini de manière unique par le système créant une impossibilité). Dans le cas où un tel composé serait détecté, il faudrait le retirer du fichier de composés ou l'intégrer dans les réactions. Bionet établit également la liste des composés n'intervenant qu'une seule fois dans les réactions. Il s'agit de métabolites sur lesquels le bilan matière et l'hypothèse de l'état pseudo-stationnaire ne pourront être appliqués, ce sont donc théoriquement des composés extracellulaires.

La procédure de construction de la matrice **A** s'achève avec l'affichage de ses dimensions et de la mention "defined". Ceci ne sera possible que si le système est résoluble, c'est à dire si le nombre d'équations (nombre de réactions, *m*) est supérieur au nombre d'inconnues (nombre de flux, *n*) et si la matrice n'est pas singulière.

Dans un deuxième temps, et si l'option a été choisie, ce menu permet également la construction des contraintes. Il s'agit en fait du sens des réactions irréversibles. Ces contraintes se traduisent par une matrice de stœchiométries (matrice **C**) et du vecteur de contraintes proprement dit (vecteur **b**), qui ne contient que des 0.

Il est possible d'enregistrer ces éléments **A**, **C** et **b** dans un même fichier (*.ACB) de manière à pouvoir réutiliser ou modifier ce réseau biochimique sans avoir à le reconstruire à partir des fichiers initiaux.

I.8.2.2. Exemple

Prenons par exemple les 4 réactions biochimiques suivantes stockées dans un fichier sous le nom "exemple.BIO" :

- 1) G6P <----> F6P
- 2) F6P + ATP ----> 2 GAP + ADP
- 3) GAP + ADP + NAD <---- NADH + PGA + ATP
- 4) G6P + NADP ----> 6PG + NADPH

Le fichier "exemple.CMP" contient la liste suivante : ATP, 6PG, F6P, GAP, PGA, NADH et NADPH. A partir de ces deux fichiers de données, Bionet construit le fichier "exemple.ACB", qui contient la matrice des stœchiométries (matrice A) et le système des contraintes (matrice C et vecteur b) :

$$A = \begin{bmatrix} 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad C = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad b = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Tous les composés se retrouvent bien au moins une fois dans les réactions. On notera que les couples de cofacteurs et coenzymes (ATP/ADP, NADH/NAD...) ne sont décrits que par un des deux composants (pour éviter les colinéarités des colonnes), et que le G6P, composé initial, n'est pas considéré (une réaction implique au moins deux composés mais n'est définie que par un flux, se référant soit au substrat, soit au produit). D'autre part, PGA, 6PG, NADH et NADPH seraient ici considérés comme métabolites extracellulaires puisqu'ils n'apparaissent qu'une seule fois dans les réactions. Ainsi, la matrice A est a priori définie et mathématiquement résoluble ; elle ne présente aucune ligne de 0 et ses dimensions m * n sont égales à 7 * 4, avec m > n.

I.8.2.3. Modifications du réseau

Le menu 2 offre la possibilité de rappeler les fichiers *.ACB et d'en modifier ponctuellement le contenu. Il suffit d'indiquer la position de l'élément à modifier et d'en donner la nouvelle valeur. Ceci permet de corriger un des coefficients stœchiométriques de la matrice A sans avoir à la reconstruire à partir des fichiers initiaux. Mais cela permet aussi de modifier les contraintes en agissant sur le vecteur b. On pourra par exemple imposer que le flux de la réaction (4) soit supérieur ou égal à 20% (en supposant que le flux (1) est fixé à 100) en indiquant $b_{(3)}=20$.

Cette procédure permet également de définir entièrement A, C et b, élément par élément, sans utiliser les fichiers *.BIO et *.CMP. Mais la grande taille des réseaux biochimiques rend très vite cette tâche fastidieuse et source d'erreurs.

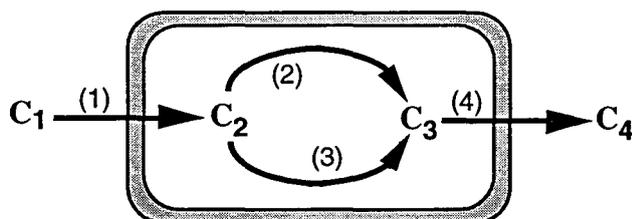
I.8.3. Analyse du BRNE et construction de la matrice de redondances

Ces options sont accessibles sous le menu 3 et nécessitent bien entendu l'existence d'un BRNE, avec ou sans contraintes. Ce menu permet

- l'analyse de singularité et de redondance,
- la décomposition en valeurs singulières,
- l'analyse de sensibilité.

Rappel sur la notion de singularité :

Le schéma ci-dessous représente un réseau biochimique simplifié à l'extrême, dans lequel les réactions (2) et (3) ne peuvent pas être distinguées l'une de l'autre en ne considérant que les mesures extracellulaires (C1 et C4).



La matrice de stœchiométries décrivant ce réseau serait donc singulière. Pour que ce système soit résoluble matriciellement, ces deux réactions doivent être groupées ou l'une des deux éliminée. Un exemple concret est proposé par le cycle de Krebs et le cycle du glyoxylate. Lorsque ces deux voies métaboliques sont réunies dans un même réseau biochimique, elles constituent un groupe singulier puisqu'il n'est pas possible de déterminer la répartition du flux entre les deux à partir des seules mesures extracellulaires. Généralement, le cycle du glyoxylate est éliminé car réprimé ou très faiblement actif sur glucose. De même, aucune distinction mathématique n'est possible pour les différentes réactions anaplérotiques $\text{PEP} \leftrightarrow \text{OA}$ ou $\text{Pyr} \leftrightarrow \text{OA}$. Elles sont généralement regroupées sous l'activité majoritaire de la PEP carboxylase.

Conclusion :

La singularité d'une matrice empêche la résolution du BRNE. Cette singularité peut être due à une ligne nulle ou à deux (ou plus) réactions dépendantes. Elle peut être levée par regroupement ou élimination de réactions biochimiques dans le réseau considéré.

I.8.3.1. Procédure d'analyse de singularités et de redondances

Cette procédure calcule le rang de la matrice **A** (nombre de lignes indépendantes) et construit la matrice de redondance **Z**. La technique employée est celle du Pivot de Gauss, qui recherche le nombre de lignes dépendantes dans la matrice **A** et crée la matrice **P** (matrice de permutation) telle que :

$$\mathbf{P} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{r}$$

$\mathbf{P} \cdot \mathbf{A} = \mathbf{U}$ sera une matrice triangulaire supérieure (ou une matrice diagonale, au choix) dont le nombre de lignes de 0 à la base représente le nombre l de lignes dépendantes dans la matrice **A**. Le rang de **A** sera alors égal à $m-l$. Si $m-l < n$, la matrice **A** est singulière et le BRNE est impossible à résoudre. La matrice de redondance **Z** sera formée des l dernières lignes de la matrice **P**.

I.8.3.2. Identification des groupes de singularités

Les groupes de singularités sont déterminés en examinant la matrice **U** (de forme diagonale supérieure) et correspondent aux flux qui ne sont pas définis de manière unique par **U**. Supposons par exemple que **U** contienne les trois premières lignes suivantes, définies par leurs éléments non nuls : $U_{(1,1)}=1$; $U_{(2,1)}=1$; $U_{(2,10)}=-5$ et $U_{(3,1)}=1$. Ceci conduit aux relations suivantes en application de l'équation $\mathbf{U} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{r}$:

$$\left\{ \begin{array}{l} 1 \cdot x_{(1)} = \sum_i P_{(1,i)} \cdot r_{(i)} \\ 1 \cdot x_{(2)} - 5 \cdot x_{(10)} = \sum_i P_{(2,i)} \cdot r_{(i)} \\ 1 \cdot x_{(3)} = \sum_i P_{(3,i)} \cdot r_{(i)} \end{array} \right.$$

Les flux $x_{(1)}$ et $x_{(3)}$ sont définis de manière unique par les mesures, mais pas les flux $x_{(2)}$ et $x_{(10)}$. Ces deux derniers flux constituent un groupe singulier. Il y aura autant de groupes singuliers que de colonnes dépendantes dans la matrice **A**, soit $(n-m+l)$. Un groupe singulier peut impliquer deux réactions comme dans l'exemple, mais la plupart en compte beaucoup plus. Dans tous les cas, ces groupes singuliers ne peuvent être éliminés qu'en modifiant les fichiers de départ (*.BIO et *.CMP) ou bien directement la matrice **A**.

I.8.3.3. Décomposition en valeurs singulières

L'intérêt de cette procédure n'est pas très clair. Elle sert à calculer le "nombre conditionnel" de la matrice **A** à partir de ses valeurs singulières minimale et maximale. Ce paramètre est utilisé par les auteurs pour évaluer la "sensibilité" du réseau biochimique étudié. S'il est inférieur à 100, le réseau est jugé stable, s'il est supérieur à 1000, le risque de problèmes lors des calculs est très élevé.

Les valeurs singulières intermédiaires, de même que les vecteurs singuliers de la matrice A peuvent aussi être calculés, mais leur intérêt n'est pas présenté par les auteurs.

I.8.3.4. Analyse de sensibilité

Toujours sous le menu 3, les dérivées partielles $\frac{\partial x}{\partial r}$ et $\frac{\partial x}{\partial a_{(i,j)}}$ de la solution du BRNE (vecteur x) peuvent être calculées. Elles sont immédiatement stockées dans deux fichiers (*.DXR et *.DXA). Ces calculs permettent de déterminer l'influence respective des mesures et de la stœchiométrie sur le vecteur des flux. Ceci pourra contribuer à localiser la source d'une incohérence dans le résultat du calcul des flux.

I.8.4. Vecteur de mesures et résolution du BRNE

Ces instructions sont regroupées sous le menu 4 et effectuent principalement trois opérations :

- construction du vecteur de mesures (vecteur r, *.r), c'est à dire des vitesses de production des métabolites,
- vérification de la consistance des mesures,
- résolution du BRNE, c'est à dire calcul des flux.

I.8.4.1. Construction du vecteur de mesures (vecteur r)

Le vecteur r contient les vitesses de production (en mmol.l⁻¹.h⁻¹) de chaque métabolite du réseau. Il contient "mr" éléments, avec mr = m, se subdivisant en deux catégories : les métabolites intracellulaires dont les vitesses d'accumulation sont nulles (hypothèse de l'état pseudo-stationnaire) et les métabolites extracellulaires dont les vitesses de production sont données par les mesures expérimentales. Le vecteur r peut être lu à partir d'un fichier de données ou construit élément par élément comme décrit précédemment.

I.8.4.2. Analyse des mesures

Cette procédure a pour but de tester le vecteur r pour sa consistance, c'est à dire pour l'absence d'erreur de mesure. Le principe est un traitement statistique des données afin de calculer un indice de consistance correspondant à la valeur d'une fonction mathématique h (Wang et Stephanopoulos, 1983)

Soit δ le vecteur des erreurs estimées sur chaque mesure du vecteur r. On peut donc écrire la relation suivante

$$\bar{r} = r + \delta \quad [I.18]$$

avec \bar{r} le vecteur des mesures vraies et r le vecteur des mesures réalisées dans l'expérience. La présence de ces erreurs entraîne des erreurs de chute dans les équations de bilan. Ces erreurs sont définies par une matrice ε , telle que $\varepsilon = A \cdot \delta$. On peut alors définir une fonction qui permettra de dire si ε diffère significativement de sa distribution normale, c'est à dire si une (ou plusieurs) mesure entraîne une variation supérieure à celle prévue par δ . Cette fonction est définie par : $h = \varepsilon^T \cdot \phi^{-1} \cdot \varepsilon$, avec ϕ la matrice de variance-covariance de ε sans erreur de mesure. Les auteurs ont montré que la fonction h pouvait être caractérisée par une distribution de χ^2 ayant m degré de liberté. Ainsi, la valeur théorique de h pour un seuil de confiance θ sera donnée par la loi du χ^2 pour m degré de liberté et ce seuil θ .

Si la valeur calculée de h est inférieure à la valeur du χ^2 , le vecteur de mesures r sera dit consistant et utilisé pour le calcul des flux. Dans le cas contraire, le vecteur r contient une (ou plusieurs) mesure erronée et ne pourra pas être utilisé sans correction.

Dans ce second cas, on peut avoir recours à une procédure itérative de déletion des mesures, d'abord une par une, puis deux par deux et jusqu'à $(l-1)$ mesures éliminées simultanément. Pour chaque déléctions, les valeurs de h et du χ^2 sont calculées et comparées. Les combinaisons qui permettent de lever l'inconsistance du vecteur de mesures sont enregistrées et pourront être examinées ultérieurement. La procédure itérative peut être stoppée à tout moment par l'utilisateur, dès qu'une combinaison "consistante" a été détectée par exemple. La recherche d'une erreur peut aussi se faire manuellement. L'utilisateur choisit la ou les déléctions avant d'exécuter le test de consistance.

Remarque : La procédure originale présentée par Wang et Stephanopoulos comporte des hypothèses qui ne sont pas rapportées ici. Se reporter au texte original pour plus de détails.

I.8.4.3. Modification du vecteur de mesures

Suite à ces différentes procédures, il est possible de modifier le vecteur r pour le rendre "consistant". Ceci s'effectue grâce à la relation $Z \cdot \hat{r} = 0$ où \hat{r} représente le nouveau vecteur de mesure qui satisfait exactement les contraintes et intègre les modifications proposées par l'analyse de consistance.

I.8.4.4. Résolution du BRNE

Deux équations sont utilisées suivant qu'il y a ou non des contraintes à respecter :

- lorsqu'il n'y a pas de contrainte, la solution est une solution approchée par régression des moindres carrés qui s'écrit $\hat{x} = (A^T \cdot A)^{-1} \cdot A^T \cdot r$ (ou \hat{r}).

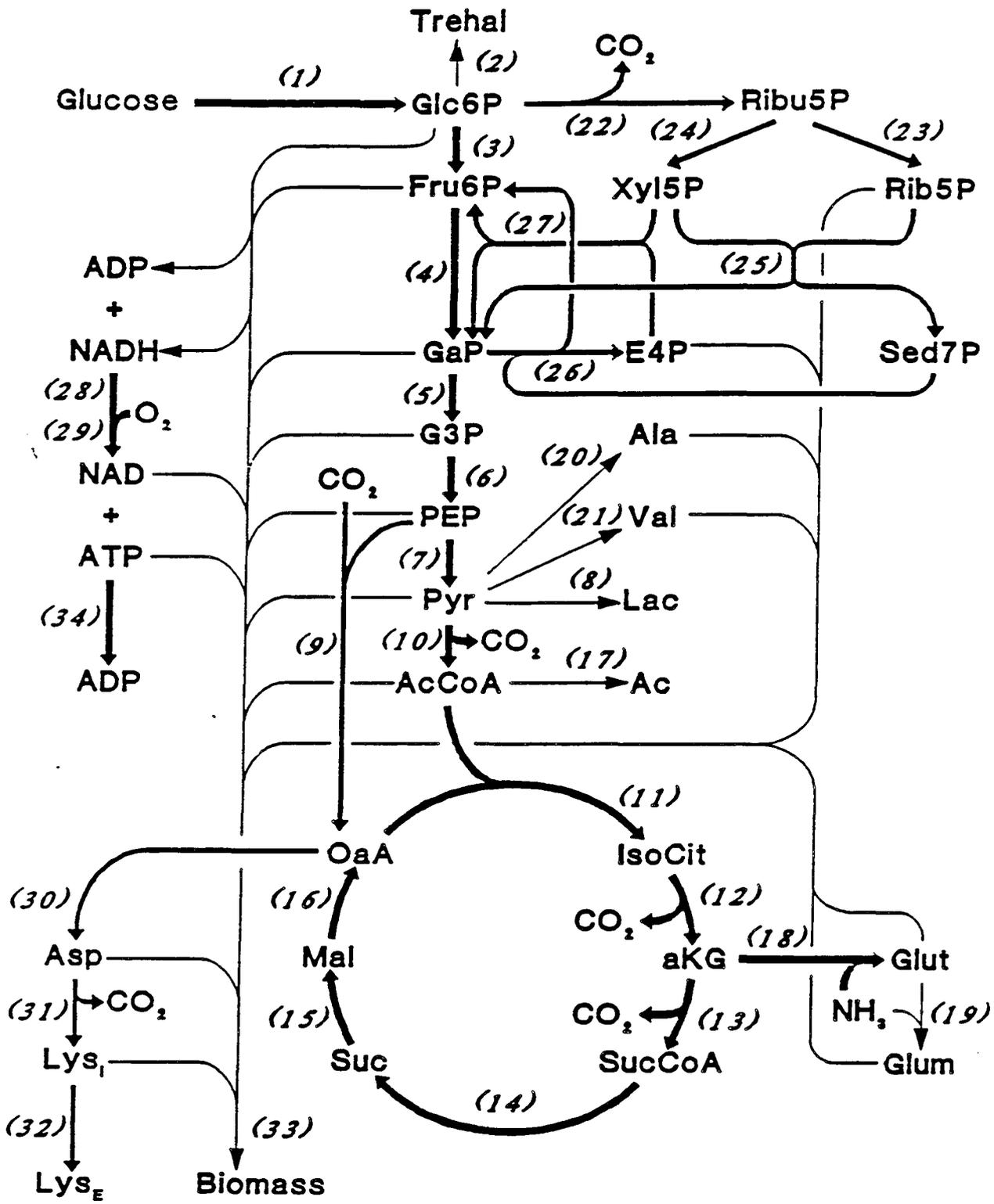


Figure I.33 : Présentation du réseau biochimique utilisé dans Bionet pour le catabolisme du glucose chez les Corynebactéries.

- en présence de contraintes, c'est également une solution approchée qui est utilisée ; il s'agit de la minimisation de l'expression $(A.x-r)^T(A.x-r)$ avec $C.x \geq b$. La solution s'écrit $\hat{x} = (A^T.A)^{-1}.A^T.r + (A^T.A)^{-1}.C^T.w$ (ou \hat{r}) avec w un vecteur de calcul défini numériquement (Liew, 1976).

I.8.4.5. Exemple de réseaux biochimiques

Vallino et Stephanopoulos ont utilisé Bionet pour étudier - entre autres - la distribution des flux carbonés lors de la production de lysine par *Corynebacterium glutamicum*. Un réseau biochimique de 34 réactions comprenant 37 métabolites a été construit pour le catabolisme du glucose, dont le schéma est présenté sur la figure I.33. Ce réseau a ensuite été adapté au métabolisme du gluconate pour visualiser l'influence de la source de carbone sur la répartition des flux et pour tenter de localiser les étranglements métaboliques. Un exemple d'évaluation des flux sur gluconate est donné sur la figure I.34.

Résumé - conclusion :

Le calcul des flux à l'aide de Bionet passe par plusieurs étapes :

- construction du BRNE à partir du fichier des réactions et du fichier des composés,
- test du BRNE pour détecter d'éventuelles singularités et/ou redondances,
- construction et test du vecteur de mesures expérimentales,
- calcul des flux.

Bionet est un programme complet dont la méthode de calcul matriciel autorise - mais aussi impose - des vérifications et des développements mathématiques. Les sources d'incertitudes sont le réseau biochimique en lui-même, les regroupements effectués pour lever les singularités, l'hypothèse de l'état pseudo-stationnaire et les mesures expérimentales.

Ce logiciel ne présente a priori pas d'autres limites que celles de la construction du réseau biochimique. L'utilisation du logiciel est extrêmement simple puisque chaque étape est guidée par les menus, et les expressions mathématiques (qui peuvent effrayer l'utilisateur non averti en algèbre linéaire) sont totalement transparentes pour l'utilisateur. Mais il est impératif de maîtriser le concept du calcul des flux pour comprendre la signification des instructions proposées et le sens réel des résultats obtenus. Enfin, Bionet est avant tout un logiciel d'estimations de flux avec ses hypothèses, et même si les résultats sont tout à fait fondés mathématiquement, cela ne signifie pas qu'ils représentent la réalité physiologique.

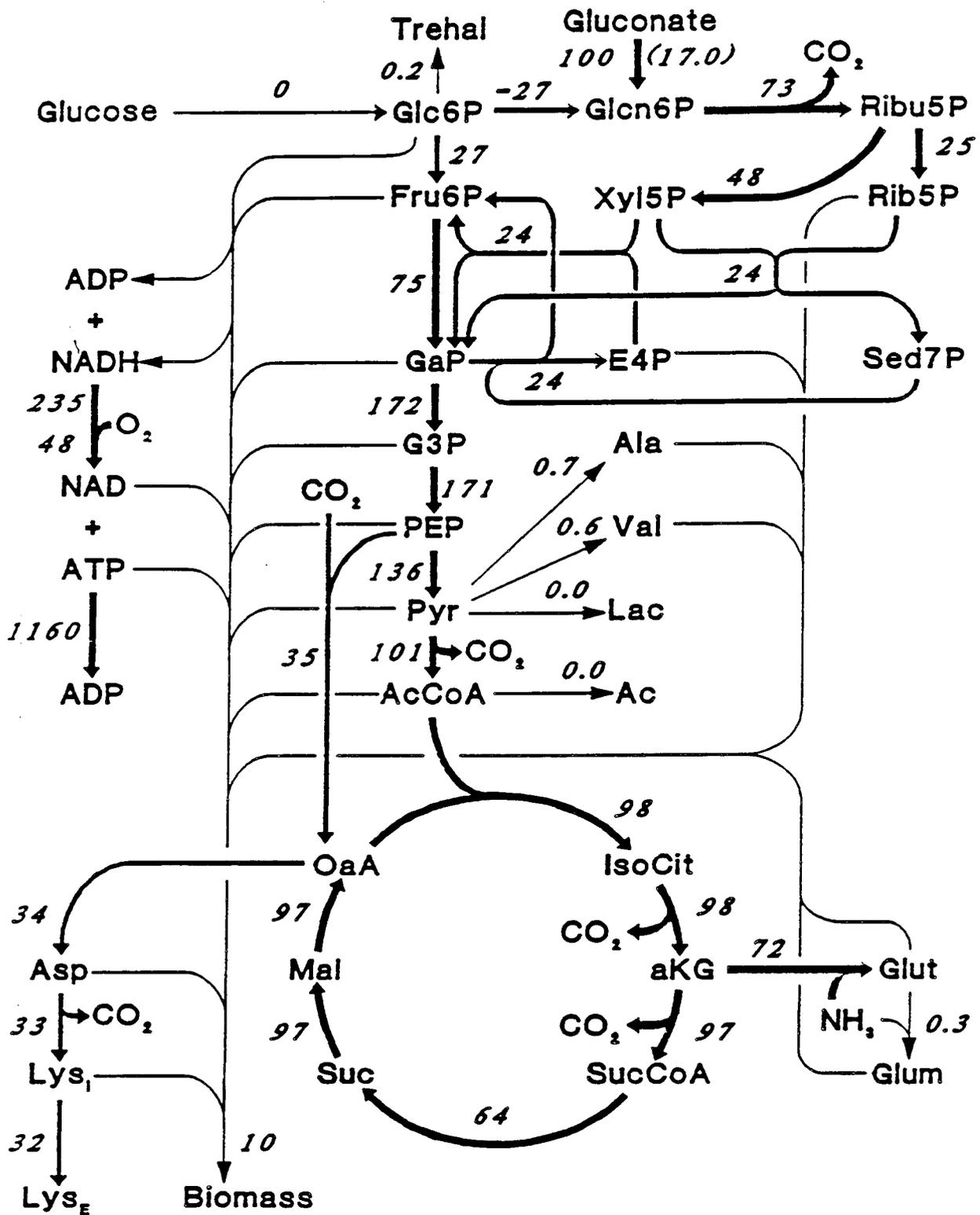


Figure I.34 : Exemple d'évaluation des flux par Bionet pour le catabolisme du gluconate chez les Corynebactéries (en phase de production de lysine).

Chapitre 2

*Matériel
et Méthodes*

SOMMAIRE du CHAPITRE II

Matériel	69
Fermentation	69
Informatique	69
Généralités (stérilisation)	69
Souche bactérienne	70
Milieux de culture	71
Notion d'Osmolarité des solutions aqueuses	72
Cultures bactériennes	73
Fioles d'Erlenmeyer.....	73
Réacteur de 2 litres en discontinu.....	73
Réacteur de 20 litres	74
Analyses extracellulaires	76
Biomasse	76
Glucose.....	77
Tréhalose	79
Acides aminés par CLHP.....	80
Glutamate par kit enzymatique	81
Acides organiques, sucres et alcools par CLHP.....	81
Acides aminés (autres que glutamate) en culture semi-continue	82
Analyses intracellulaires	83
Extraction des métabolites intracellulaires	83
Exploitation des données expérimentales	84
Lissage, interpolation, dérivée et intégration.....	84
Vitesses et rendements en culture discontinue	84
Analyses des gaz	85
Recouvrement carboné.....	86
Métabolites intracellulaires	87
Vitesses et rendements en culture semi-continue	88

Matériel**□ Fermentation (voir aussi les fiches des cultures bactériennes) :**

- Réacteur de 20 litres : Biolafitte, France. Equipé de régulations d'agitation, d'aération, de température, de pH (Sonde Ingold, France).
- Réacteur de 2 litres : Setric Génie Industriel, France. Equipé de régulations d'agitation, d'aération, de température, de pH (Sonde Ingold, France).
- Analyseur de CO₂ : Binos 100, Leybold SA, distribué par Rosemount, France. Mesure basée sur l'absorption du rayonnement infra-rouge.
- Sécheur de gaz : Leybold SA, distribué par Rosemount, France. Condensation de la vapeur d'eau par effet Pelletier.
- Centrifugeuse Jouan MR 14-11.
- Chaînes d'analyses CLHP Hewlett Packard 1090 (acides aminés) et Millipore Waters 712 (acides organiques, sucres et alcools).

□ Informatique :

- Microordinateur Apple Macintosh.
- Microordinateur PC Compaq Deskpro, 380/20e, équipé d'un coprocesseur mathématique.
- Station de travail Hewlett Packard série 700 (système d'exploitation Unix).
- Logiciel de graphisme et de traitement des données : Kaleidagraph pour Macintosh, Abelbeck Software.
- Programme "solve" (langage C pour système Unix), développé au laboratoire par A. Lourenço pour la résolution d'équations différentielles et la simulation de modèle (basé sur la méthode "Runge Kutta").
- Bibliothèque de calcul matriciel (langage C pour système Unix), développée au laboratoire par F. Pelletier.
- Logiciel Bionet d'évaluation des flux métaboliques, pour PC, développé par Vallino et Stephanopoulos, Département d'Ingénierie Chimique, MIT, Boston, Etats Unis.

Généralités**□ Stérilisation :**

- par autoclavage : 20 minutes à 121°C en chaleur humide.
- par filtration sur membranes (diamètre des pores 0,22 µm) pour les solutions non autoclavables.

Souche bactérienne

Corynebacterium glutamicum (ou *melassecola*) (ATCC 17965)

(fournie par la société ORSAN)

□ Caractéristiques :

- bactérie à Gram positif, non sporulante et non mobile
- bacille court, droit ou légèrement incurvé, isolé ou par paire
- taille : de 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm
- colonie jaune pâle à jaune orangée, régulière et lisse sur gélose
- anaérobie facultative
- auxotrophe pour la biotine
- 55 à 57,7% de G+C
- température optimale de croissance : 25 à 37°C (34°C en BMCG liquide)
- pH optimal de croissance : 7,3 à 7,4

- sucres métabolisables : saccharose, glucose, fructose, maltose, trehalose, mannose
- sucres non métabolisables : rhamnose, galactose, raffinose, arabinose, lactose, xylose, dextrine, salicine, amidon
- Uréase⁺, Gélatinase⁻, Caséinase⁻, Nitrates Réductase⁺, Esculine⁻, Hippurate⁺

□ Conservation :

○ "glycérol stock"

- croissance de la souche en milieu liquide BMCG
- mélange 1:1 (en volume) de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance avec du glycérol (20% minimum)
- répartition en tubes eppendorf (1 ml)
- congélation à -20°C.

○ boîte de Pétri

- 400 ml de milieu BHI (milieu complet)
- stérilisation par autoclavage
- répartition dans les boîtes de Pétri stérilement (20 boîtes environ)
- étalement des bactéries :
 - > 100 à 200 µl à partir d'une culture en milieu liquide
 - > technique d'épuisement en stries à partir de colonies.
- incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures

Milieux de culture□ **Milieu BHI (bouillon cœur-cervelle) gélosé :**

- extrait cœur-cervelle (Biokar Solabia)	17,5g/l
- peptone pancréatique de gélatine (“)	10 g/l
- NaCl (Fluka)	2,5 g/l
- glucose (Labosi)	2 g/l

stérilisation par autoclavage.

□ **Milieu BMCG (Basal Medium for Corynebacteria Growth) :**

(d'après Liebl *et al*, 1989)

○ Solution A (BMCG base) pour 1 litre :

(NH ₄) ₂ SO ₄	(Fluka)	7 g
Na ₂ HPO ₄	(Labosi)	6 g
KH ₂ PO ₄	(Fluka)	6 g
NaCl	(Fluka)	0,5 g
NH ₄ Cl	(Fluka)	1 g

○ Solution B (BMCG sels) pour 1 litre :

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	(Fluka)	80 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	(Fluka)	4 g
MnSO ₄ , H ₂ O	(Merck)	0,4 g
NaCl	(Fluka)	5 g

○ Solution C (BMCG traces) pour 1 litre :

Na ₂ B ₄ O ₇ , 10 H ₂ O	(Prolabo)	88 mg	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	(Merck)	40 mg	
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	(Fluka)	10 mg	
CuSO ₄ anhydre	(Merck)	172 mg	(ou 270 mg CuSO ₄ , 5 H ₂ O)
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	(Fluka)	7,2 mg	
FeCl ₃ anhydre	(Merck)	522 mg	(ou 870 mg FeCl ₃ , 6 H ₂ O)

○ Solution D (BMCG vitamines) pour 1 litre :

Biotine	(Serva)	30 mg
Thiamine	(Sigma)	2 g
Acide Nicotinique	(Sigma)	3 g
Acide Panthoténique	(Sigma)	3 g
Choline HCl	(Sigma)	3 g
Myo Inositol	(Sigma)	3 g
Déféroxamine		3 g (Desferal™, Ciba Geigy)

○ Solution E : CaCl₂ (Prolabo) 1M

○ Solution de glucose à 500 g/l.

○ les solutions sont stérilisées séparément : A, B, C et le glucose par autoclavage, D et E par filtration.

○ solution de **supplément BMCG** : 500 ml B + 200 ml C + 100 ml D + 5 ml E.

○ milieu pour **préculture** : 60 ml A + 0,5 ml supplément + 1,5 ml glucose (12 g/l final).

○ milieu pour **fermenteur** : 1 litre A + 8 ml supplément + 40 ml glucose (19 g/l final).

Milieux de culture**□ Milieu BMM (Basal Medium Modifié) :** (d'après Debay, thèse en cours)*milieu servant à la production de glutamate en culture semi-continue*

○ Solution A (BMM base) pour 1 litre :

(NH ₄) ₂ SO ₄	(Fluka)	10,67 g
Na ₂ HPO ₄	(Labosi)	16 g
KH ₂ PO ₄	(Fluka)	8 g
NaCl	(Fluka)	2,67 g
K ₂ SO ₄	(Labosi)	12,67 g

○ Solution D (BMM vitamines) pour 1 litre :

Biotine	(Serva)	1,57 g
Thiamine	(Sigma)	10,6 g
Acide Nicotinique	(Sigma)	3 g
Acide Panthoténique	(Sigma)	3 g
Choline HCl	(Sigma)	3 g
Déféroxamine		3 g (Desferal™, Ciba Geigy)

○ Les solutions B, C, E et glucose sont identiques à celle du BMCG.

○ Solution de bétaïne-HCl (Sigma) 520 g/l à autoclaver.

○ Tween 40 (Prolabo) 2,5 g/l à autoclaver.

○ solution de **supplément BMM** pour 1 litre de milieu de culture :

8,2 ml B + 7,25 ml C + 1,63 ml D + 1,8 ml E.

○ milieu pour **fermenteur** :

600 ml A + supplément BMM + 30 ml bétaïne + 100 ml glucose (62,5 g/l final).

Notion d'Osmolarité des solutions aqueuses**□ Définition :**

Il s'agit de la pression induite par la dissolution de molécules dans un solvant. L'osmolarité s'exprime en osmole par litre de solvant, l'osmolalité en osmole par kg de solvant (Osm). Dans le cas particulier de l'eau, les deux notions sont équivalentes. Une solution aqueuse d'un 1 Osm correspond à une augmentation de pression osmotique de 1700 mm de mercure, soit 2,24 atm ou encore $2,27 \cdot 10^5$ Pa (N/m²) par rapport à l'eau pure (valable pour un soluté non-ionique).

□ Mesure :

Elle est réalisée grâce à un micro-osmomètre (Roebing) et repose sur la mesure du point de congélation des solutions aqueuses. En effet, une osmolalité de 1 Osm provoque un abaissement du point de congélation de 1,858°C (congélation de l'eau pure à 0°C).

Cultures bactériennes

- **Fiole d'Erlenmeyer :** (préculture pour fermenteur)
 - 60 ml de milieu BMCG ensemencés à partir d'une colonie prélevée sur boîte de Pétri.
 - 12 h à 34°C à 170-200 rpm (agitateur rotatif INFORS AG, Suisse)
- **Culture discontinue en réacteur de 2 litres :**
 - paramètres physico-chimiques :
 - **réacteur** Sétric Génie Industriel, volume total 2 litres.
 - **agitation** par turbine de type Rushton, entraînée magnétiquement par le socle à une vitesse de 900 à 1000 rpm.
 - **aération** par air comprimé stérilisé par un filtre 0,22 µm placé à l'entrée. Injection dans le fermenteur par un diffuseur (sparger), à un débit de 0,7 vvm.
 - **pourcentage d'oxygène dissous** : lecture par une sonde à membrane dont l'étalonnage est réalisé après stérilisation et dans les conditions de culture avec de l'azote pour le 0% et avec l'air comprimé pour le 100%.
 - **température** : contrôle par une sonde de température ; chauffage par une résistance chauffante ; refroidissement par circulation d'eau froide dans un circuit en doigt de gant.
 - **pH** : lecture par une sonde à pH stérilisable (Ingold) étalonnée avant stérilisation avec des solutions standards pH 7 et pH 4 (Bioblock) ; régulation par un système PID couplé à des pompes péristaltiques pour l'ajout de NaOH 4N et HCl 4 N.
 - mise en œuvre pour culture discontinue :
 - stérilisation par autoclavage du réacteur contenant 1 litre de solution BMCG base et muni de toutes les sondes.
 - mise en conditions de fermentation (agitation, aération, pH et température)
 - ajout stérilement de la solution de supplément et du glucose
 - étalonnage de la sonde à oxygène dissous
 - ensemencement à partir d'une préculture en fiole d'Erlenmeyer en phase exponentielle de croissance (volume de l'inoculum : environ 5% en volume)
 - régulations : température 34°C, agitation 900 rpm, aération 0,7 vvm, pH 7,3.
 - mise en œuvre des stress osmotiques :
 - après 2 à 3 heures de culture, ajout stérilement d'une solution de NaCl (préalablement stérilisée par autoclavage) de concentration adaptée au choc hyperosmotique désiré. On minimisera le volume de l'ajout pour limiter le facteur de dilution.

Cultures bactériennes

□ Culture en réacteur de 20 litres :

○ paramètres physico-chimiques :

- **réacteur** Biolafitte, volume total 20 litres.
- **agitation** par turbine de type Rushton, entraînée magnétiquement par le socle.
- **aération** par air comprimé stérilisé par un filtre placé à l'entrée. Injection dans le fermenteur par plusieurs diffuseurs (sparger).
- **pourcentage d'oxygène dissous** : lecture par une sonde à membrane dont l'étalonnage est réalisé après stérilisation et dans les conditions de culture avec de l'azote pour le 0% et avec l'air comprimé pour le 100%.
- **température** : contrôle par une sonde de température ; chauffage par une résistance chauffante ; refroidissement par circulation d'eau froide dans un circuit en doigt de gant.
- **pH** : lecture par une sonde à pH stérilisable (Ingold) étalonnée avant stérilisation avec des solutions standards pH 7 et pH 4 (Bioblock) ; régulation par un système PID couplé à des pompes péristaltiques.

○ mise en œuvre de culture discontinue :

- stérilisation à la vapeur du réacteur contenant la solution BMCG base
- ajout du glucose et de la solution de supplément
- mise en place de la régulation du pH, de la température, de l'aération et de l'agitation.
- étalonnage de la sonde à oxygène dissous
- ensemencement du réacteur avec une préculture en fiole d'erlenmeyer (milieu BMCG) en phase de croissance (volume de l'inoculum : environ 5%)
- conditions de culture : 34°C, agitation 500 à 600 rpm, pH 7,3 avec NaOH 4N et HCl 4 N, aération 0,7 à 1 vvm.

○ mise en œuvre des stress osmotiques :

- procédure identique à celle d'une culture en réacteur de 2 litres.

○ mise en œuvre de culture semi-continue :

- stérilisation à la vapeur du réacteur contenant la solution BMM base (6 litres)
- ajout du glucose, de la bétaine et de la solution de supplément BMM
- mise en place de la régulation du pH, de la température, de l'aération et de l'agitation.
- étalonnage de la sonde à oxygène dissous
- ensemencement du réacteur avec une préculture en fiole d'erlenmeyer (milieu BMCG) en phase de croissance (volume de l'inoculum : environ 5%)
- conditions de culture : 34°C, agitation 500 à 600 rpm, pH 7,3 avec ammoniacque à 28% et HCl 4N, aération 0,7 à 1 vvm
- ajout du Tween 40 à une DO de 17 et augmentation de la température à 38°C
- mise en place de l'alimentation en glucose (solution à 720 g/l, autoclavée) une heure après l'ajout du Tween 40. Le débit initial de 100 ml/h est modifié en cours de culture de façon à maintenir une concentration résiduelle en glucose inférieure à 5 g/l.

Analyses extracellulaires**□ Dosage de la biomasse :**

○ poids sec :

- centrifuger à 4°C 25 ml de moût de fermentation de densité optique connue,
- resuspendre le culot bactérien pour lavage dans 25 ml d'une solution NaCl isotonique,
- centrifuger à 4 °C,
- resuspendre le culot dans 25 ml d'eau distillée,
- mettre la suspension bactérienne dans une coupelle d'aluminium (préalablement séchée à l'étuve à 110°C pendant 48 h puis pesée précisément (balance Mettler)),
- placer la coupelle de suspension bactérienne 48 h à l'étuve à 110°C
- peser précisément.

La différence de masse permet de calculer la concentration cellulaire en biomasse sèche par litre de moût de fermentation.

Correction : Un biais dans la mesure du poids sec est introduit par le sel contenu dans la solution de lavage isotonique et qui se retrouve dans le volume interstitiel du culot bactérien. une correction est donc nécessaire, donnée par :

$$MSC = MS - \left(\frac{V_{\text{int}} \cdot [\text{NaCl}]}{1000} \right)$$

avec : MSC : Masse Sèche Corrigée (g), MS : Masse Sèche mesurée (g), V_{int} : Volume interstitiel (ml), [NaCl] : concentration en NaCl de la solution de lavage (g/l)

(Dans nos dosages, le volume interstitiel a été estimé à $2,4 \pm 0,2$ ml/gMS (Guillouet, 1996))

○ par densité optique (DO) :

- la mesure de la densité optique est réalisée à 570 nm avec un spectromètre Novaspec II LKB.
- une relation entre la DO et le poids sec est réalisée pour obtenir le coefficient de conversion DO/poids sec cellulaire.

Analyses extracellulaires

□ Dosage du glucose : (réaction de Miller)

○ principe :

En milieu basique, l'acide 3,5-dinitrosalicylique réagit avec tous les sucres réducteurs pour former une coloration jaune-orangée. Concernant le glucose, cette coloration est proportionnelle à la concentration entre 0 et 1 g/l. L'erreur commise par cette méthode est évaluée à 10%.

○ réactifs :

- 10 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 2 g de phénol
- 0,5 g de sulfite de sodium
- Dissoudre dans 0,5 litre de NaOH 2%
- Ajouter 200 g de tartrate de sodium et potassium
- Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

(Conservation 3 mois environ à l'abri de la lumière)

○ protocole :

- réaliser une gamme étalon de glucose de 0 à 1 g/l,
- placer dans un tube eppendorf 300 µl de réactif et 200 µl d'échantillon (surnageant ou filtrat de moût de fermentation et/ou gamme étalon),
- mettre 15 minutes à 100°C, (coloration stable 1 heure environ)
- Déposer 150 µl de chaque mélange dans une microplaque de titration,
- lire la DO à 640 nm (Spectrophotomètre Multiskan MCC/340 à 640 nm)

Analyses extracellulaires

□ Dosage du glucose :

○ principe : (kit enzymatique Sigma 510-A)

Le dosage repose sur une double réaction enzymatique : le glucose est tout d'abord oxydé par la glucose oxydase en acide gluconique avec production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier permet ensuite la transformation grâce à une peroxydase de l'O-Dianisidine, incolore, en sa forme oxydée de couleur rose-marron. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité initiale de glucose.

○ réactifs :

- capsule de glucose oxydase et de peroxydase
- solution de o-dianisidine dihydrochloride (colorant)
- solution standard de glucose
- solution d'hydroxyde de barium 0,3 N
- solution de sulfate de zinc 0,3 N

○ protocole adapté pour dosage en microplaque de titration :

- réaliser une gamme étalon de glucose allant de 0 à 0,4 g/l
- dissoudre 1 capsule d'enzymes dans 48,4 ml d'eau distillée au lieu de 100 ml.
- ajouter 1,6 ml de la solution de colorant à la solution d'enzymes (conservation 2 jours à 2-8°C).
- mettre 25 μ l d'échantillon et 250 μ l de solution "colorant+enzymes" par puits de la microplaque
- incuber 30 minutes à 37°C
- lire la DO à 450 nm (Spectrophotomètre Multiscan MCC/340 à 640 nm).

Analyses extracellulaires

□ Dosage du tréhalose :

○ principe :

La méthode utilisée a été développée par Wojcik (1992). En présence de tréhalase, le tréhalose est clivé en 2 molécules de glucose. Ce dernier est ensuite dosé par méthode enzymatique (kit Sigma 510-A).

○ réactifs :

- tampon phosphate de sodium à 0,2 M, pH 5,7
- solution de tréhalase de rein de porc (Sigma T-8778) à $3 \cdot 10^{-3}$ U/ μ l
- kit enzymatique de dosage du glucose (Sigma 510-A).

○ protocole :

- réaliser une gamme étalon de tréhalose de 0 à 0,5 g/l,
- préparer 2 tubes pour chaque échantillon : un pour le tréhalose, l'autre pour le glucose contaminant.
- mettre 12,5 μ l d'échantillon et 57,5 μ l de tampon dans un eppendorf pour doser le glucose contaminant
- mettre 12,5 μ l d'échantillon, 37,5 μ l de tampon et 20 μ l de tréhalase dans un eppendorf pour doser le tréhalose
- placer les tubes à 37°C pendant 1 heure pour la réaction enzymatique
- placer les tubes à 100°C pendant 15 minutes pour arrêter la réaction
- doser le glucose avec le kit enzymatique
- lire la DO à 450 nm (Spectrophotomètre Multiskan MCC/340 à 640 nm)

Analyses extracellulaires**□ Dosage des acides aminés par CLHP :**

○ principe :

Ce dosage est réalisé par CLHP (Hewlett Packard 1090) avec une colonne phase inverse . Les acides aminés subissent une dérivatisation sur une pré-colonne par l'orthophtaldialdéhyde (OPA) et le 9-fluorenylméthylchloroformate (FMOC) pour permettre leur détection en spectrophotométrie UV (Godel et coll., 1992). Les acides aminés primaires réagissent avec l'OPA et sont détectés à 338 nm ; les acides aminés secondaires réagissent avec le FMOC et sont détectés à 262 nm.

○ méthode :

- 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 à 40°C

- phase mobile A : Acétate de sodium 20 mM
Triéthylamine 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 de sodium 100 mM
(ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide acétique dilué)
Méthanol 40% (v/v)
Acétonitrile 40% (v/v)

- dérivatisation : réalisée directement dans la seringue de l'injecteur automatique avec

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

- mélange par mouvements piston de la seringue, rinçage de l'aiguille entre chaque prélèvement.

- élution :

par un gradient linéaire d'éluant avec un débit de 0,45 ml/min. Passage de 100% de A à un mélange contenant 40% de A et 60% de B en 16 minutes, puis à 100% de B en 1 minute.

- détection :

jusqu'à 16 minutes, détection à 338 nm (longueur d'onde de référence 390 nm) pour les acides aminés primaires, puis détection à 262 nm (longueur d'onde de référence 324 nm) pour les acides aminés secondaires.

- Durée totale d'une analyse : 35 minutes.

Analyses extracellulaires

□ Dosage du glutamate par kit enzymatique :

○ principe : (kit Boehringer)

En présence de NAD et de glutamate déshydrogénase, le L-glutamate est désaminé en α -cétoglutarate, avec production de NADH. Ce dernier permet la réduction enzymatique (grâce à la diaphorase) du chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) en un formazan de couleur rose. La coloration est proportionnelle à la quantité de formazan et donc à la quantité initiale de glutamate. La précision du dosage est estimée à 5%.

○ réactifs : (composition du kit)

- tampon phosphate de potassium - triéthanolamine, pH 8,6
- solution de diaphorase de coeur de porc (1,6 U/ml) et de NAD (11,2 g/l)
- solution de chlorure d'iodonitrotétrazolium
- solution de glutamate déshydrogénase (900 U/ml)
- solution étalon de L-glutamate (0,071 g/l)

Analyses extracellulaires

□ Dosage des acides organiques, des sucres et alcools par CLHP :

○ principe :

Ce dosage est réalisé par CLHP (Millipore Waters 712) par chromatographie ionique. La séparation des molécules repose en fait essentiellement sur un mécanisme d'exclusion ionique. L'utilisation de deux détecteurs (absorption UV et réfractométrie IR) permet une meilleure détection des acides organiques par l'UV et des sucres et alcools par l'IR puisque ces derniers présentent une faible absorption en UV.

○ méthode :

- précolonne
colonne Brownlee Polypore H placée dans un four thermostaté à 65°C
- injection : 25 μ l d'échantillon filtré sur membrane 0,22 μ m.
- élution : par un débit fixe de 0,6 ml/min d'une solution d'acide sulfurique 0,02 M.
- détection : jusqu'à 15 minutes, détection à 210 nm en UV et par réfractométrie différentielle en IR.

- Durée totale d'une analyse : 18 minutes.

Analyses extracellulaires

□ **Dosage des acides aminés extracellulaires autres que le glutamate en procédé semi-continu :**

Le glutamate est produit en très forte quantité dans le procédé semi-continu. Son dosage par le kit enzymatique ne pose pas d'autres problèmes que celui du choix des bonnes dilutions. Normalement réalisé par CLHP, le dosage des autres acides aminés présente plus de difficultés puisque la forte proportion de glutamate risque d'encrasser voire de colmater rapidement pré-colonne et colonne, ou de perturber le dosage en masquant les autres acides aminés. Il est donc préférable de chercher à l'éliminer du milieu avant le dosage par CLHP.

○ principe :

Dans certaines conditions, le glutamate est une molécule chargée qui pourra donc être retenue sur une colonne échangeuse d'ions, alors que les autres acides aminés (et en particulier la proline) ne le seront pas.

○ méthode :

- résine : Amberlite IRA-400 (Sigma). Echangeur cationique fort (échange des anions), livrée sous forme chlorure.

- colonne : cône bleu de Pipettman P1000, contenant 0,5 g de résine.

- lavage et activation de la résine par 5 volumes d'acétate de sodium 0,5 M pH=5,8.

- dépôt : 100 µl de surnageant de moût de fermentation.

- élution : (récolte de fraction de 1 ml)

1) H₂O pH=5,5 avec HCl.

2) HCl 1 M

- résultats : 100 µl d'une solution standard contenant 50 g/l de glutamate (concentration observée en fin de fermentation semi-continue) et 10 g/l de proline, sont déposés sur la colonne. Toute la proline, non retenue sur la résine, est récoltée dans la première fraction d'élution 1), avec quelques traces de glutamate (mise en évidence par réaction à la Ninhydrine sur papier Wattman). Le glutamate est "décroché" de la résine par l'élution 2), en 3 fractions minimum.

- rendements : les dosages effectués par CLHP mettent en évidence une récupération de 100% de la proline dans la première fraction d'élution 1), contaminée par seulement 3% du glutamate. Ce protocole permet donc l'élimination de 97% du glutamate, ce qui rend alors possible le dosage par CLHP des autres acides aminés.

Extraction des métabolites intracellulaires

(d'après Guillouet, 1996)

○ principe :

Il s'agit de prélever l'échantillon, d'isoler la biomasse et de collecter le contenu cellulaire. Les deux premières étapes conduisant à la mort cellulaire doivent s'effectuer le plus rapidement possible afin de s'assurer que la bactérie est dans un état physiologique le plus proche possible de celui qu'elle avait dans le réacteur.

○ méthode :

- prélèvement d'un volume de moût donné et de densité optique connue.
- centrifugation à 7000 g à 0°C, une montée et descente.

(ces deux opérations prennent moins de 2 minutes)

- vider le surnageant, essuyer le liquide restant sur les parois avec un papier filtre, sans toucher le culot bactérien.
- resuspendre le culot dans un volume déterminé d'eau distillée glacée et vortexer.
- réaliser 3 cycles de congélation-décongélation pour libérer le contenu cellulaire, puis placer 15 minutes dans un bain marie d'eau bouillante.
- centrifuger 2 minutes à 7000 g à 0°C.
- récupérer le surnageant prêt à l'analyse ou à la congélation (-20°C).

Remarques : > les meilleurs résultats d'extraction sont obtenus pour un rapport biomasse prélevée/volume d'eau de resuspension autour des 5 gMS/l.
> l'erreur commise sur l'extraction des métabolites intracellulaires par cette technique a été estimée inférieure à 15% (extractions puis dosages réalisés sur plusieurs échantillons de moût de fermentation prélevés au même moment).

Analyses intracellulaires

Après leur extraction, les métabolites intracellulaires sont dosés de la même manière que les métabolites :

- tréhalose par kit enzymatique
- acides aminés par CLHP
- acides organiques par CLHP

Exploitation des données expérimentales

□ Lissage, interpolation, dérivée et intégration des données expérimentales :

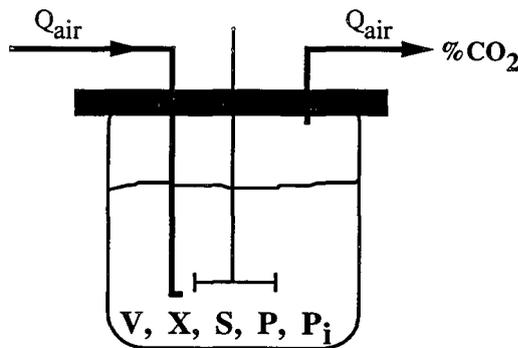
Ces opérations sont réalisées à l'aide du logiciel Kaleidagraph pour Macintosh.

Le **lissage** est effectué par la méthode de la fenêtre glissante, dont la taille est ajustable à la demande. Une fenêtre de 5 points est généralement suffisante pour obtenir de bons résultats. Le principe de cette technique est de rechercher un polynôme de degré variable s'ajustant au mieux aux points de la fenêtre. La valeur des points est alors recalculée grâce à cette fonction polynômiale. L'**interpolation** est également réalisée avec une fonction polynômiale pour créer des points intermédiaires.

La **dérivée** d'une variable (en l'occurrence par rapport au temps) est obtenue par dérivation du polynôme sus-décrit ou par le calcul de la pente du segment de droite entre le point considéré et le point immédiatement supérieur.

L'**intégration** est réalisée par intégration du polynôme sus-décrit ou par la méthode des trapèzes, en prenant les points de la courbe à intégrer 2 par 2.

□ Détermination des vitesses et des rendements en culture discontinue :



V : volume de milieu (l)
 X : concentration en biomasse (g/l)
 S : concentration en substrat (g/l)
 P : concentration en produit extracellulaire (g/l)
 P_i : quantité de produit intracellulaire (µmole/gMS)
 %CO₂ : pourcentage molaire de gaz carbonique
 dans les gaz de sortie du réacteur
 Q_{air} : débit d'aération du réacteur (l/h)

● Calcul des vitesses :

● Les **vitesses instantanées** de croissance, de consommation des substrats ou de production des produits sont calculées à partir des cinétiques en prenant la dérivée de la variable considérée par rapport au temps. Les bilans matière sur la biomasse (X), le substrat (S) et un produit extracellulaire (P) conduisent aux relations suivantes :

$$r''_X = \frac{dX}{dt}$$

$$r''_S = -\frac{dS}{dt}$$

$$r''_P = \frac{dP}{dt}$$

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)

Exploitation des données expérimentales

- La **vitesse spécifique instantanée** relative à chaque variable (X, S, P) est définie comme le rapport entre la vitesse instantanée et la valeur de la concentration en biomasse à l'instant considéré :

$$\mu = \frac{r_X'''}{X} \quad q_S = \frac{r_S'''}{X} \quad q_P = \frac{r_P'''}{X}$$

μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
 q_S : vitesse spécifique de consommation du substrat (g/g.h)
 q_P : vitesse spécifique de production d'un produit extracellulaire (g/g.h)

- Une **vitesse spécifique moyenne de croissance** sur la phase de croissance rapide peut être calculée grâce au logarithme de la concentration en biomasse. Ce calcul suppose une croissance exponentielle pendant cette phase. La formule de calcul est la suivante :

$$\mu_{ln} = \frac{\ln X - \ln X_1}{t - t_1}$$

μ_{ln} : vitesse spécifique de croissance obtenue par calcul logarithmique
 X_1 : concentration en biomasse au temps t_1 , début de la phase de croissance rapide

- La **vitesse instantanée de production de CO₂** est calculée à partir de la mesure du pourcentage molaire de CO₂ dans les gaz de sortie du réacteur, grâce à la relation suivante :

$$r_{CO_2}''' = \frac{44 \cdot Q_{air} \cdot \%CO_2}{100 \cdot V_M \cdot V}$$

r_{CO_2}''' : vitesse de production de gaz carbonique (g/l.h)
 V_M : volume molaire des gaz ($V_M=23$ l/mol à 25°C)

La **vitesse spécifique** et les **coefficients de production** sont donnés par les relations précédentes en considérant le CO₂ comme un produit extracellulaire.

- La **vitesse instantanée de consommation d'O₂** s'obtient grâce à la formule suivante :

$$r_{O_2}''' = \frac{32 \cdot Q_{air} \cdot (21 - \%O_2)}{100 \cdot V_M \cdot V} \quad (g/l.h)$$

- calcul du **quotient respiratoire** :

$$QR = \frac{r_{CO_2}'''}{r_{O_2}'''}$$

QR : quotient respiratoire (mol CO₂/mol O₂)
ATTENTION : r_{CO_2}''' et r_{O_2}''' sont exprimées ici en mol/l.h

Exploitation des données expérimentales

● Calcul des rendements :

- Les rendements et coefficients globaux (ou apparents ou cumulés) sont calculés de la manière suivante : $R_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$ $R_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$ $R_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$

X_0 : concentration en biomasse au temps $t=0$ (g/l)

S_0 : concentration en substrat au temps $t=0$ (g/l)

P_0 : concentration en produit au temps $t=0$ (g/l)

$R_{X/S}$: rendement apparent de croissance (g/g)

$R_{P/S}$: coefficient apparent de production d'un composé extracellulaire par rapport au substrat (g/g)

$R_{P/X}$: coefficient apparent de production d'un composé extracellulaire par rapport à la biomasse (g/g)

- Les rendements et coefficients instantanés sont obtenus de la manière suivante :

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} \quad Y_{P/S} = \frac{q_P}{q_S} \quad Y_{P/X} = \frac{q_P}{\mu}$$

$Y_{X/S}$: rendement instantané de croissance (g/g)

$Y_{P/S}$: coefficient instantané de production d'un composé extracellulaire par rapport au substrat (g/g)

$Y_{P/X}$: coefficient instantané de production d'un composé extracellulaire par rapport à la biomasse (g/g)

● Calcul du recouvrement carboné :

Il s'agit du rapport entre le carbone total produit et le carbone total consommé. Il peut être calculé à partir de quantités cumulées de métabolites produits ou consommés depuis le début de la culture et jusqu'au temps considéré (en général, la fin de la phase de croissance). Ces quantités cumulées, exprimées en g/l, sont définies par :

$$\Delta X = X - X_0 \quad \Delta S = S_0 - S \quad \Delta P = P - P_0$$

La quantité cumulée de CO_2 produit au cours de la fermentation (ΔCO_2) peut être calculée en intégrant la vitesse instantanée de production par rapport au temps, depuis le début de la culture jusqu'à l'instant considéré. Ceci est réalisé grâce au logiciel Kaleidagraph.

Le recouvrement carboné est ensuite donné par :

$$RC = 100 \cdot \frac{\sum_i (\Delta M_i \cdot mc_i)}{\Delta S \cdot mc_S}$$

RC : recouvrement carboné (en pourcentage du carbone consommé)

ΔM : quantité cumulée de métabolite produit (X ou P, en g/l)

mc : proportion massique de carbone dans le métabolite considéré
(g de carbone / g de métabolite)

les proportions massiques de carbone pour les composés pris en compte dans nos expériences sont les suivantes : $mc_{\text{glucose}}=0,40$ g/g ; $mc_{\text{glutamate}}=0,41$ g/g ; $mc_{CO_2}=0,28$ g/g ; $mc_{\text{biomasse}}=0,46$ g/g (formule élémentaire moyenne : $C_1H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ avec 5% de cendres).

Exploitation des données expérimentales

● Traitement des métabolites intracellulaires :

Les dosages des métabolites intracellulaires donnent des quantités ou niveaux intracellulaires exprimés en $\mu\text{mol/gMS}$. L'erreur estimée sur ces dosages, extraction comprise, est évaluée entre 15 et 20%. Plusieurs notions sont introduites ici pour comparer ces métabolites aux produits extracellulaires.

● **production extracellulaire équivalente** : il s'agit de la quantité de métabolite intracellulaire exprimée en concentration sur l'ensemble du fermenteur, donnée par $P_i \cdot X$ et exprimée en $\mu\text{mol/l}$.

● **vitesse de production extracellulaire équivalente** : $r_{P_i}^{\text{ext}} = \frac{d(P_i \cdot X)}{dt}$ ($\mu\text{mol/l.h}$)

● **pseudo-excrétion** : il s'agit de l'excrétion potentielle d'un métabolite intracellulaire par la bactérie, c'est à dire le surplus de métabolite produit par rapport à un état de référence, en réponse à un stress tel qu'une augmentation de l'osmolarité du milieu. La démarche est la suivante :

- dosage des métabolites intracellulaires : P_i , en $\mu\text{mol/gMS}$

- calcul d'une production intracellulaire \tilde{P}_i , par soustraction des quantités de référence :

$$\tilde{P}_i = P_i - P_i^0 \quad (\mu\text{mol/gMS}) \quad \text{avec } P_i^0 \text{ la quantité de référence}$$

- conversion en une production extracellulaire équivalente, appelée pseudo-excrétion, et donnée par $\tilde{P}_i \cdot X$ ($\mu\text{mol/l}$)

- calcul de la vitesse correspondante, appelée **vitesse de pseudo-excrétion**, exprimée en $\mu\text{mol/l.h}$:

$$p_{s\pi} = \tilde{r}_{P_i}^{\text{ext}} = \frac{d(\tilde{P}_i \cdot X)}{dt}$$

remarque : toutes ces grandeurs peuvent être exprimées en g/l.h en multipliant par la masse molaire du métabolite considéré et en divisant par un facteur 10^6 .

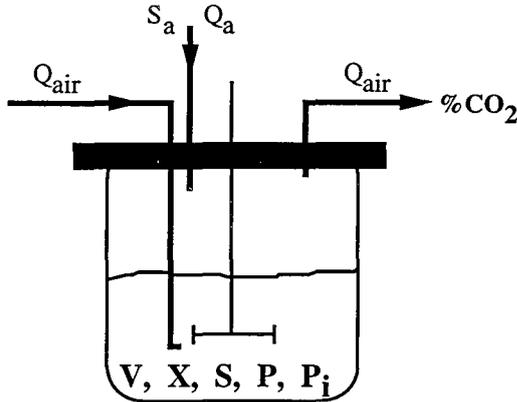
Concernant nos études sur l'influence de la pression osmotique sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum*, l'état de référence est constitué par la culture à 0,45 Osm, pour laquelle les niveaux intracellulaires suivants ont été mesurés pour le glutamate et la proline :

$$\text{Glu}_i^0 = 450 \pm 50 \mu\text{mol/gMS} \quad \text{et} \quad \text{Pro}_i^0 = 50 \pm 20 \mu\text{mol/gMS}$$

Pour le tréhalose, le niveau varie de 0 à 200 $\mu\text{mol/gMS}$, quelle que soit la culture, et nous lui attribuerons donc une pseudo-excrétion nulle.

Exploitation des données expérimentales

□ Détermination des vitesses et des rendements en culture semi-continue :



V : volume de milieu (l)
 X : concentration en biomasse (g/l)
 S : concentration en substrat (g/l)
 P : concentration en produit extracellulaire (g/l)
 P_i : quantité de produit intracellulaire ($\mu\text{mole/gMS}$)
 $\%CO_2$: pourcentage molaire de gaz carbonique
 dans les gaz de sortie du réacteur
 Q_{air} : débit d'aération du réacteur (l/h)
 S_a : concentration en substrat dans l'alimentation (g/l)
 Q_a : débit d'alimentation (l/h)

Les bilans matière en procédé semi-continu sont modifiés car il faut tenir compte de l'alimentation. On obtient les relations suivantes :

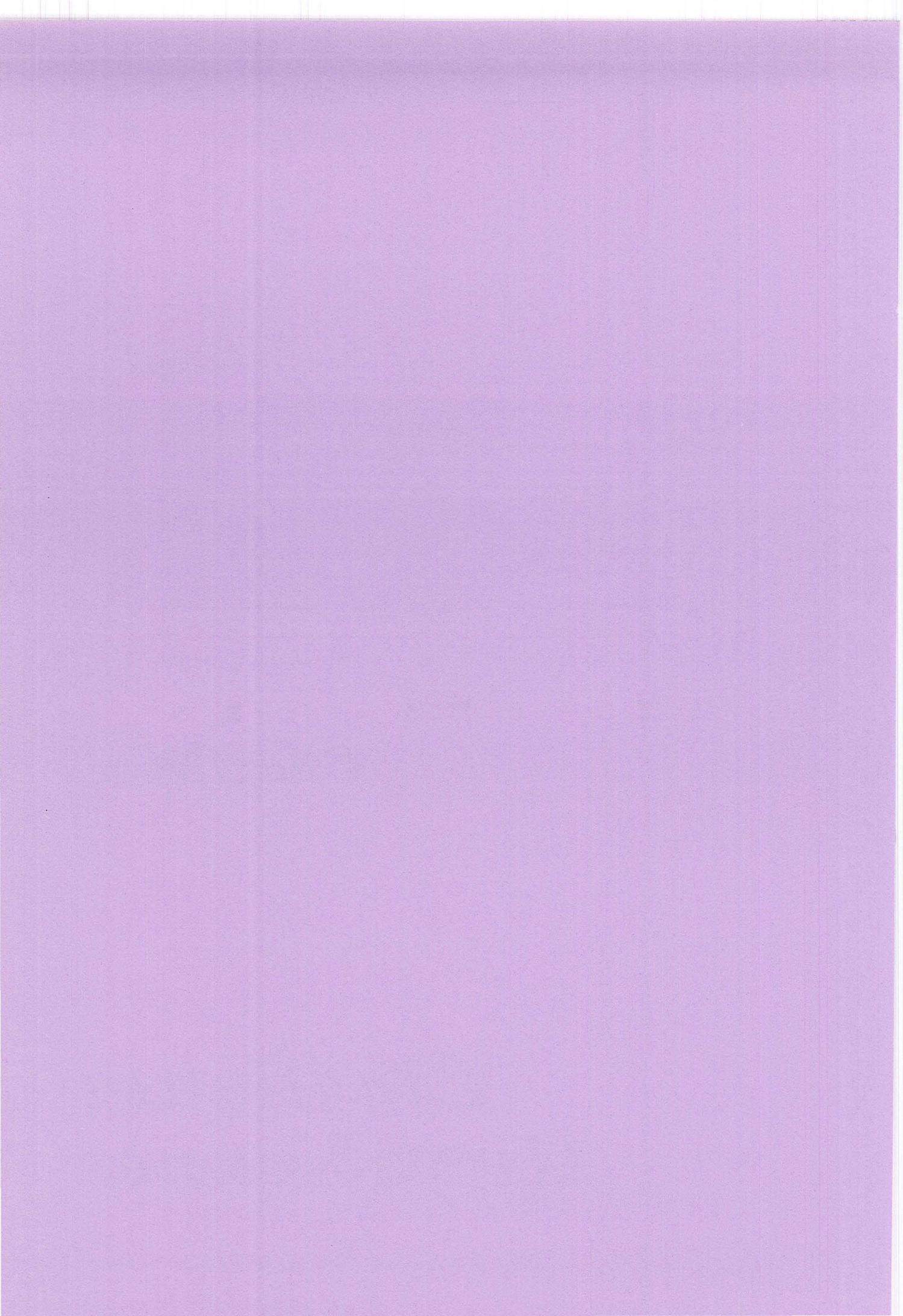
$$r_X^{\text{app}} = \frac{d(X.V)}{dt} = \frac{Q_a}{V} + \frac{dX}{dt} \quad r_S^{\text{app}} = \frac{Q_a}{V} (S_a - S) - \frac{dS}{dt} \quad r_P^{\text{app}} = \frac{Q_a}{V} P + \frac{dP}{dt}$$

Les autres grandeurs sont calculées de la même manière qu'en procédé discontinu.

En culture semi-continue, on ne parlera plus de pseudo-excrétion puisque les métabolites sont tous réellement extracellulaires.

Chapitre 3

*Cinétiques
Microbiennes*



SOMMAIRE du CHAPITRE III

III.1. Cinétique de croissance en culture discontinue.....	89
III.1.1. Culture discontinue à 0,45 Osm en milieu BMCG	90
III.1.2. Culture discontinue à 1,5 Osm en milieu BMCG.....	93
III.1.4. Culture discontinue à 2,2 Osm en milieu BMCG.....	95
III.1.5. Culture discontinue à 2,7 Osm en milieu BMCG.....	98
III.1.6. Culture discontinue à 3,0 Osm en milieu BMCG.....	100
III.1.7. Culture discontinue en milieu BMM.....	100
III.1.8. Conclusion - Discussion sur les cultures discontinues.....	102
III.2. Cultures en mode semi-continu.....	105
III.2.1. Etudes cinétiques de la production de glutamate	105
III.2.2. Etude cinétiques et évolution de la composition élémentaire de la biomasse en culture semi-continue.	108
III.2.2.1. Données cinétiques.....	108
III.2.2.2. Composition CHON	109
III.2.3 Conclusion - Discussion sur les cultures semi-continues.....	111
III.3. Conclusions	112

Cinétiques de Corynebacterium glutamicum en croissance et en production de glutamate

Les résultats que nous allons présenter dans ce chapitre font partie d'une étude plus large sur la physiologie de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 17965 en croissance ou en production de glutamate, et en particulier sur l'effet de l'osmolarité du milieu. Les études cinétiques présentées ont pour triple objectif d'acquies et de compléter les informations sur le mécanisme de réaction à la pression osmotique et sur le processus de production, de fournir les données nécessaires à la construction d'un modèle cinétique original décrivant l'effet de la pression osmotique (chapitre IV) et à l'application de Métaflux, notre méthode de modélisation métabolique (chapitre VI).

Ce chapitre est subdivisé en trois parties :

- **cinétiques de croissance** de *Corynebacterium glutamicum*.
- **cinétiques de la production de glutamate** par *Corynebacterium glutamicum*.
- détermination de la **variation de la composition élémentaire** (CHON) des bactéries au cours du procédé de production de glutamate (culture semi-continue), afin d'étudier par la suite l'influence de cette variabilité sur l'évaluation des flux métaboliques (chapitre V).

III.1. Cinétique de croissance en culture discontinue

Ces études ont été réalisées pour partie en réacteur de 20 litres et pour une autre en réacteur de 2 litres (pour des raisons techniques), en milieu synthétique BMCG avec du glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Nous avons tout d'abord étudié une culture à osmolarité "normale", c'est à dire 0,45 Osm, puis des cultures d'osmolarités croissantes : 1,5, 2,2, 2,7 et enfin 3,0 Osm. Ces expériences ont été choisies pour étudier le comportement de la souche en croissance dans des conditions d'osmolarité proches de celles de la production (culture à 1,5 Osm), mais aussi aux fortes pressions osmotiques pour les trois autres. Les cultures réalisées en réacteur de 20 litres permettent

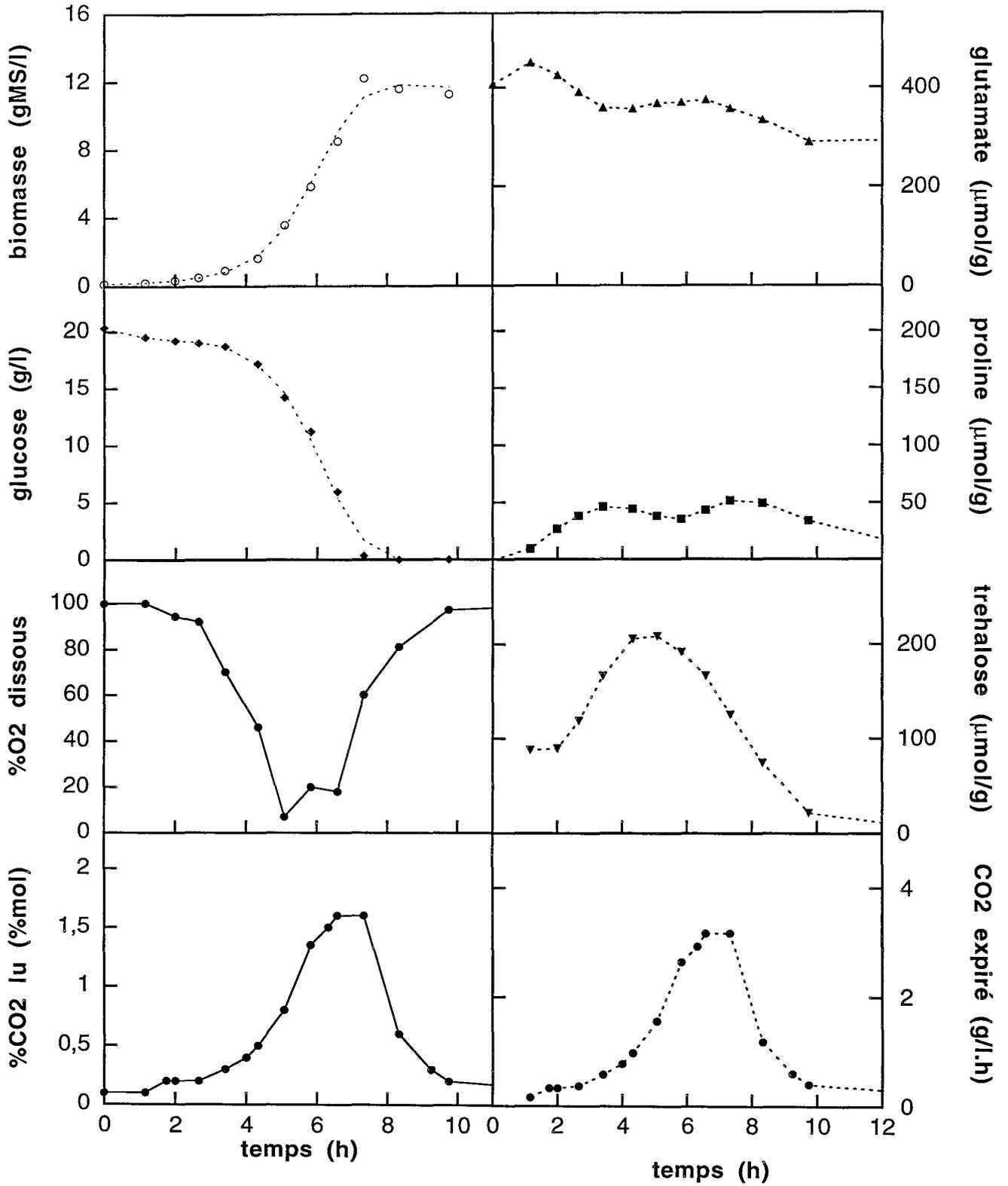


Figure III.1 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture discontinue de *Corynebacterium glutamicum* à pression osmotique normale (milieu BMCG).

en particulier d'accéder à la mesure du CO₂ expiré, une donnée indispensable à l'établissement des bilans carbonés, mais qui peut aussi indiquer des changements physiologiques et qui servira lors des évaluations de flux métaboliques.

En fin de paragraphe, nous présentons également une culture discontinue effectuée en réacteur de 20 litres en milieu BMM (milieu de production de glutamate). Cette culture a été réalisée dans les conditions de milieu et de concentration en glucose identiques à celles du procédé semi-continu de production de glutamate, mais en mode discontinu, afin de comparer le comportement de la souche bactérienne en croissance par rapport au milieu BMCG classique.

Nous allons utiliser au cours de ces études des notions nouvelles permettant de faciliter la manipulation des métabolites intracellulaires. Le dosage de tels composés conduit à la quantification de leur niveau intracellulaire, exprimé en micromoles par gramme de biomasse sèche ($\mu\text{mol/gMS}$). Pour se rapprocher d'une variable extracellulaire rencontrée plus habituellement, on convertira le niveau intracellulaire en **production extracellulaire équivalente**, exprimée en g/l, et qui correspond à la concentration du métabolite ramenée à l'ensemble du milieu réactionnel. On peut alors calculer une **vitesse de production extracellulaire**, vitesse volumique (g/l.h) ou spécifique (g/g.h). Enfin, nous introduisons la notion de **pseudo-excrétion**, qui correspond à la vitesse de production extracellulaire dont on soustrait une référence, un niveau de base contenu dans la cellule dans les conditions normales. Cette dernière approche permet de ne prendre en compte que le surplus de synthèse d'un métabolite en réponse à une perturbation environnementale telle qu'un stress osmotique par exemple. Ces données n'apportent en elles aucune information supplémentaire par rapport aux quantités intracellulaires, c'est pourquoi nous ne les illustrerons que sur les deux premières cultures présentées. En revanche, elles constituent des intermédiaires de calcul dans l'obtention du coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{\text{pro/X}}$), un paramètre macroscopique d'intérêt pour l'étude et la modélisation macrocinétique de l'influence de la pression osmotique sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum* (chapitre IV). La pseudo-excrétion sera quand à elle utilisée lors de l'évaluation des flux métaboliques (chapitre VI).

III.1.1. Culture discontinue à 0,45 Osm en milieu BMCG

Les 9,6 litres de milieu BMCG contenus dans le réacteur ont une osmolarité de base de 0,4 Osm, augmentée à 0,45 Osm par l'ajout du glucose. La culture se déroule à 34°C, à pH 7,3 régulé par de la soude 4N, avec une agitation de 400 rpm et sous une aération de 1,4 vvm. La concentration initiale en glucose est de 21 g/l. L'ensemencement par une préculture de 400 ml conduit à une DO initiale de 0,6 (soit 0,3 g/l de masse sèche). L'évolution des concentrations de biomasse et de glucose, ainsi que le pourcentage d'O₂ dissous et de CO₂ expiré sont présentés sur la figure III.1. Dans les conditions utilisées, une concentration maximale de 12 g/l de biomasse est obtenue pour 20 g/l de glucose initial.

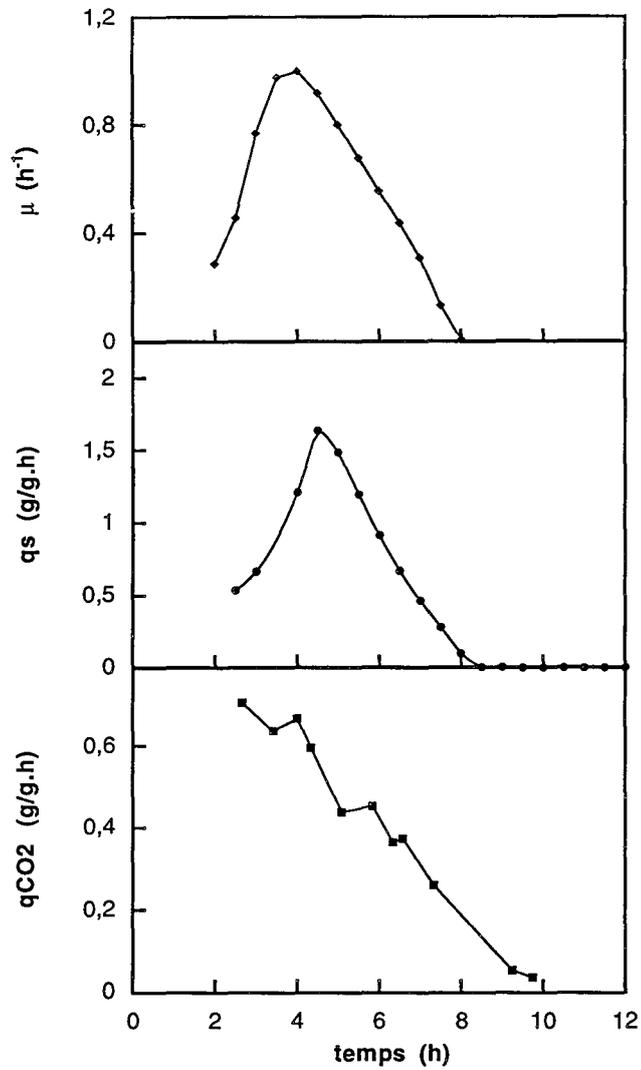


Figure III.2 : Vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation du glucose (q_s) et de production de CO_2 (q_{CO_2}) pour la culture discontinue 0,45 Osm.

La cinétique de croissance montre deux phases distinctes :

- a) une **phase de latence** d'environ 2 à 3 heures qui permet la transition du milieu usager de la préculture à l'environnement "frais" du réacteur.
- b) une **phase de croissance** qui dure environ 5 à 6 heures. Elle se décompose en une phase d'accélération, une phase de croissance rapide et une phase de ralentissement. La croissance correspond à la consommation de la source carbonée, en l'occurrence le glucose. Elle se termine avec l'épuisement du glucose vers 7,5 heures de culture (figure III.1).

Le pourcentage d'O₂ dissous suit exactement ces deux phases, témoignant de l'activité cellulaire : pas de consommation pendant la phase de latence, une forte consommation pendant la phase de croissance avec chute du pourcentage d'O₂ dissous à 20 %, puis remontée dès la fin de la croissance. La proportion molaire de CO₂ dans les gaz de sortie montre un profil inverse. La courbe de la vitesse de production de CO₂ présente une allure identique à celle de la proportion molaire car le débit d'aération est constant dans cette culture (figure III.1).

Les dosages de métabolites intracellulaires montrent la présence de glutamate, proline et tréhalose (figure III.1). Nous n'avons pu détecter par HPLC ni d'autres acides aminés, ni des acides organiques. Le glutamate et la proline montrent un niveau intracellulaire quasiment constant tout au long de la phase de croissance à 300 et 40 $\mu\text{mol/gMS}$ respectivement. En revanche, le tréhalose présente un pic à 200 $\mu\text{mol/gMS}$ correspondant à la vitesse spécifique maximale de croissance, ou à celle de consommation du glucose, pour chuter à 0 en fin de culture. Aucun composé n'est excrété dans le milieu de culture.

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation du glucose et de production de gaz carbonique sont présentées en figure III.2 après lissage et interpolation des données expérimentales. La vitesse spécifique maximale de croissance calculée est de 1 h^{-1} à 4 h de culture environ. Nous retiendrons cependant plutôt la valeur fournie par le calcul logarithmique, soit $\mu_{\text{max}}=0,7 \text{ h}^{-1}$, qui donne une valeur moins sensible aux erreurs de traitement (lissage, interpolation et dérivée). Cet instant correspond également à la vitesse maximale de consommation du glucose ($q_{\text{Smax}}=1,5 \text{ gGlc.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$), et de production de CO₂.

Le rendement instantané de croissance $Y_{X/S}$ est constant à 0,6 gMS/gGlc , valeur identique à celle obtenue par le calcul du rendement cumulé. Le coefficient de production de CO₂ par la biomasse $Y_{\text{CO}_2/X}$, instantané ou cumulé, donne une valeur calculée de 0,7 gCO_2/gMS . Concernant le coefficient de production de CO₂ par rapport au glucose $Y_{\text{CO}_2/S}$, la représentation en cumulé montre une valeur moyenne de 0,4 sur la phase de croissance. On retrouve également cette tendance sur le calcul du coefficient instantané (figure III.3). Ces chiffres permettent de conclure que le glucose est utilisé à 60% pour la synthèse de biomasse et à 40% pour le CO₂.

On calcule enfin un coefficient de synthèse de proline par la biomasse $Y_{\text{Pro}/X}$, dont la valeur instantanée n'apparaît pas constante, mais qui peut être évalué à 0,007 g/g lors du calcul en quantité cumulée (figure III.3).

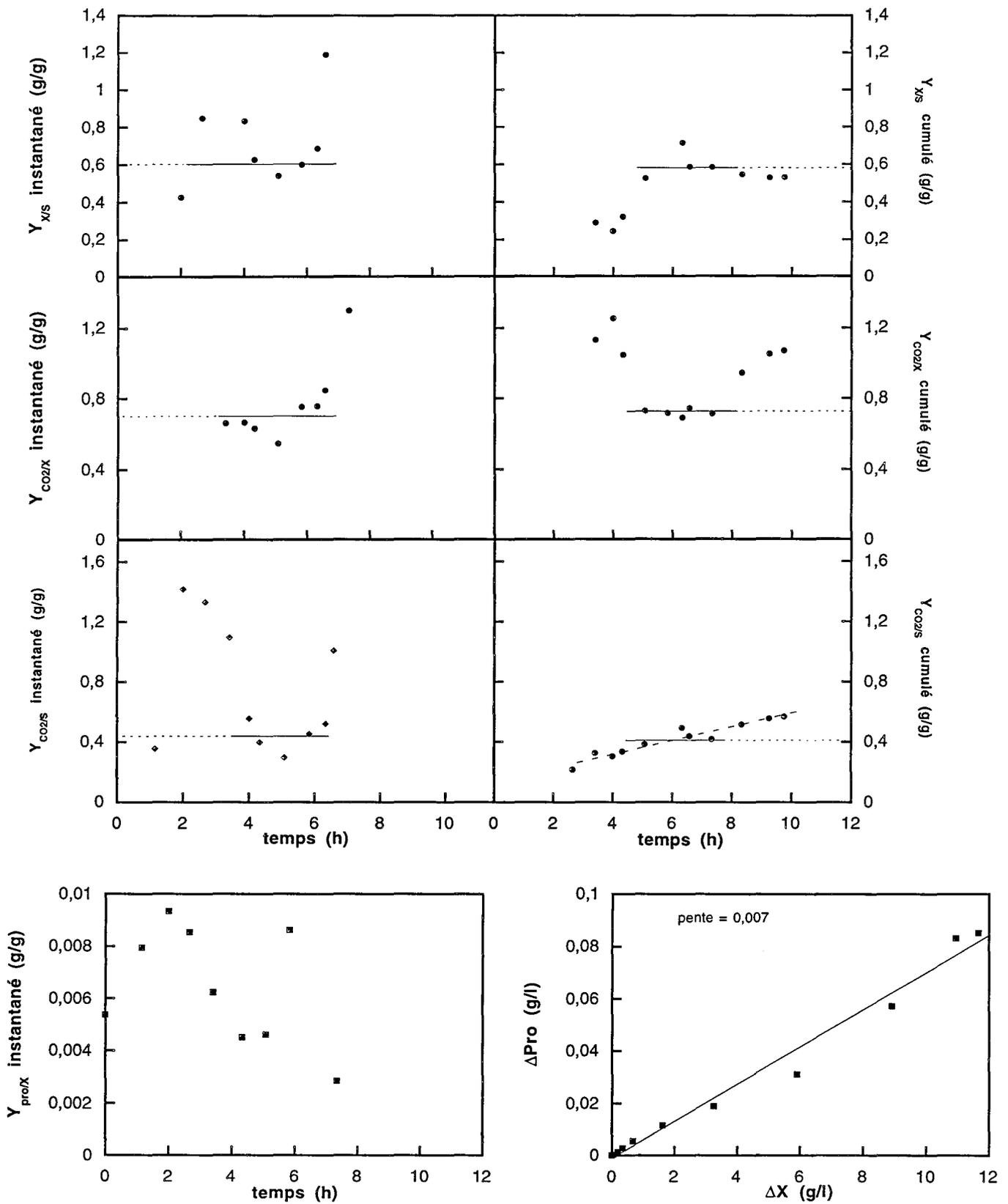


Figure III.3 : Rendement de croissance ($Y_{X/S}$), coefficient de production de CO_2 par rapport à la biomasse ($Y_{CO2/X}$) et par rapport au substrat ($Y_{CO2/S}$), et coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{Pro/X}$), instantanés et cumulés sur la phase de croissance de la culture discontinue à 0,45 Osm.

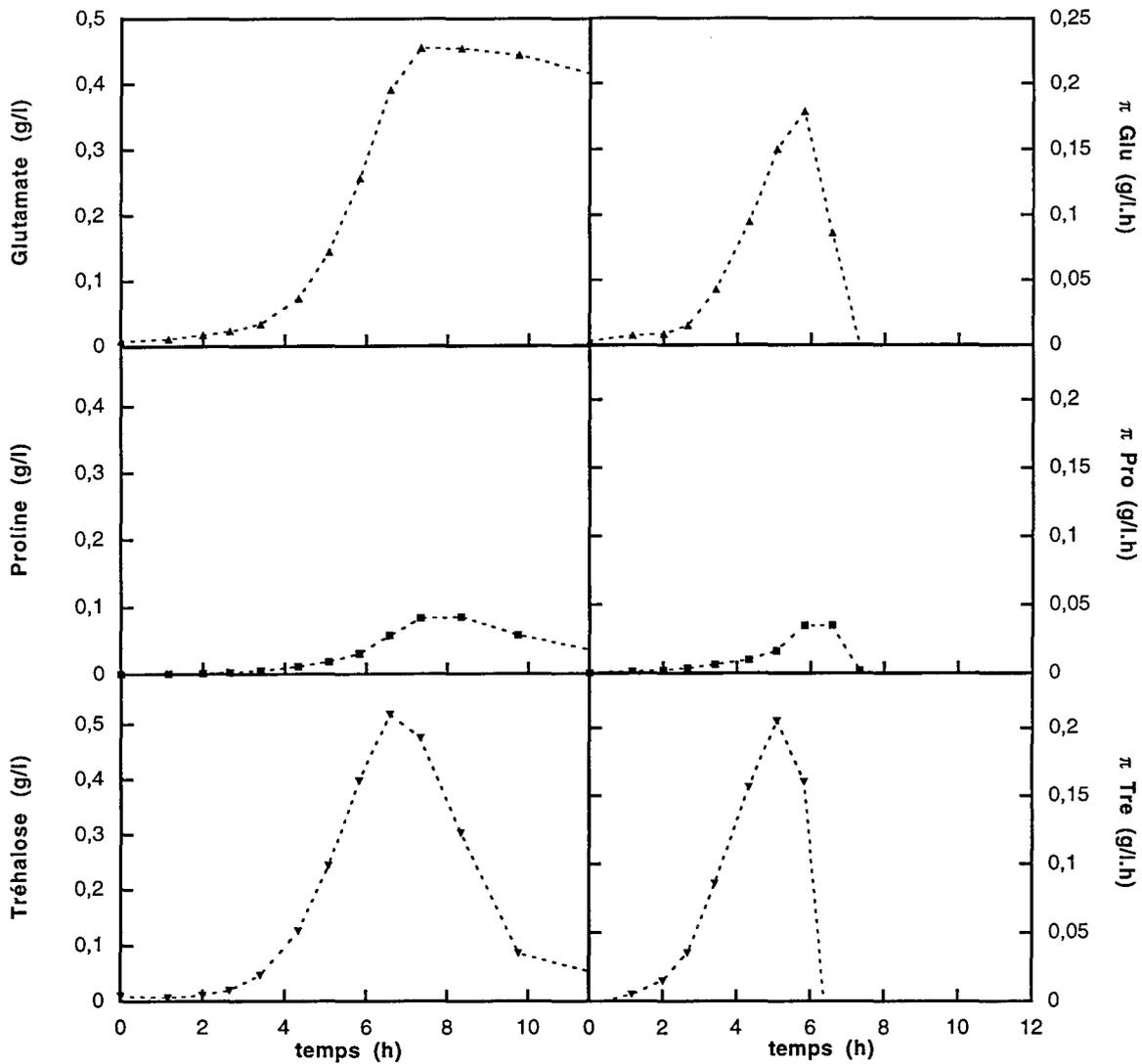


Figure III.4 : Conversion des accumulations de glutamate, proline et tréhalose en productions extracellulaires équivalentes (en g/l), et vitesses de production correspondantes (en g/l.h) pour la culture discontinue à 0,45 Osm.

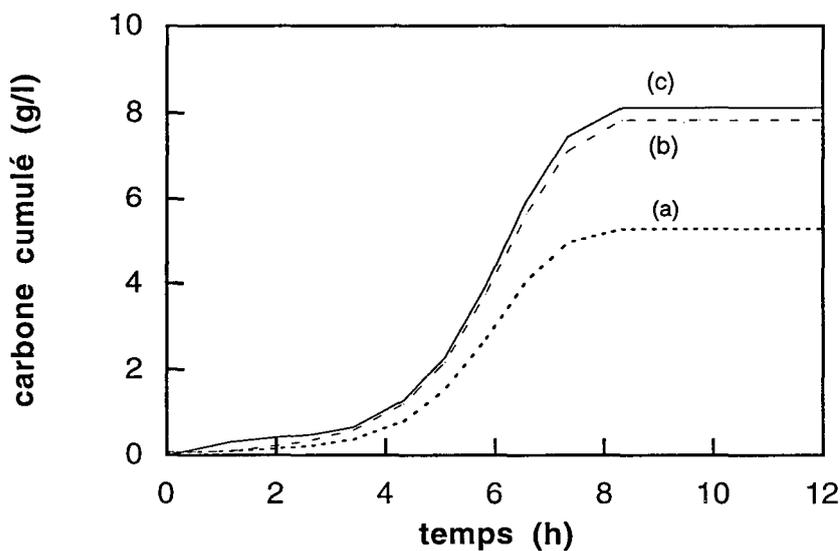


Figure III.5 : Recouvrement carboné pour la culture discontinue à 0,45 Osm.
(a) biomasse, (b) biomasse+CO₂, (c) glucose.

(formule moyenne de la biomasse : C₁H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}, soit 44% de carbone en masse)

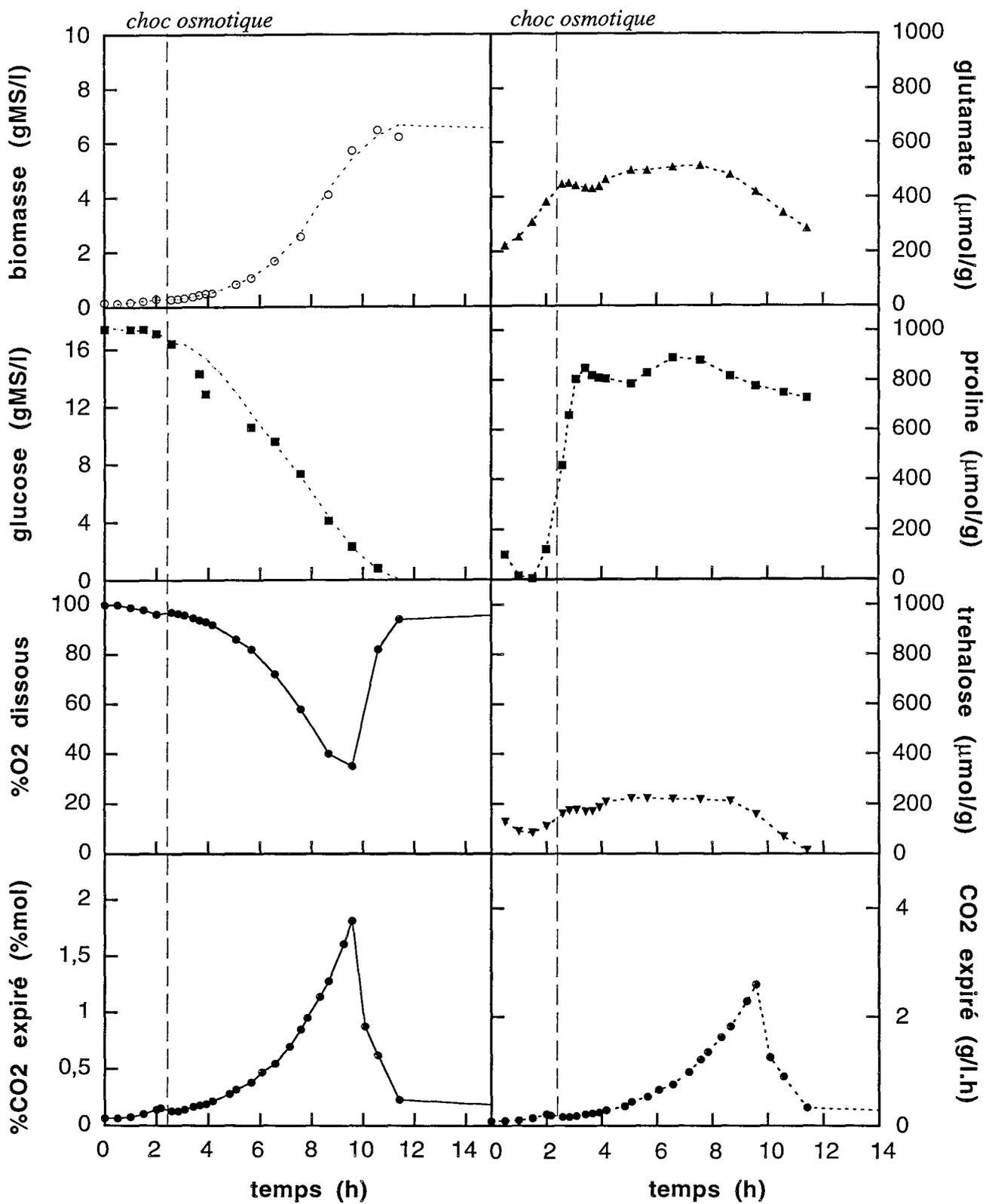


Figure III.6 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture discontinue de *Corynebacterium glutamicum* à 1,5 Osm (milieu BMCG).

Les productions extracellulaires équivalentes indiquent un maximum de 0,5 g/l de glutamate, 0,1 g/l de proline et 0,5 g/l de tréhalose à 7 heures de culture. Les vitesses correspondantes ont un maximum vers 6 heures de culture avec des valeurs de 0,15, 0,05 et 0,2 g/l.h respectivement (figure III.4). Ces valeurs serviront de base de comparaison avec les cultures d'osmolarité élevée.

Nous avons effectué le calcul du recouvrement carboné à partir d'une formule élémentaire moyenne de la biomasse citée de la littérature : $C_1H_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$, soit une masse de carbone de 42% (Roels, 1983 ; ces données seront également utilisées pour les autres cultures). Le recouvrement carboné sur l'ensemble de la culture s'élève à 97%, indiquant qu'aux erreurs de mesure près, les seuls métabolites produits dans ce type de culture sont bien la biomasse et le CO_2 . Ces composés participent respectivement pour 67% et 33% du recouvrement carboné global, ce qui est cohérent avec les chiffres avancés précédemment (figure III.5).

III.1.2. Culture discontinue à 1,5 Osm en milieu BMCG

Pour cette culture, le réacteur contient un volume de 12 litres de milieu BMCG-glucose,ensemencés à 0,25 gMS/l, avec une concentration initiale de glucose de 18 g/l. Les conditions sont identiques à celles de la fermentation précédente. Après 2 heures de culture, on réalise le choc hyperosmotique en ajoutant stérilement 491 grammes de NaCl dans le réacteur. L'osmolarité finale obtenue est mesurée à 1,5 Osm.

La figure III.6 montre l'évolution de la biomasse, du glucose et du CO_2 produit dans les gaz de sortie. Toutes ces cinétiques possèdent un léger décrochement au moment de l'ajout du NaCl, suivi d'une courte phase de latence. Ce phénomène est une conséquence directe de la perturbation environnementale due au stress hyperosmotique. La phase de croissance à pression osmotique élevée s'étend de 4 à 11 heures, correspondant à la consommation et à l'épuisement du glucose. En ce qui concerne le glucose et malgré la répétition par 3 fois des dosages, nous observons un fort épaulement à 4 heures de culture. L'analyse des autres cinétiques (biomasse, gaz) ne permet pas de trouver une explication à ce phénomène, et nous avons donc conclu à un artefact ou à un problème lors de l'échantillonnage. Nous avons donc appliqué un lissage gommant ce phénomène (figure III.6). O_2 dissous et CO_2 expiré montrent des cinétiques opposées avec des minimum et maximum vers 9 heures.

Les vitesses maximales spécifiques de croissance et de consommation du glucose présentent deux maxima. Le premier correspond à la phase pré-choc, rapidement interrompue par l'ajout du sel, et le second à la culture en milieu hyperosmotique. Dans ce deuxième cas, les valeurs observées sont respectivement de $\mu_{max}=0,6 h^{-1}$ et $q_{s,max}=3,5 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ à 6 heures de culture (figure III.7). La vitesse spécifique de production de CO_2 présente également un maximum à 6 heures avec $q_{CO_2,max}=0,55 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, mais elle montre un plateau à $0,5 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ jusqu'à la fin de la phase de croissance (figure III.7).

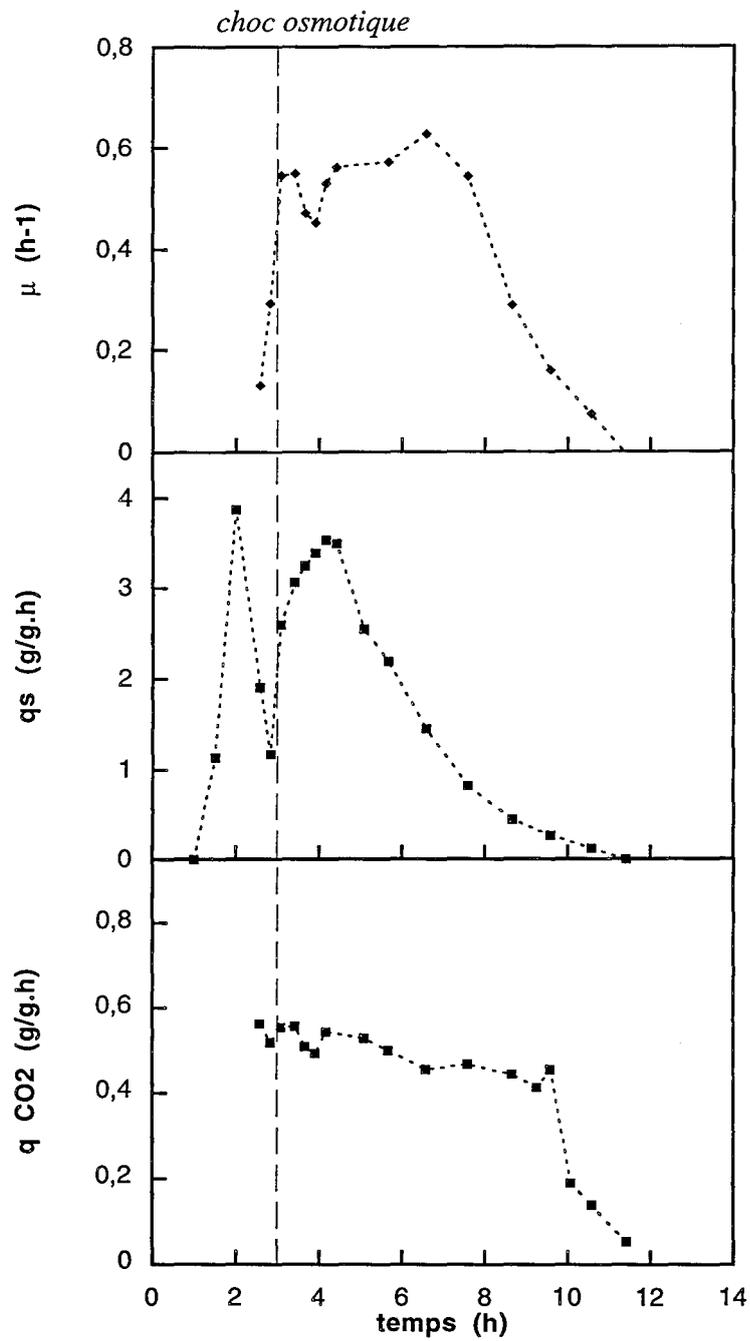


Figure III.7 : Vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation du glucose (q_s), et de production de CO_2 (q_{CO_2}) pour la culture discontinue à 1,5 Osm.

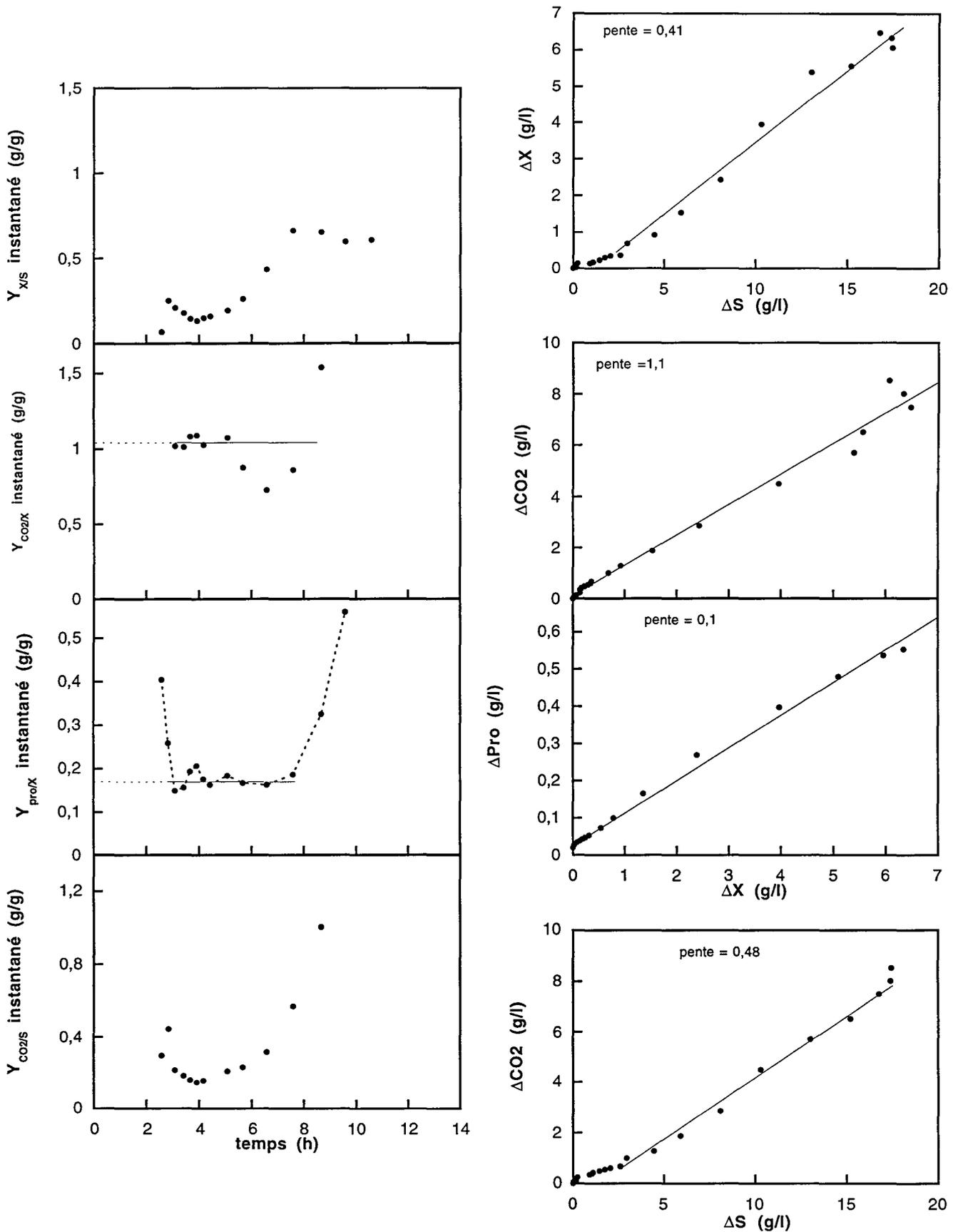


Figure III.8 : Rendement de croissance ($Y_{X/S}$), coefficient de production de CO_2 par rapport à la biomasse ($Y_{CO_2/X}$) et par rapport au substrat ($Y_{CO_2/S}$), et coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{Pro/X}$), instantanés et cumulés sur la phase de croissance de la culture discontinue à 1,5 Osm.

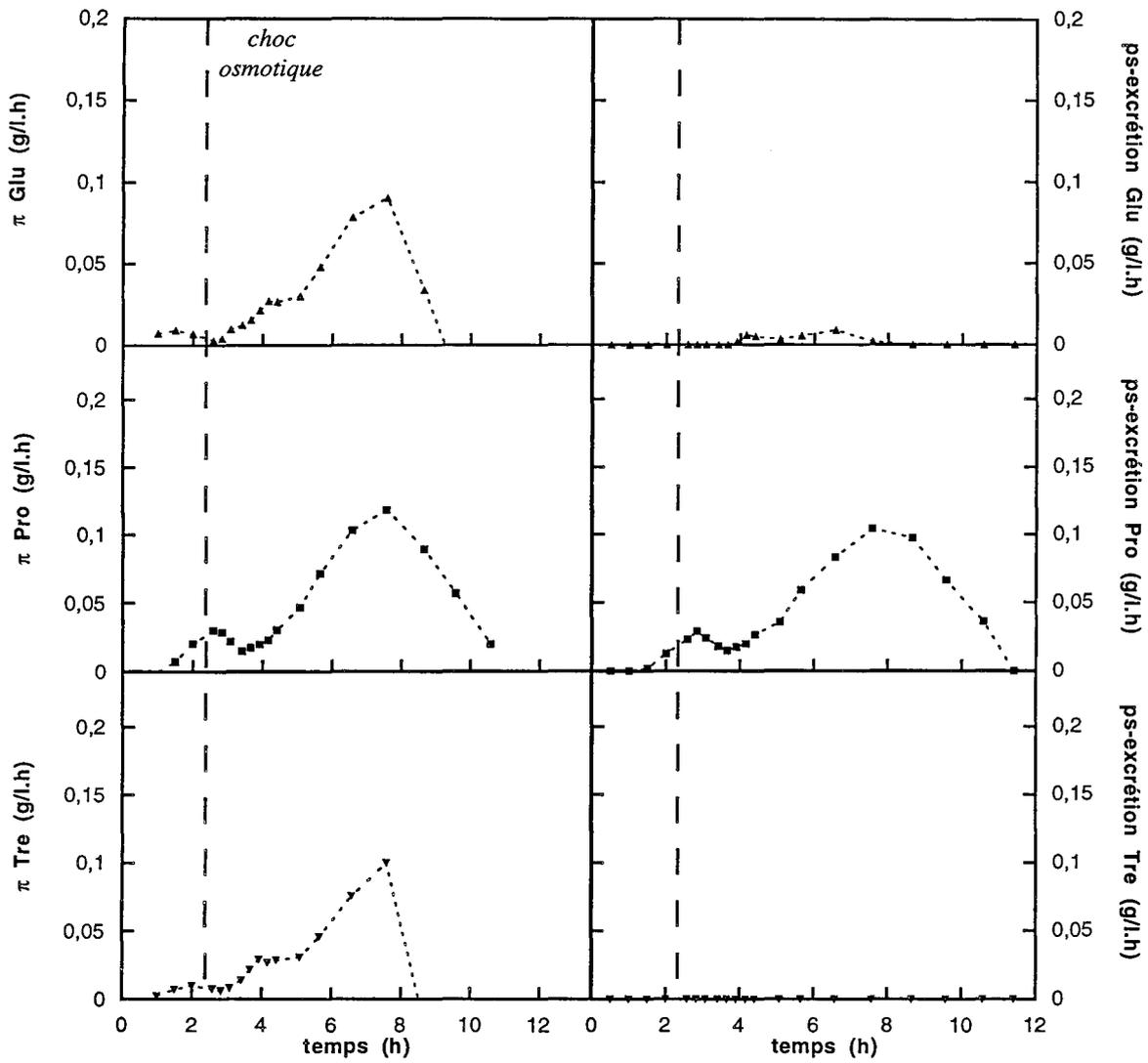


Figure III.9 : Conversion des accumulations de glutamate, proline et tréhalose en vitesses de production extracellulaire équivalente (en g/l.h) et en pseudo-excrétion (en g/l.h) pour la culture discontinue à 1,5 Osm.

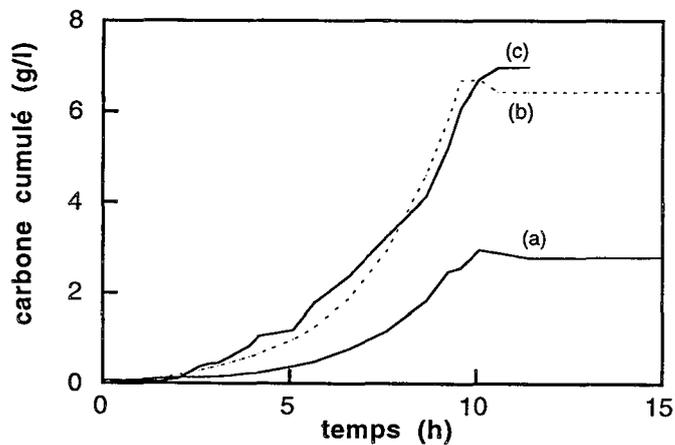


Figure III.10 : Recouvrement carboné pour la culture discontinue à 1,5 Osm.
 (a) biomasse, (b) biomasse+CO₂, (c) glucose.
 (formule de la biomasse identique à celle de la culture à 0,45 Osm)

Le calcul des rendement et coefficients instantanés ne permet pas de déterminer des valeurs constantes. En revanche, le calcul de ces paramètres en cumulé conduit à des valeurs moyennes constantes sur la phase de croissance. Le rendement de conversion du glucose $Y_{X/S}$ montre une diminution par rapport à la culture d'osmolarité normale puisqu'il est évalué à 0,41 gMS/g glucose. En revanche, le coefficient de production de CO_2 par rapport à la biomasse $Y_{CO_2/X}$ montre une augmentation avec une valeur de 1,1 g CO_2 /gMS contre 0,7 dans les conditions normales. La production de CO_2 ramenée au substrat consommé $Y_{CO_2/S}$ donne une valeur moyenne de 0,48 g/g, ce qui est également supérieur à la valeur de 0,4 observée à 0,45 Osm (figure III.8). La répartition du glucose se fait donc à 40% dans la biomasse et à 50% dans le CO_2 , ce qui montre un réarrangement par rapport à la culture à 0,45 Osm.

De même que pour la fermentation à pression osmotique normale, les métabolites accumulés intracellulairement sont le glutamate, la proline et le tréhalose. Les quantités intracellulaires de glutamate et de tréhalose sont quasi identiques à celles observées à 0,4 Osm, mais celle de la proline montre une forte augmentation, passant de 40 à 800 $\mu\text{mol/gMS}$ après le choc osmotique (figure III.6). Les vitesses de production extracellulaire équivalente du glutamate et du tréhalose sont du même ordre de grandeur qu'à 0,45 Osm avec 0,1 g.l⁻¹.h⁻¹ à 8 heures de culture, alors que celle de la proline est multipliée par 3 (figure III.9). Le coefficient de production de proline par rapport à la biomasse est calculé à 0,17 g/g en valeur instantanée, et 0,1 en valeur cumulée (figure III.8).

Le recouvrement carboné est présenté sur la figure III.10, avec la même hypothèse sur la composition de la biomasse qu'à 0,45 Osm. Une grande concordance est à nouveau observée entre les productions cumulées de biomasse et de CO_2 et la consommation cumulée du glucose puisque le bilan carboné global s'élève à 92%. Le rapport de la participation de la biomasse et du CO_2 s'est fortement modifié, ces composés représentant respectivement 44 et 56% contre 67 et 33% à 0,45 Osm. Ces chiffres sont à nouveau en accords avec les coefficients calculés plus haut.

Tous ces résultats traduisent une modification du métabolisme cellulaire pour lutter contre l'augmentation de l'osmolarité du milieu, réorientant le glucose vers une néosynthèse de proline et une forte production de CO_2 au détriment de la synthèse de biomasse, que nous allons essayer de confirmer et de préciser avec des cultures à fortes osmolarités.

III.1.4. Culture discontinue à 2,2 Osm en milieu BMCG

Préculture et culture sont réalisées en milieu BMCG avec du glucose comme source de carbone et d'énergie. Le réacteur de 2 litres contient un volume réactionnel de 1100 ml dont 60 ml de préculture, conduisant à une concentration initiale en biomasse de 0,25 g/l. Les conditions de culture sont habituelles : 34°C, pH = 7,3 régulé à la soude 4N, agitation à 900 rpm avec une aération de 0,7 vvm. La concentration initiale en glucose est de 19,2 g/l. Après 2,25 heures de culture, nous

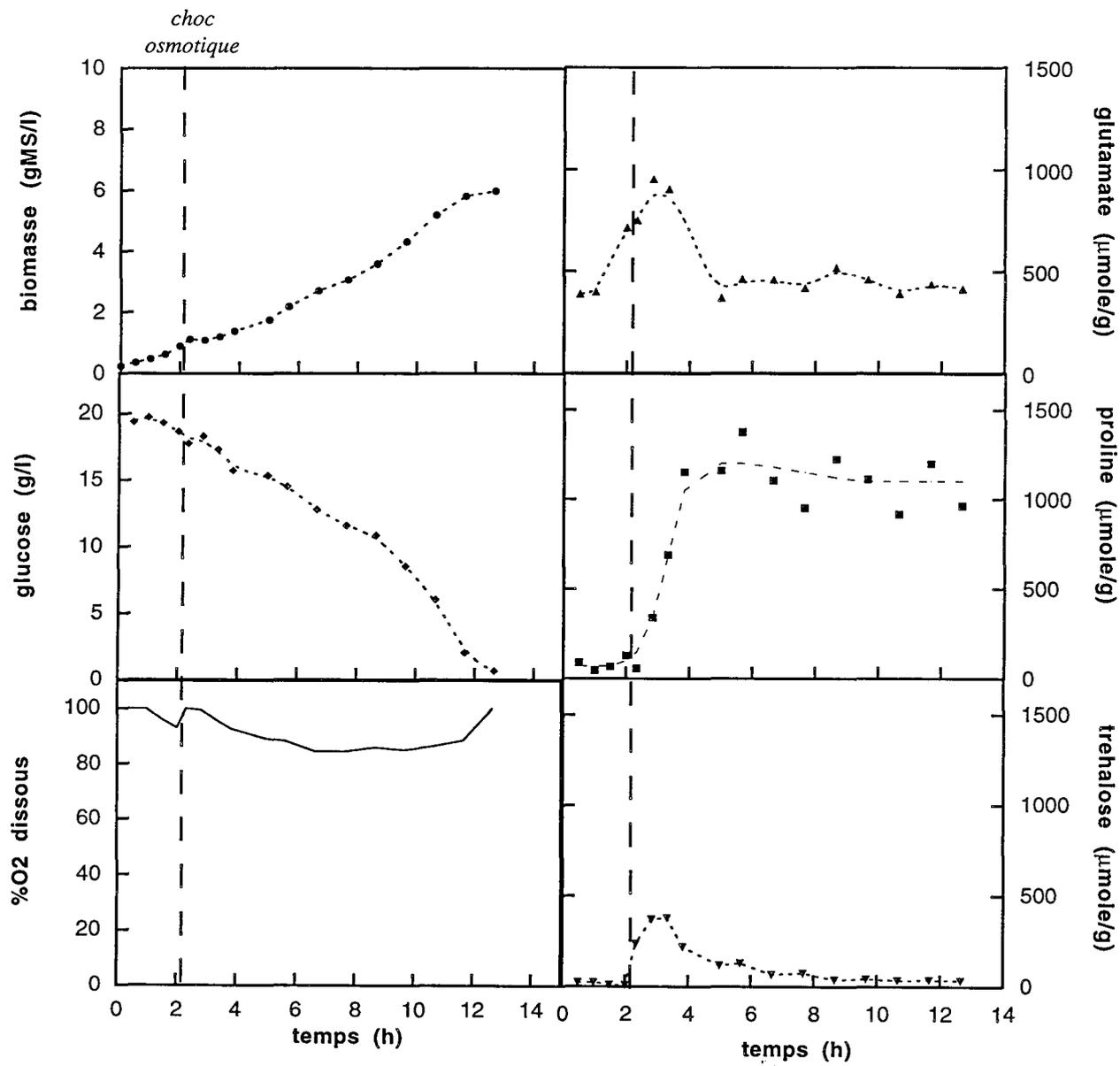


Figure III.11 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture discontinue à 2,2 Osm.

réalisons le choc hyperosmotique en ajoutant stérilement 58 grammes de NaCl, ce qui conduit à une pression osmotique mesurée de 2,2 Osm.

La figure III.11 montre l'évolution des concentrations en biomasse, en glucose ainsi que celle du pourcentage d'oxygène dissous. Comme pour la culture réalisée à 1,5 Osm, on observe un léger décrochement au moment du choc osmotique, reflétant une courte phase d'adaptation. La biomasse et le glucose montrent des évolutions quasi-linéaires pendant les 12 heures de la phase de croissance (contre 7 heures à pression osmotique normale). Le pourcentage d'oxygène dissous ne descend jamais sous la barre des 80 %. Toutes ces observations témoignent d'une activité ralentie en raison de l'osmolarité élevée. La quantité maximale de biomasse formée est de 5,85 g/l pour 18,6 g/l de glucose consommé.

Le calcul des vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose présente à nouveau deux maxima dans chaque cas (figure III.12). Le premier correspond à la phase de culture à 0,45 Osm (avant le choc), avec un μ_{\max} de 0,7 h⁻¹ et un $q_{S\max}$ de 1,2 g.g⁻¹.h⁻¹, et le second à la phase à 2,2 Osm, avec un μ_{\max} d'environ 0,3 h⁻¹ et un $q_{S\max}$ de 1,1 g.g⁻¹.h⁻¹. On observe ainsi une chute de plus de 50% de la vitesse spécifique de croissance, alors que la consommation du glucose ne varie presque pas. Le glucose doit donc être réorienté vers d'autres productions.

Le rendement cumulé $Y_{X/S}$ est évalué à 0,38 g/g sur l'ensemble de la phase de croissance à 2,2 Osm, contre 0,6 g/g à pression osmotique normale. Cette valeur se retrouve sur le rendement instantané (figure III.13). En revanche, le coefficient $Y_{\text{pro}/X}$ n'est pas constant comme l'indique l'évolution du coefficient instantané. Mais le calcul du coefficient cumulé donne une valeur moyenne de 0,12 g/g. Ce dernier résultat peut être nuancé par la distinction de deux phases. La première, avec un coefficient cumulé de 0,2 g/g, s'étend sur 4 heures (de t=2 à t=6 heures de culture) et correspond à la phase de forte synthèse de proline en réponse immédiate au choc osmotique. La seconde commence à 6 heures et reflète une production plus faible de proline avec un $Y_{\text{pro}/X}$ de 0,09 g/g. Ces deux phases pourraient respectivement être qualifiées de phase de "réaction" et de phase de "maintenance" vis à vis de la pression osmotique. Elles n'ont pas été mises en évidence lors de la culture précédente à cause d'une trop faible synthèse de proline. Ces observations témoignent bien du fait que la synthèse de proline n'est pas uniquement associée à la croissance bactérienne.

Les dosages intracellulaires de glutamate, proline et tréhalose sont représentés sur la figure III.11. La proline montre un comportement identique à celui de la culture à 1,5 Osm : augmentation très forte immédiatement après le choc osmotique, jusqu'à atteindre un plateau d'environ 1000 $\mu\text{mol/gMS}$. Le tréhalose marque également une forte augmentation après le choc (jusqu'à 400 $\mu\text{mol/gMS}$) mais diminue aussitôt pour atteindre une valeur moyenne de 50 $\mu\text{mol/gMS}$. Le comportement le plus surprenant provient du glutamate, qui présente un pic très prononcé jusqu'à 900 $\mu\text{mol/gMS}$ au moment du choc. Ce pic semble simultané à l'augmentation de tréhalose et précède l'augmentation de proline.

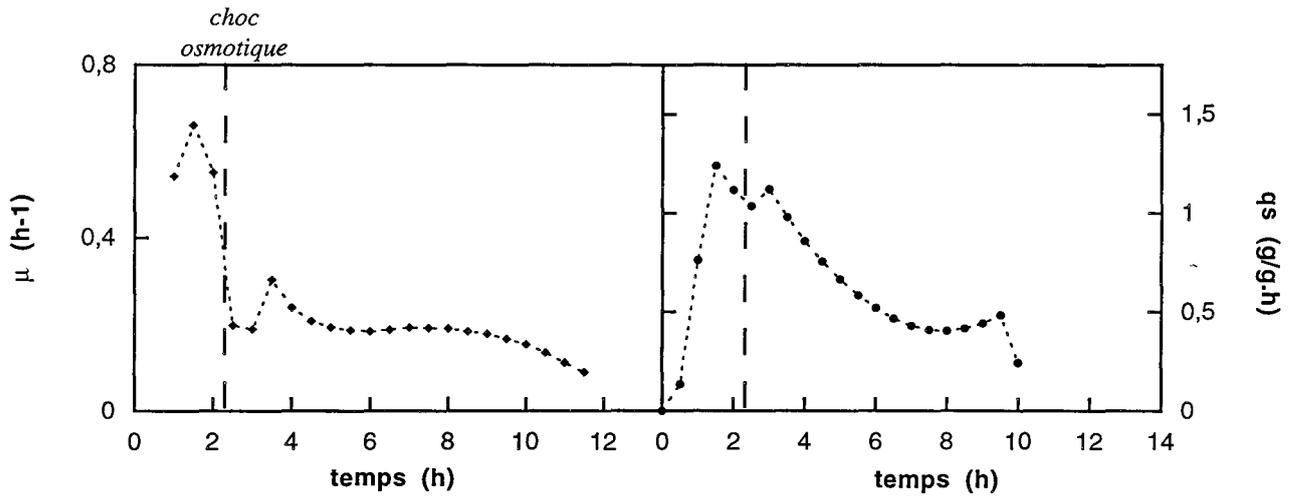


Figure III.12 : Vitesses spécifiques de croissance (μ) et de consommation du glucose (q_s) à 2,2 Osm.

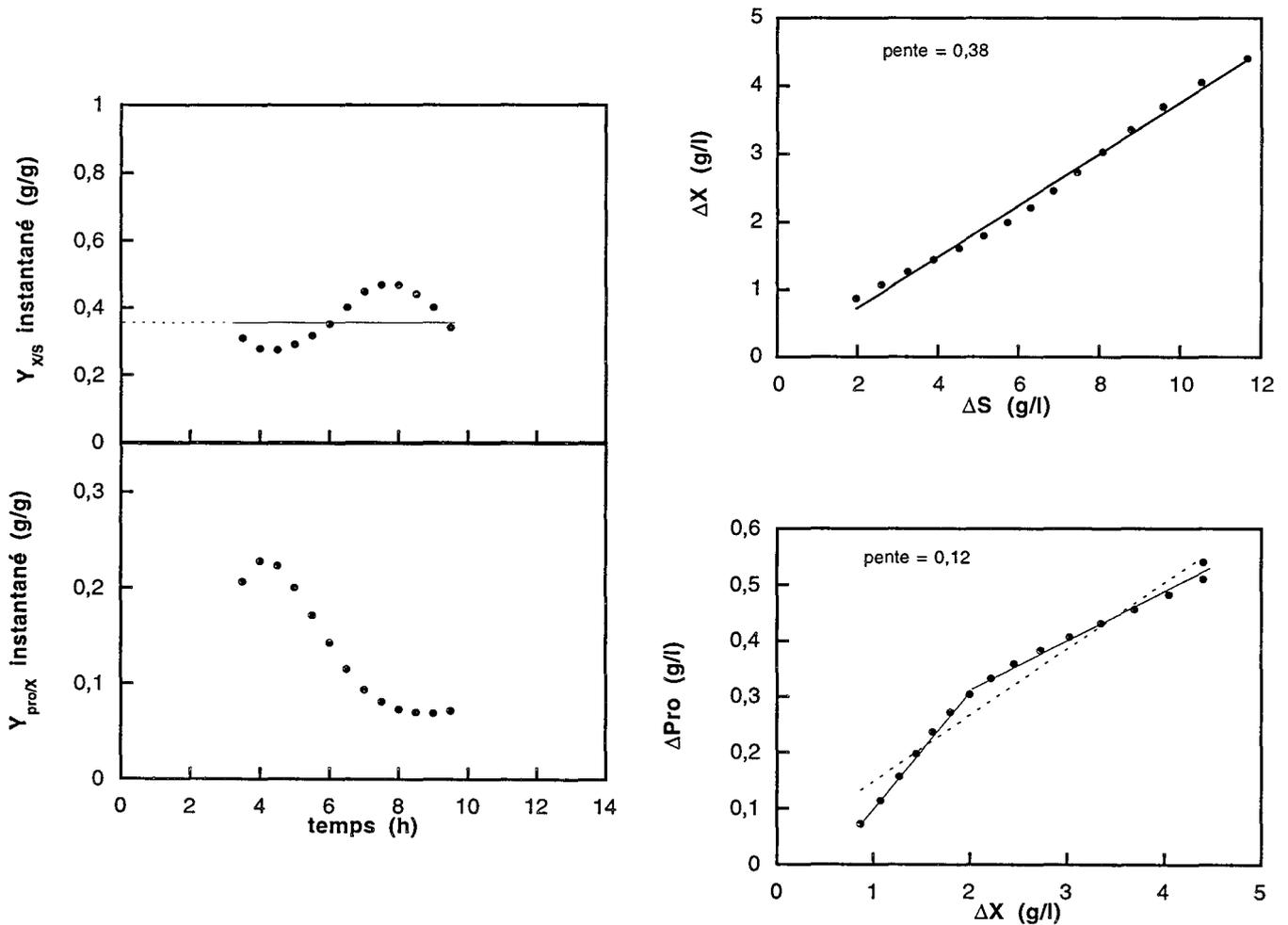


Figure III.13 : Rendement de croissance ($Y_{X/S}$) et coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{Pro/X}$), instantanés et cumulés sur la phase de croissance de la culture discontinue à 2,2 Osm.

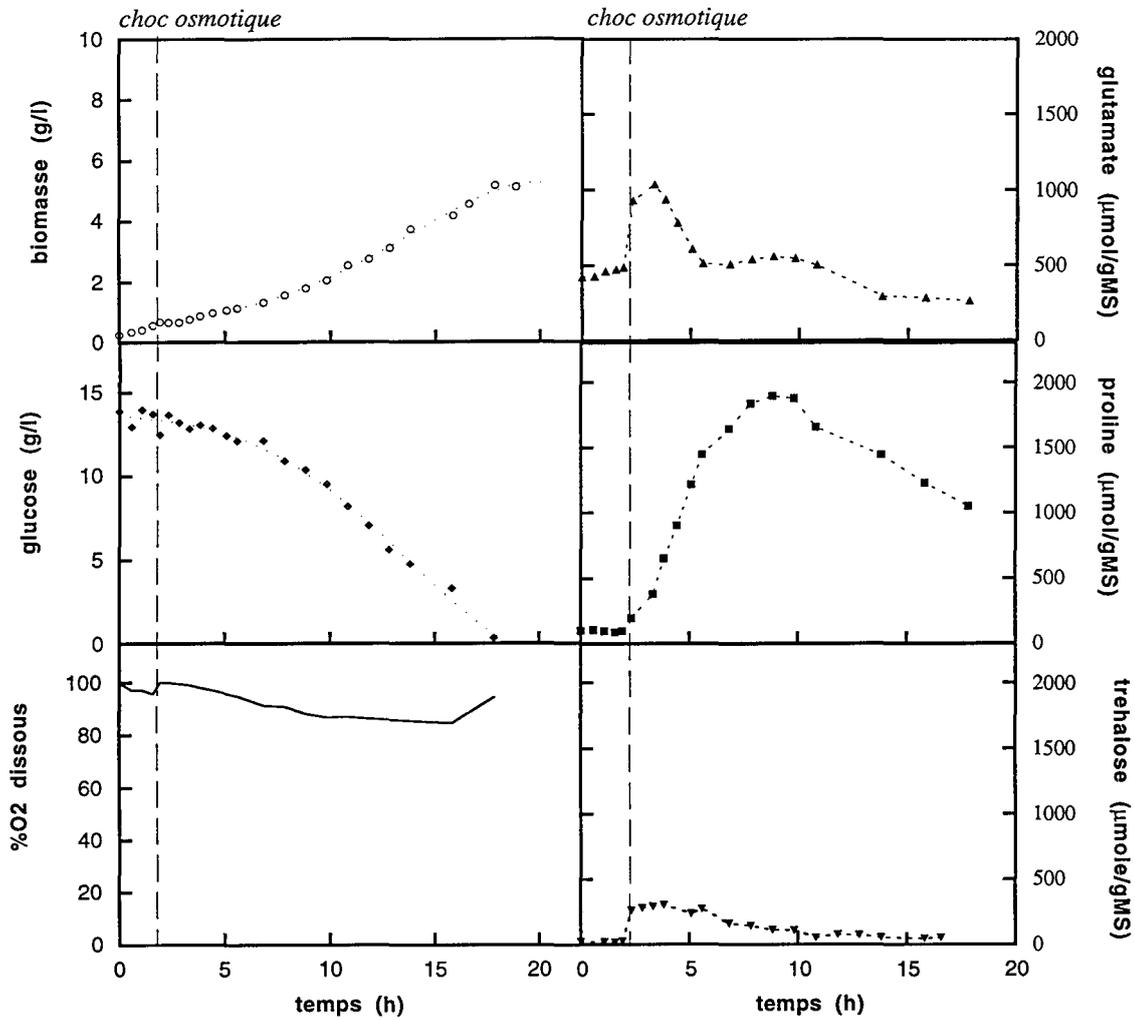


Figure III.14 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture à 2,7 Osm.

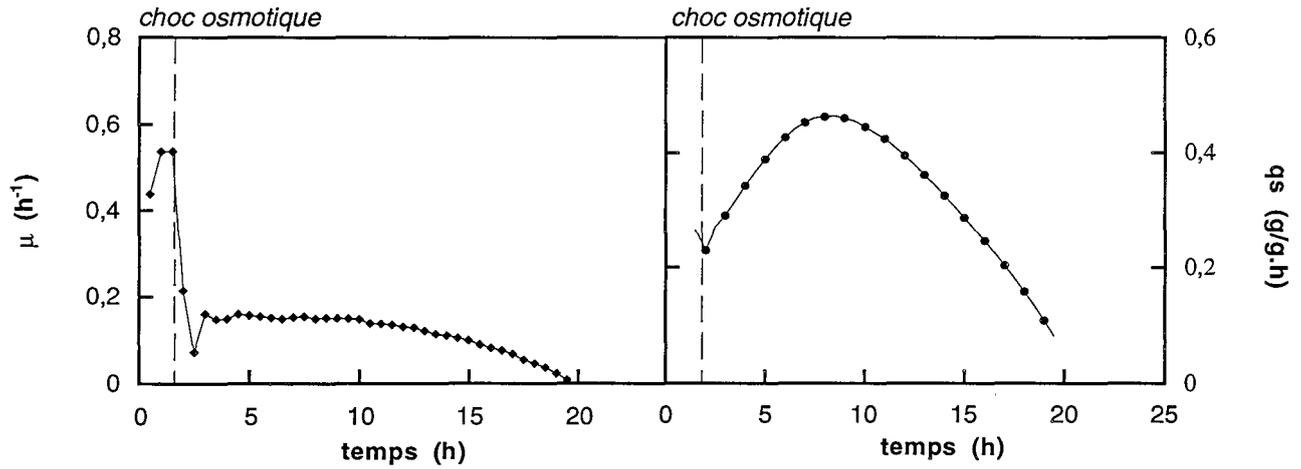


Figure III.15 : Vitesses spécifiques de croissance (μ) et de consommation du glucose (q_s) à 2,7 Osm.

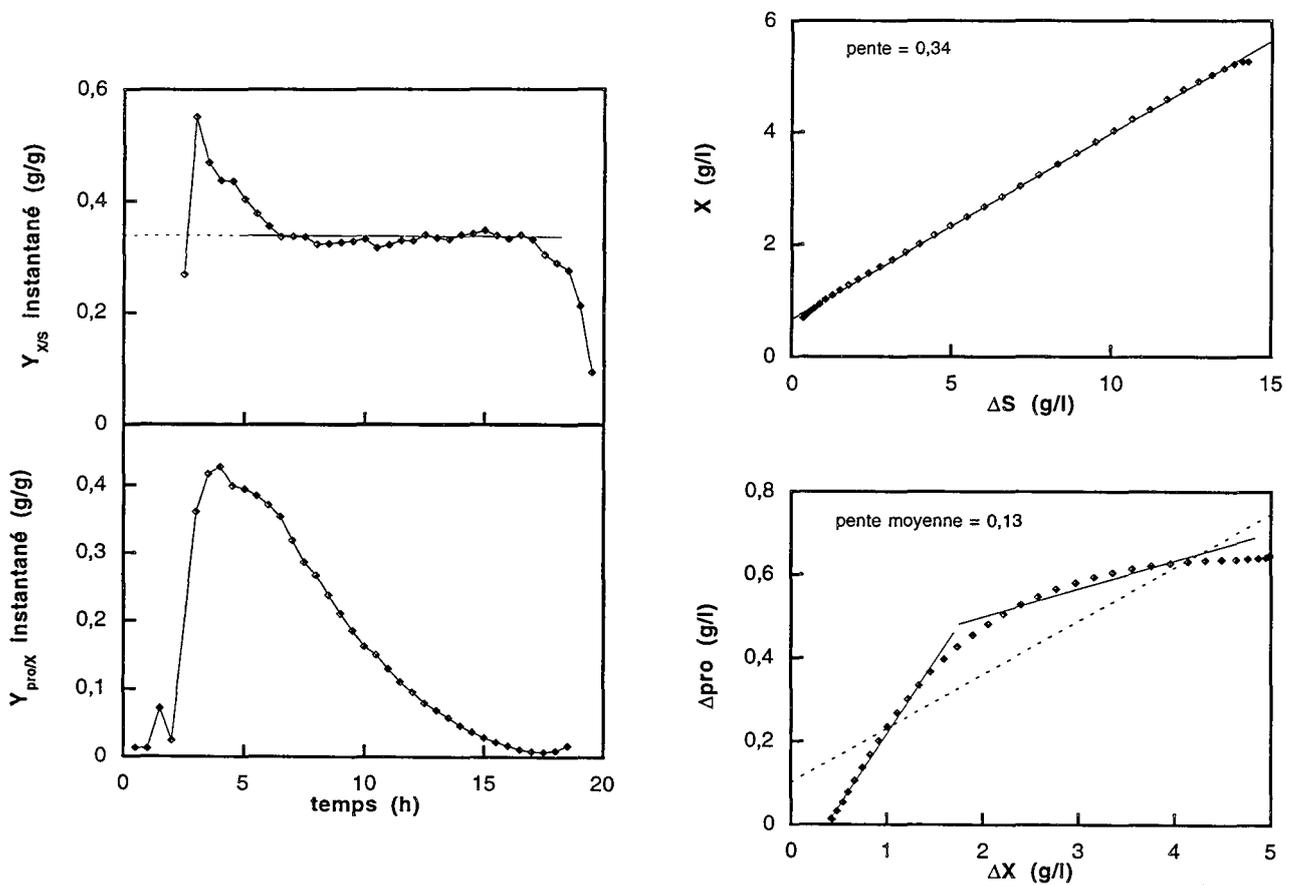


Figure III.16 : Rendement de croissance ($Y_{X/S}$) et coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{pro/X}$), instantané et cumulé, sur la phase de croissance de la culture à 2,7 Osm.

Ces observations se reportent sur le bilan carboné. Par rapport au carbone consommé, le carbone produit sous forme de biomasse représente 44%. 10% de cette quantité provient de la synthèse de proline, soit 4,4 % du carbone total produit. N'ayant d'autre part détecté aucun autre métabolite, nous pouvons supposer que le carbone manquant provient du gaz carbonique, soit une participation de 56%.

III.1.5. Culture discontinuée à 2,7 Osm en milieu BMCG

Cette culture est réalisée dans les mêmes conditions que celle à 2,2 Osm avec une concentration initiale en glucose de 14 g/l. Après 2 heures, 90 grammes de NaCl sont ajoutés stérilement induisant une pression osmotique finale mesurée de 2,7 Osm.

Les données expérimentales concernant biomasse, glucose et oxygène dissous sont tout à fait comparables à celle de la culture à 2,2 Osm, de même que les niveaux intracellulaires en glutamate, proline et tréhalose (figure III.14) :

- une quantité maximale de 4,85 g/l de biomasse produite pour 14 g/l de glucose, dont la consommation totale du glucose est atteinte en 18 heures.
- un pic de glutamate jusqu'à 1000 $\mu\text{mol/gMS}$ immédiatement après le choc osmotique, avant l'augmentation de la proline, avant de retrouver un niveau de 400 à 500 $\mu\text{mol/gMS}$.
- la proline augmente fortement après le choc pour atteindre un plateau à environ 1800 $\mu\text{mol/gMS}$.
- le tréhalose augmente en même temps que le glutamate jusqu'à 300 $\mu\text{mol/gMS}$ puis redescend à environ 50 $\mu\text{mol/gMS}$.

Les vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose montrent à nouveau 2 phases distinctes. La phase de culture à 2,7 Osm ne présente pas réellement de μ_{max} , mais une période assez longue (de 2 à 10 heures) de croissance linéaire à vitesse de croissance constante $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Cette vitesse diminue ensuite lentement jusqu'à 18 heures. La consommation du glucose montre quant à elle un maximum de $0,45 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ vers 8 heures de culture (figure III.15).

Le rendement de croissance $Y_{X/S}$ cumulé est évalué à $0,34 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, soit une chute de presque 50% par rapport à la culture à pression osmotique normale. Le coefficient $Y_{\text{pro}/X}$ présente une valeur moyenne de 0,13 g/g, mais décrit en réalité deux phases avec des valeurs de 0,36 g/g et 0,07 g/g (figure III.16).

Le bilan carboné est considéré sur la phase de croissance (0 à 18 heures). Par rapport au carbone consommé sous forme de glucose, la biomasse représente 40 %, dont 10% pour la proline, alors que le glutamate et le tréhalose sont négligeables. A nouveau, le carbone manquant est attribué au CO_2 conduisant à une valeur de 60%, légèrement supérieure aux précédentes.

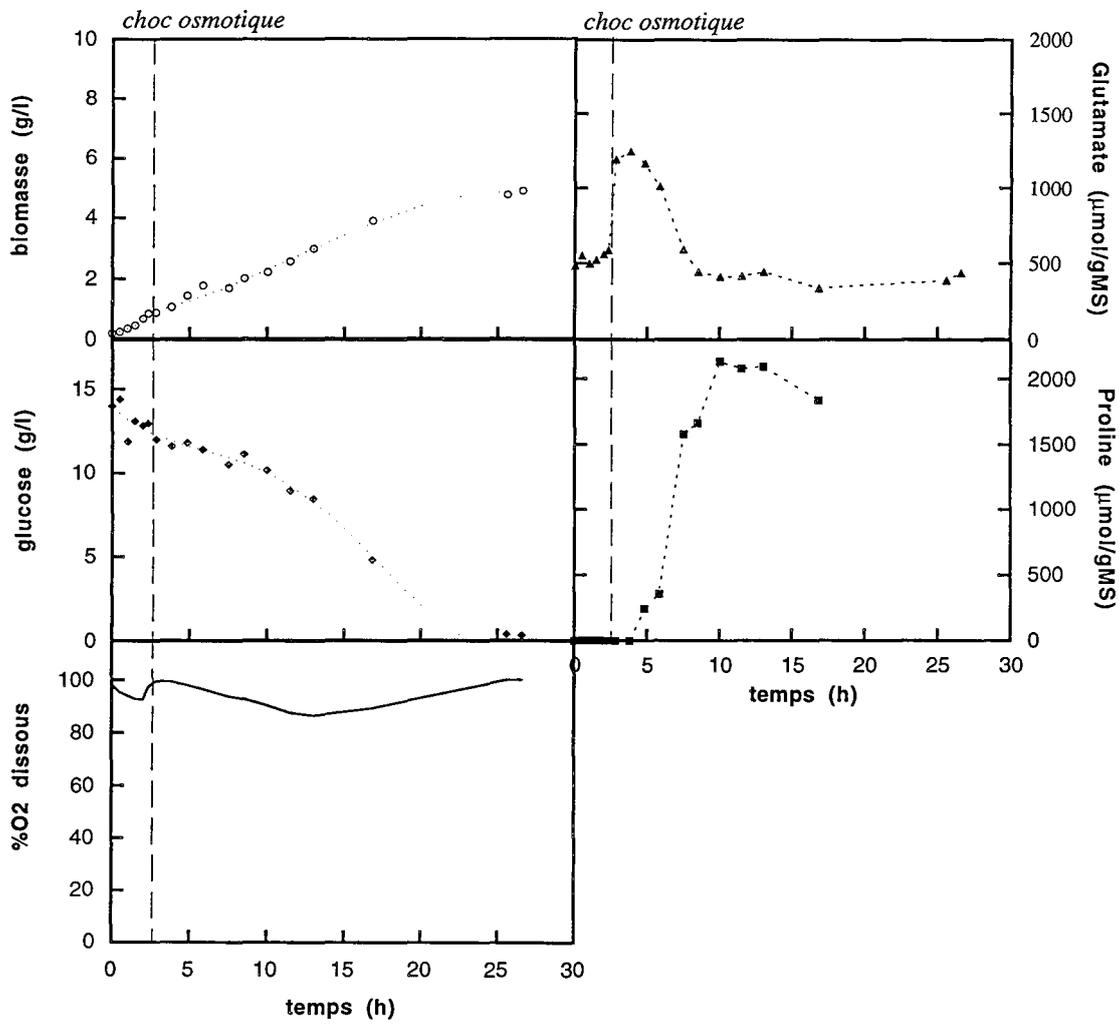


Figure III.17 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture discontinue à 3,0 Osm.

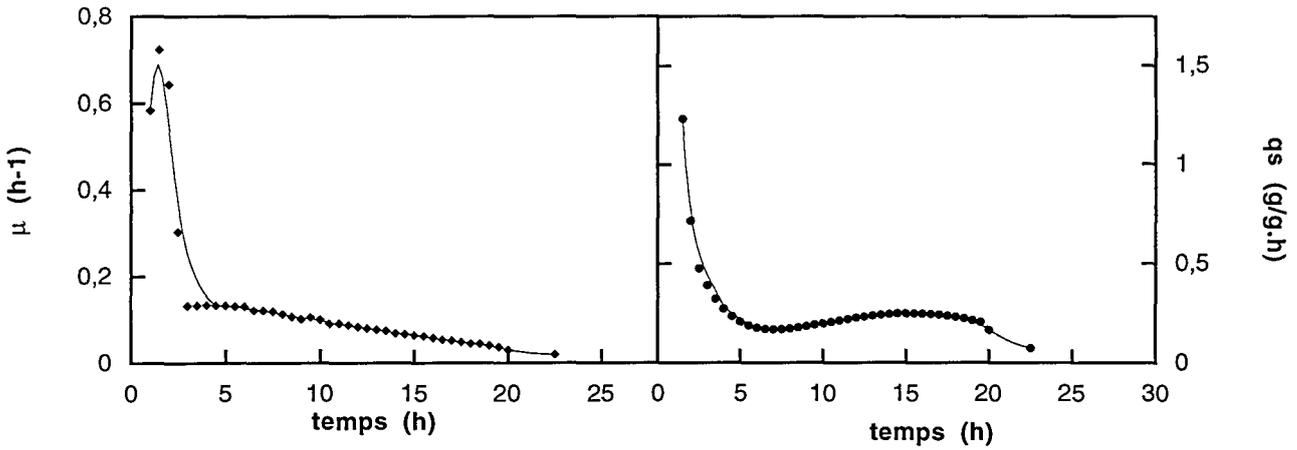


Figure III.18 : Vitesses spécifiques de croissance (μ) et de consommation du glucose (q_s) à 3,0 Osm.

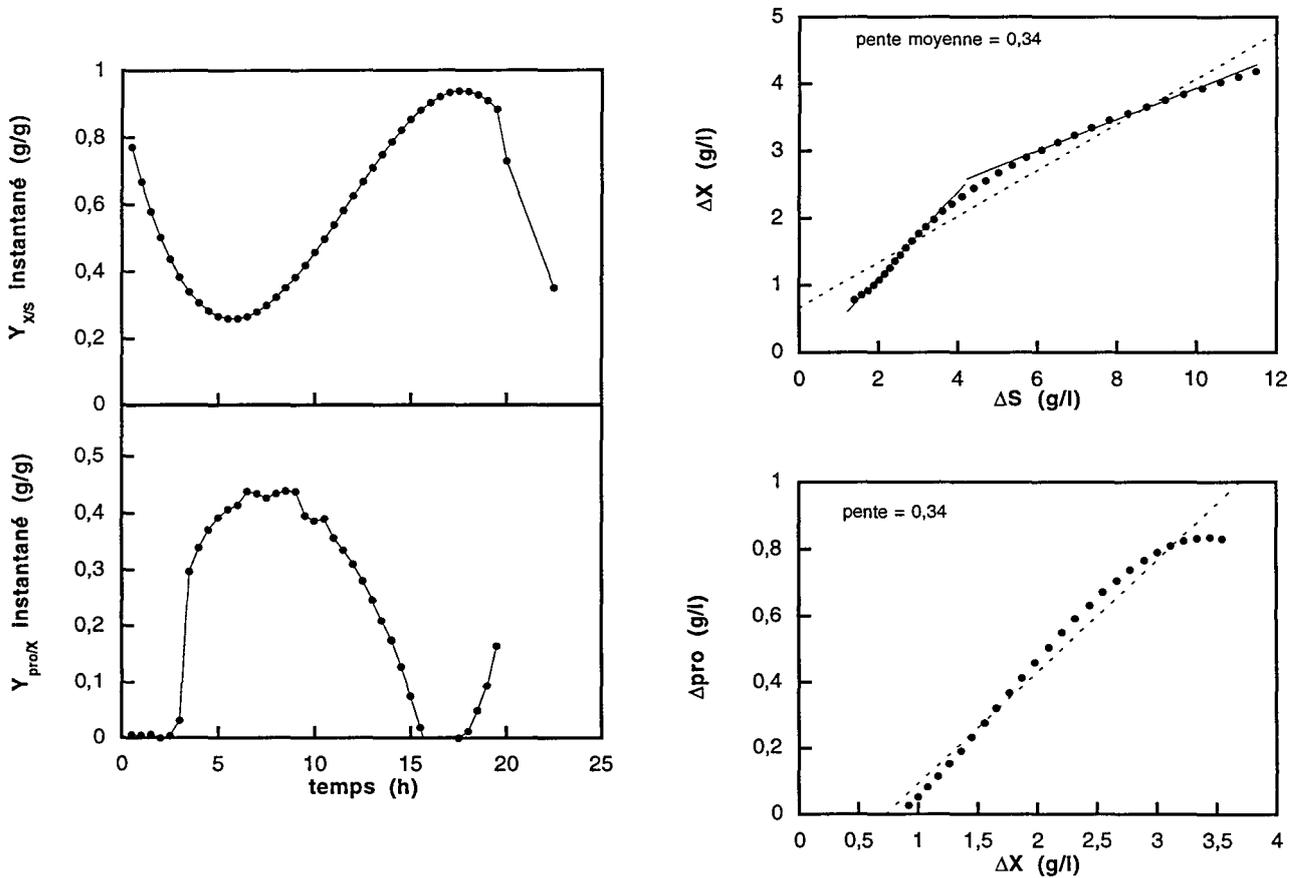


Figure III.19 : Rendement de croissance ($Y_{X/S}$) et coefficient de production de proline par rapport à la biomasse ($Y_{pro/X}$), instantané et cumulé, sur la phase de croissance de la culture à 3,0 Osm.

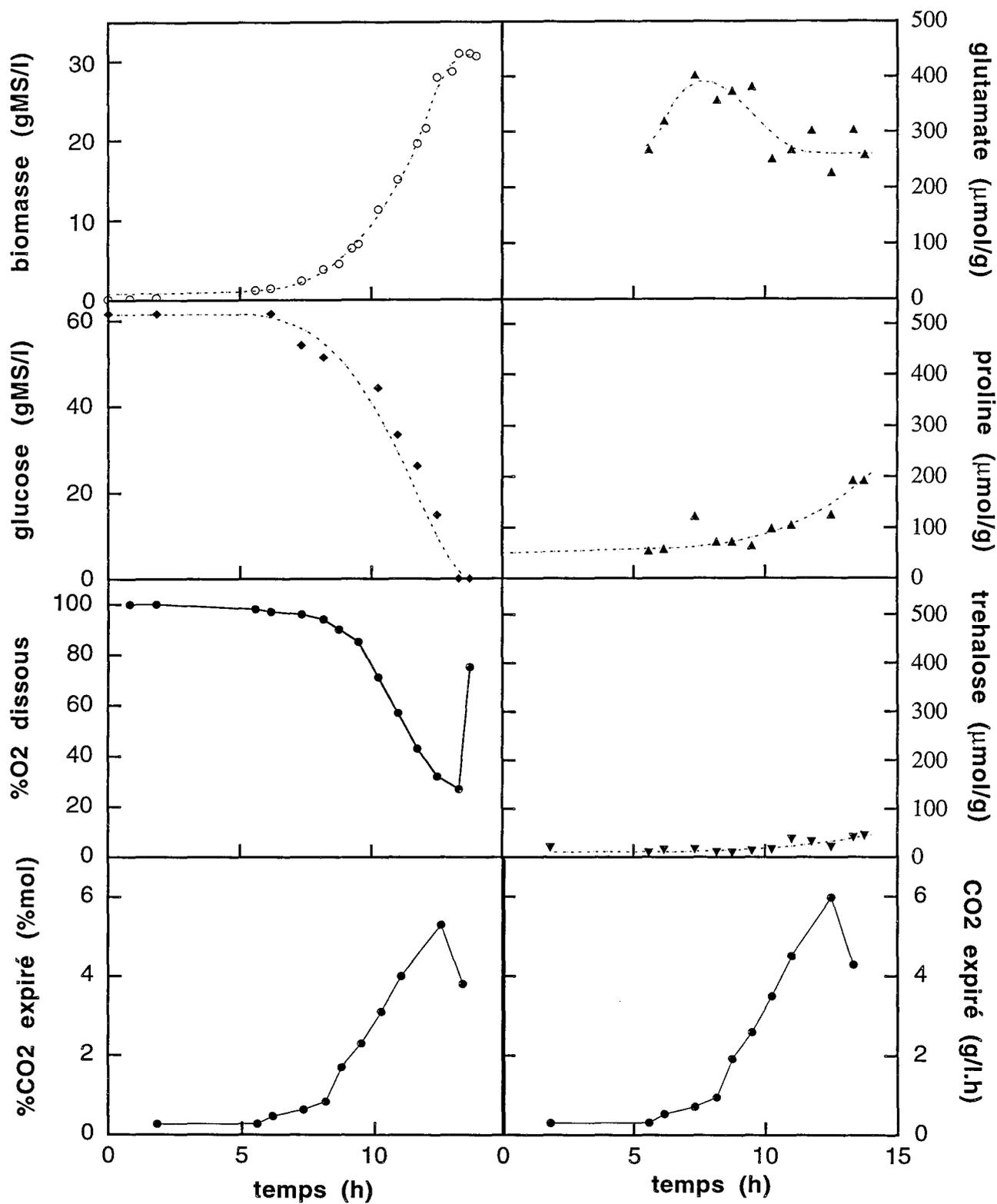


Figure III.20 : Cinétiques macroscopiques et intracellulaires de la culture discontinue en milieu BMM (1,0 Osm).

III.1.6. Culture discontinue à 3,0 Osm en milieu BMCG

Cette culture a lieu dans les mêmes conditions que les deux précédentes, avec un ensemencement de 0,2 g/l de biomasse pour 14 g/l de glucose. Le choc osmotique est réalisé après 2,25 heures de culture en ajoutant 115 g/l de NaCl. La pression osmotique obtenue est de 3,0 Osm.

Les données cinétiques sont entièrement comparables à celles des deux autres cultures, avec :

- une croissance qui s'étend sur 25 heures (bien que le manque de mesure entre 17 et 25 heures laisse une incertitude). La production de biomasse s'élève à 4,6 g/l pour 13,6 g/l de glucose consommé (figure III.17).
- un pic de glutamate atteignant 1200 $\mu\text{mol/gMS}$, avec retour à la "normale" (400 à 500 $\mu\text{mol/gMS}$), ainsi qu'un plateau de proline élevé (2100 $\mu\text{mol/gMS}$) (figure III.17).
- une vitesse spécifique de croissance à deux phases, avec une diminution lente de 0,1 h^{-1} à 0 pour la phase à 3,0 Osm (figure III.18).
- une vitesse spécifique de consommation du glucose quasi-constante de 0,2 à 0,25 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (figure III.18).
- un rendement de conversion global $Y_{X/S}$ quasiment constant avec une valeur de 0,34 g/g, valeur identique à celle de la culture à 2,7 Osm. Il semble que l'on atteigne une valeur minimale du $Y_{X/S}$. Le $Y_{\text{pro}/X}$ est également trouvé constant à 0,34 g/g (figure III.19).
- Un bilan carboné par rapport au carbone-glucose consommé, qui montre une participation de 38% pour la biomasse, dont 12 % pour la proline, soit à nouveau 4,5% du carbone total pour la proline. Le complément attribué au CO_2 représenterait donc 62%.

III.1.7. Culture discontinue en milieu BMM

Le milieu BMM est un milieu BMCG optimisé pour la production de glutamate (voir Chapitre 2). Le milieu BMM possède, entre autres, des concentrations en sels plus fortes au niveau du BMCG-base (sulfate d'ammonium, hydrogénophosphate de sodium et de potassium, chlorure de sodium...) et de la bétaine. L'osmolarité de ce milieu est ainsi amenée à 1 Osm. La culture a été effectuée en réacteur de 20 litres contenant 8 litres de milieu. La concentration initiale en glucose est de 62 g/l. Le réacteur est ensemencé par 500 ml d'une préculture réalisée en milieu BMCG, conduisant à une DO initiale de 0,4 (soit 0,25 gMS/l). La température est réglée à 34°C ; le pH à 7,3 grâce à de l'ammoniaque 12 N ; l'agitation est maintenue à 550 rpm, avec une aération de 1 vvm.

L'évolution des concentrations en biomasse et en glucose, ainsi que le pourcentage d' O_2 dissous et la proportion molaire de CO_2 dans les gaz de sortie sont présentés sur la figure III.20. Les allures générales des cinétiques sont tout à fait comparables à celles de la culture à 0,45 Osm. On n'observe ici aucune perturbation due à un choc osmotique puisque l'ensemble de la fermentation se déroule à osmolarité élevée. En revanche, on notera une phase de latence très longue (jusqu'à 7

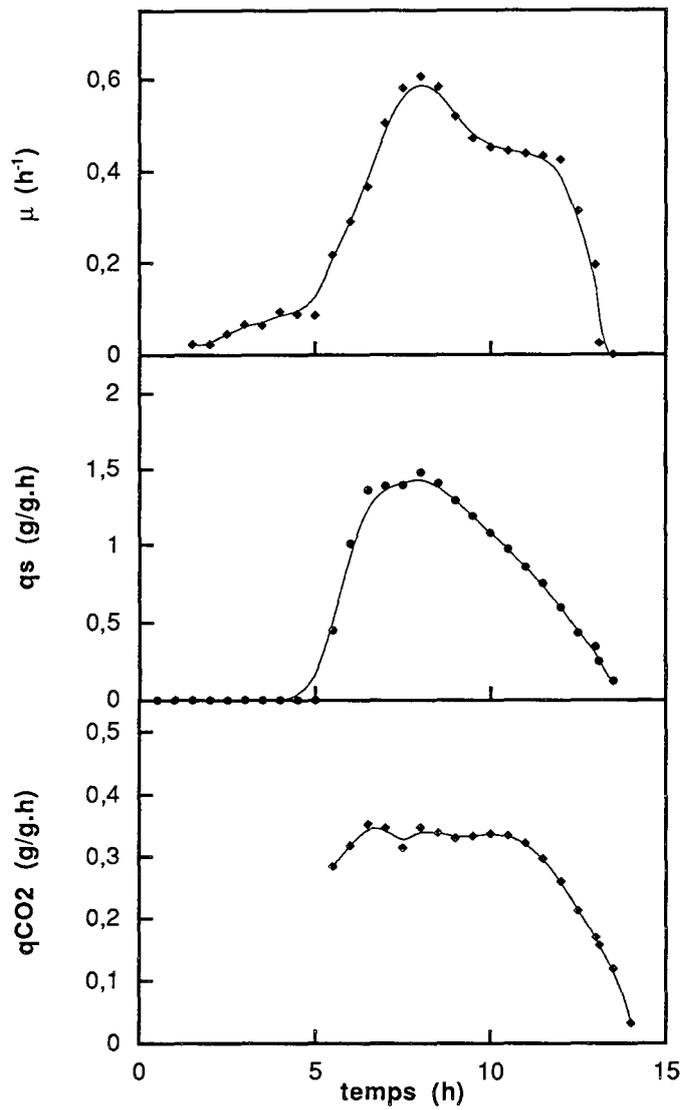


Figure III.21 : Vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation du glucose (q_s) et de production de gaz carbonique (q_{CO_2}) pour la culture discontinue en milieu BMM (1,0 Osm).

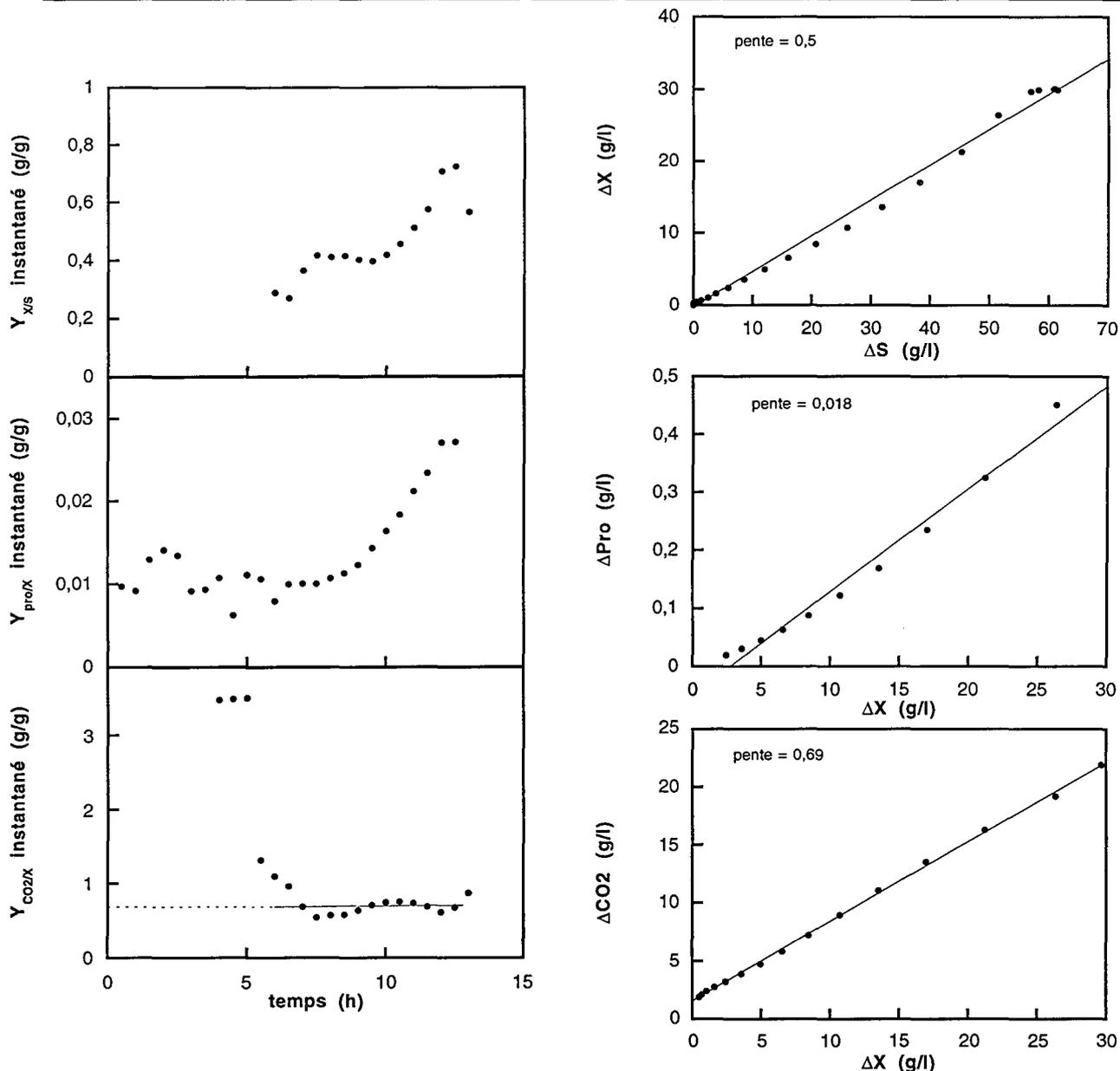


Figure III.22 : Rendement de croissance (μ), coefficient de production de proline par la biomasse ($Y_{pro/X}$), coefficient de production de gaz carbonique par rapport à la biomasse ($Y_{CO2/X}$) et par rapport au glucose ($Y_{CO2/S}$), instantanés et cumulés, pour la culture discontinue en milieu BMM (1,0 Osm).

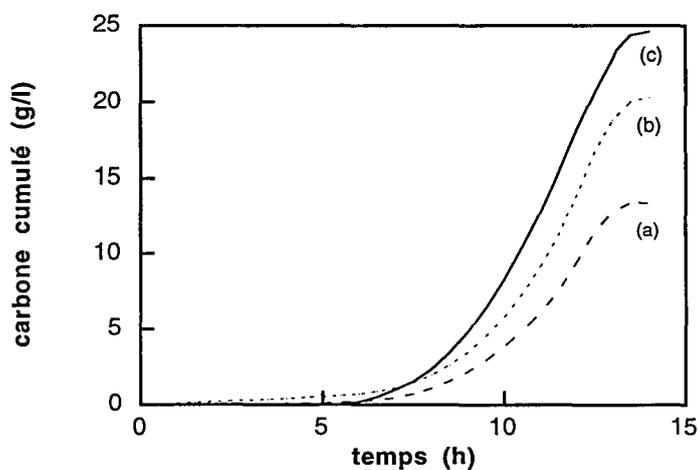


Figure III.23 : Recouvrement carboné pour la culture discontinue en milieu BMM. (a) biomasse, (b) biomasse+CO₂, (c) glucose.

Tableau III.1 : Récapitulatif de l'ensemble des paramètres cinétiques obtenus lors des études de la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en cultures discontinues sur milieu BMCG-glucose (excepté pour la dernière ligne) à différentes osmolarités. Les chiffres entre parenthèses sont le résultat d'un calcul à partir des autres valeurs, et non de l'interprétation des courbes. Le deuxième chiffre donné pour le niveau intracellulaire de glutamate correspond à la hauteur du pic observé pour cet acide aminé. (nd = non déterminé)

pression osmotique (Osm)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{CO2/X} (g/g)	Y _{CO2/S} (g/g)	Y _{Pro/X} (g/g)
0,45	0,70	0,60	0,70	0,40	0,007
1,5	0,60	0,41	1,1	0,48	0,17
2,2	0,30	0,38	nd	nd	0,20
2,7	0,15	0,34	nd	nd	0,36
3,0	0,10	0,34	nd	nd	0,34
1,0 *	0,60	0,50	0,75	(0,38)	0,018

pression osmotique (Osm)	Niveaux intracellulaires (μmol/gMS)			Recouvrement carboné		
	Glutamate	Proline	Trehalose	Biomasse	CO2	Proline
0,45	300	40	200	67 %	33 %	nd
1,5	300	800	200	44 %	56 %	nd
2,2	300 - 900	1000	400	44 %	(51,5 %)	(4,4 %)
2,7	400 - 1000	1800	300	40 %	(56 %)	(4 %)
3,0	400 - 1200	2100	nd	38 %	(57,5 %)	(4,5 %)
1,0 *	300	50	20	66 %	34 %	nd

* culture discontinue sur milieu BMM-glucose.

heures de culture). Les cellules passent en effet d'un milieu BMCG épuisé à un milieu BMM frais et d'osmolarité élevée, ce qui entraîne un allongement de la phase d'adaptation par rapport aux cultures précédentes. La fin de la phase de croissance est atteinte vers 14 heures avec l'épuisement du glucose. Les vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose ont toutes deux un maximum à 7,5 heures, avec respectivement $0,6 \text{ h}^{-1}$ et $1,5 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (figure III.21). Le calcul du rendement de synthèse de biomasse par rapport au glucose montre une valeur constante de $0,50 \text{ .g}^{-1}$ sur la phase de croissance. Le coefficient de production de CO_2 par la biomasse vaut quant à lui $0,75 \text{ g.g}^{-1} \text{ MS}$ (figure III.22).

Le dosage des métabolites intracellulaires révèle la présence de glutamate, proline et tréhalose (figure III.20). Le niveau de glutamate passe de $250 \mu\text{mol/g MS}$ pendant la phase de latence à 400 au début de la croissance, puis redescend à son niveau initial vers 10 heures de culture. Le niveau de proline reste faible à $50 \mu\text{mol/g MS}$ jusqu'à environ 10 heures, puis augmente de manière continue pour atteindre $200 \mu\text{mol/g MS}$ en fin de culture. Quant au tréhalose, son niveau très faible de départ ($10 \mu\text{mol/g MS}$) augmente parallèlement à celui de la proline pour finir à $40 \mu\text{mol/g MS}$.

Comme pour la culture à $0,45 \text{ Osm}$, le calcul du recouvrement carboné s'effectue uniquement sur la production de biomasse et de CO_2 et sur la consommation du glucose, conduisant à une valeur tout à fait acceptable de 82% (figure III.23). De même, on retrouve une participation de 66% pour la biomasse et 34% pour le CO_2 .

III.1.8. Conclusion - Discussion sur les cultures discontinues

L'ensemble des résultats obtenus lors de ces études cinétiques est présenté dans le tableau III.1. L'influence de l'augmentation de la pression osmotique du milieu s'exerce au niveau macroscopique (croissance, production de gaz carbonique) et au niveau intracellulaire (synthèse de proline).

L'analyse des résultats du point de vue macroscopique montre donc une diminution de la vitesse spécifique de croissance, de $0,7$ à $0,1 \text{ h}^{-1}$. Parallèlement, on observe une diminution d'environ 50% du rendement de croissance, $Y_{X/S}$, qui semble se stabiliser à une valeur minimale de $0,34 \text{ g/g}$, ainsi qu'une augmentation du rendement de production de CO_2 , $Y_{\text{CO}_2/S}$ (résultats des deux premières cultures). Cette répartition du glucose est confirmée par les bilans carbonés, où l'on voit une chute de la part de la biomasse, d'abord brutale (de 67 à 44% pour passer de $0,45$ à $1,5 \text{ Osm}$), puis plus lente (de 44 à 38% pour passer de $1,5$ à $3,0 \text{ Osm}$). En revanche, la part calculée ou attribuée au CO_2 augmente en proportion inverse, passant brutalement de 33 à 56% , puis lentement de 56 à 62% . La conséquence logique de ces observations est une forte augmentation du coefficient de production de CO_2 par la biomasse, passant de $0,7$ à $1,1 \text{ g/g}$ entre $0,45$ et $1,5 \text{ Osm}$.

Du point de vue intracellulaire, on constate une augmentation durable du niveau de proline avec la pression osmotique, passant de $50 \mu\text{mol/g}$ dans les conditions normales à $2100 \mu\text{mol/g}$ à $3,0$

Osm (soit un facteur 42). A partir de 2,2 Osm, on observe également un pic transitoire de glutamate, qui apparaît immédiatement après le choc osmotique et précède l'augmentation de proline. L'amplitude du pic dépend de l'osmolarité, allant de 900 à 1200 $\mu\text{mol/g}$, ce qui représente 3 à 4 fois le niveau intracellulaire normal. Enfin, malgré un niveau intracellulaire assez important et quelque peu variable, le tréhalose ne semble pas intervenir dans la réponse à un stress hyperosmotique.

Deux observations permettent d'affirmer que les phénomènes décrits ci-dessus sont dus à l'augmentation de la pression osmotique. Tout d'abord, le coefficient de production de proline par la biomasse n'est pas constant sur la phase de croissance. En particulier aux fortes osmolarités, le $Y_{\text{pro/X}}$ montre une première phase avec une valeur élevée, puis une deuxième avec une valeur plus faible. Ceci signifie que la production de proline n'est pas totalement associée à la croissance, et qu'elle dépend donc d'un autre paramètre que l'on peut supposer être l'augmentation de la pression osmotique. Le deuxième indice est apporté par la culture réalisée en milieu BMM. Malgré une osmolarité de 1,0 Osm, cette culture montre en effet des caractéristiques cinétiques proches de celles de la culture à 0,45 Osm, aussi bien au niveau de la vitesse de croissance, que des rendements, du bilan carboné et des métabolites intracellulaires. La présence dans ce milieu de bétaïne, un composé osmoprotecteur qui pénètre dans la cellule, fait disparaître ou atténue fortement tous les phénomènes cités.

Des études précédentes (Guillouet, 1996) proposent un mécanisme de réponse à l'augmentation de l'osmolarité du milieu, décomposé en plusieurs étapes. D'abord une diminution du volume cellulaire par simple phénomène d'osmose (fuite d'eau), volume qui tend à retrouver sa valeur initiale après une période dépendant de l'amplitude du choc. Puis une accumulation rapide et transitoire d'ions sodium (cas de chocs réalisés au chlorure de sodium) et enfin, l'accumulation durable de proline intracellulaire. Ces données sont tout à fait en accord avec nos résultats.

Nous proposons de plus que la réaction à un stress hyperosmotique passe par une modification plus large du métabolisme cellulaire, avec une réorientation du glucose consommé, non seulement vers la synthèse de proline au détriment de celle de la biomasse, mais également vers un métabolisme énergétique plus intense (glucose \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{énergie}$) reflété par l'augmentation de la production de gaz carbonique. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour déterminer l'origine du CO_2 . Nous proposons enfin que le pic de glutamate constitue - au même titre que la diminution de volume et l'entrée des sels proposées par Guillouet - un mécanisme de première urgence pour lutter contre la pression osmotique, apparaissant au-delà de 2,2 Osm lorsque les systèmes précités ne sont plus suffisants ou risquent d'être toxiques. On peut ainsi supposer que cette augmentation du glutamate intracellulaire est un des facteurs nécessaires, mais non suffisant, qui permet l'entrée en phase de croissance rapide. Le glutamate est ensuite remplacé par la proline dans son rôle osmoprotecteur.

Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer l'accumulation de proline plutôt que celle de glutamate, bien que la synthèse de proline soit énergétiquement plus coûteuse pour la cellule que celle du glutamate (1 ATP et 2 NADPH en plus). Tout d'abord il a été décrit un effet rétroactif inhibiteur du glutamate sur sa propre synthèse via la glutamate deshydrogénase. L'accumulation d'une forte quantité de glutamate semble donc impossible. En second lieu, le glutamate est une molécule chargée dont l'accumulation pourrait augmenter la force ionique jusqu'à devenir toxique pour la croissance ($pK_{\alpha\text{-COOH}} = 2,19$; $pK_{\alpha\text{-NH}_3^+} = 9,67$; $pK_{\gamma\text{-COOH}} = 4,25$; $pI = 3,22$; soit une charge globale négative du glutamate pour un pH intracellulaire d'environ 6,8). La synthèse de proline, résout simultanément ces deux problèmes. En utilisant le glutamate, elle évite une éventuelle inhibition et ne provoque pas d'augmentation de charge ionique puisque c'est une molécule globalement neutre dans les conditions expérimentales ($pK_{\alpha\text{-COOH}} = 1,99$; $pK_{\alpha\text{-NH}_3^+} = 10,60$; $pI = 6,30$).

D'après les études de Guillouet (1996), la synthèse de proline montre une saturation pour des pressions osmotiques de 2 Osm et plus, ce qui peut expliquer le pic de glutamate. A très forte pression osmotique, le flux carboné en direction de la proline est très important et saturant. Il y a donc accumulation de glutamate. Or la quantité de proline intracellulaire augmentant, la différence entre pression osmotique interne et externe diminue, et le flux vers le glutamate diminue. Comme la synthèse de proline continue, le pic de glutamate se résorbe.

Le niveau intracellulaire de tréhalose n'a aucune relation avec l'osmolarité du milieu, mais plutôt avec la vitesse spécifique de consommation du glucose. Le tréhalose ne serait donc pas un composé osmorégulateur, mais un composé de réserve (Wojcik, 1992). Son accumulation résulterait d'une déviation du flux carboné suite à la forte augmentation du flux de glucose entrant dans la cellule que les voies du métabolisme, en particulier la glycolyse, ne pourraient assimiler. Bien que nos données confirment que le pic de tréhalose n'est apparemment pas lié à l'osmolarité (puisque son amplitude est quasi-constante), le pic ne semble pas en phase avec l'augmentation de la consommation du glucose, tout du moins pour la culture à 2,7 Osm. En revanche, la résorption du pic de tréhalose peut s'expliquer logiquement par une incorporation plus importante dans les parois (dont il est un précurseur de synthèse) pour les besoins de la multiplication cellulaire et du renforcement de structure pour lutter contre la pression osmotique. Le tréhalose est en effet connu pour son rôle protecteur vis-à-vis de la déshydratation, elle-même liée à l'osmolarité. Le rôle du tréhalose dans la lutte contre l'hyperosmolarité reste donc ambigu.

Comme nous l'avons décrit, *Corynebacterium glutamicum* n'excrète pas naturellement le glutamate. Certaines conditions de culture, comme par exemple une limitation en biotine, permettent cependant d'obtenir une très forte production de cet acide aminé. Le procédé Orsan consiste en une culture semi-continue dans laquelle la production est déclenchée par l'ajout de surfactants. Dans les deux cas, les mécanismes biochimiques conduisant à la production du glutamate ne sont pas encore

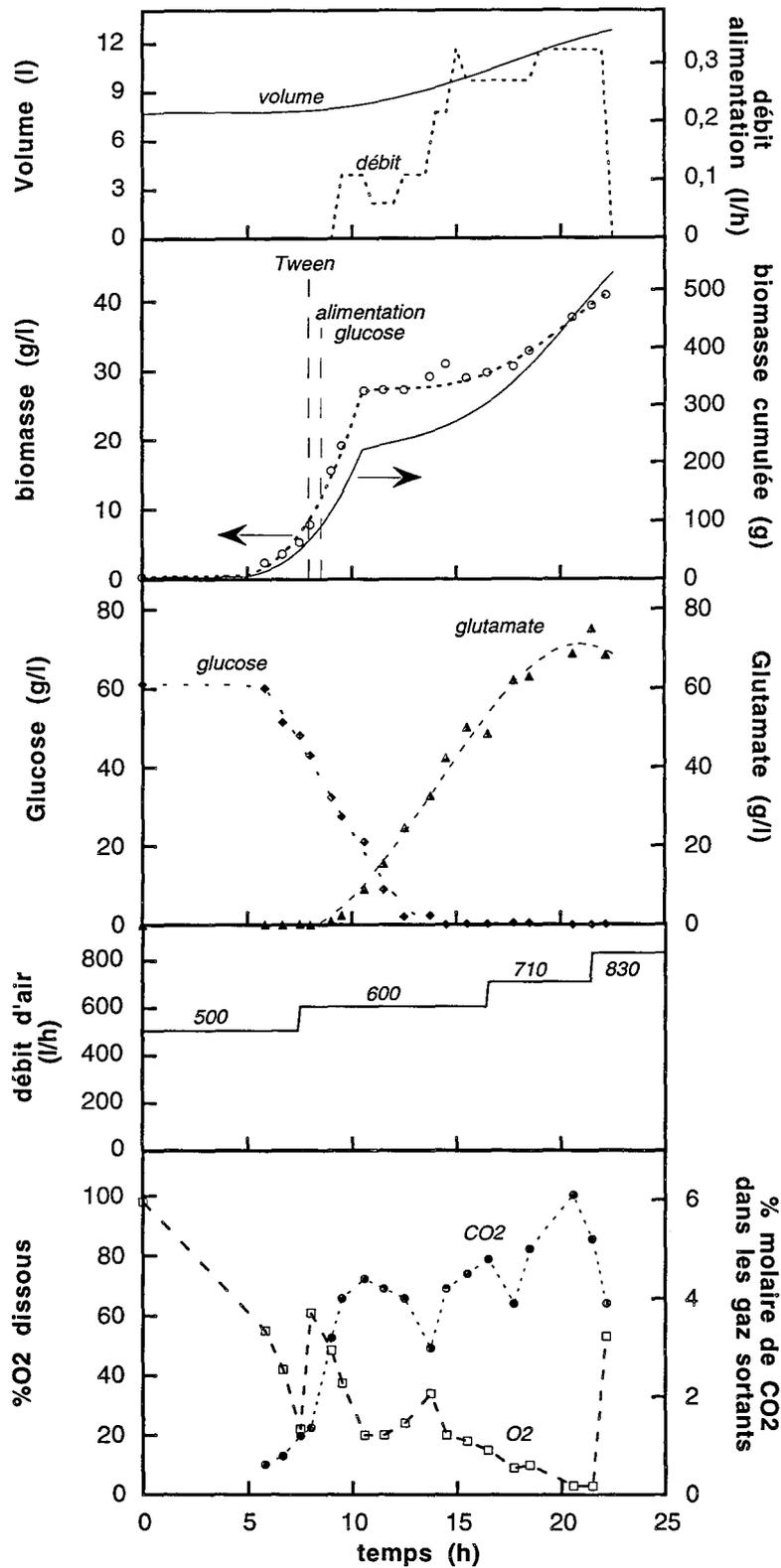


Figure III.24 : Cinétiques macroscopiques de la culture semi-continue de *Corynebacterium glutamicum* (milieu BMM, réacteur de 20 litres).

bien compris. Dans le cadre du GDR Orsan-CNRS, un procédé voisin de celui utilisé industriellement a été développé au laboratoire (Debay, thèse en cours). Nous présentons ici une culture réalisée suivant ce procédé, afin d'étudier l'effet de l'ajout des surfactants sur les cinétiques de culture.

III.2. Cultures en mode semi-continu

III.2.1. Etudes cinétiques de la production de glutamate

La culture est réalisée en réacteur de 20 litres contenant un volume initial de 7,7 litres de milieu BMM avec 61 g/l de glucose. Les conditions de culture sont identiques à celles de la culture discontinue en milieu BMM : 34°C, pH 7,3 régulé à l'ammoniaque 12 N, agitation de 550 rpm et aération initiale de 1 vvm. Le réacteur estensemencé avec une préculture de 500 ml (milieu BMCG) conduisant à une DO initiale de 0,4. Lorsque la DO a atteint la valeur de 20 (soit après 8,3 heures de culture), 200 ml de Tween 40 stériles ont été ajoutés dans le réacteur, suivis, une heure après, par la mise en place de l'alimentation en glucose (sirop stérile à 750 g/l). Le débit initial de 0,1 l/h de l'alimentation est ensuite ajusté de manière à maintenir une concentration en glucose dans le réacteur inférieure à 3 g/l. Une estimation de la concentration de glucose dans le réacteur est donnée par des bandelettes médicales servant à mesurer la glycémie. Le résultat obtenu en moins de 5 minutes permet d'ajuster manuellement le débit d'alimentation pour piloter la concentration en glucose.

La figure III.24 reproduit l'évolution du volume de milieu dans le réacteur, du débit d'alimentation, de la concentration en biomasse, en glucose et en glutamate, le pourcentage d'oxygène dissous ainsi que le pourcentage de CO₂ dans les gaz de sortie du fermenteur. La fin de la culture est atteinte après 22,5 heures par épuisement du glucose, avec un volume final de 12,6 litres. Globalement, la culture peut être divisée en 4 phases :

- une phase de latence de 6 heures environ,
- une phase de forte croissance jusqu'à 10 heures de culture et pendant laquelle on observe une forte consommation de glucose. La concentration en biomasse ne semble pas affectée par l'ajout du Tween, ni par le passage au mode semi-continu. En revanche, l'excrétion du glutamate débute peu après l'ajout du Tween.
- une phase où l'évolution de la concentration de biomasse ralentit jusqu'à la quinzième heure, correspondant à une faible croissance. Cette phase pendant laquelle il y a toujours consommation de glucose, pourrait être due à la forte production de glutamate.
- une phase de reprise de croissance jusqu'à la fin de la culture, due à la dilution de l'effet Tween. Elle correspond à la zone où la concentration en glucose est inférieure à 3 g/l et où la production de glutamate diminue. Finalement, 500 grammes de biomasse et 880 grammes de glutamate ont été produits (respectivement 40 g/l et 70 g/l), pour un ajout de 1800 grammes de glucose, soit au total 2280 grammes de glucose consommés.

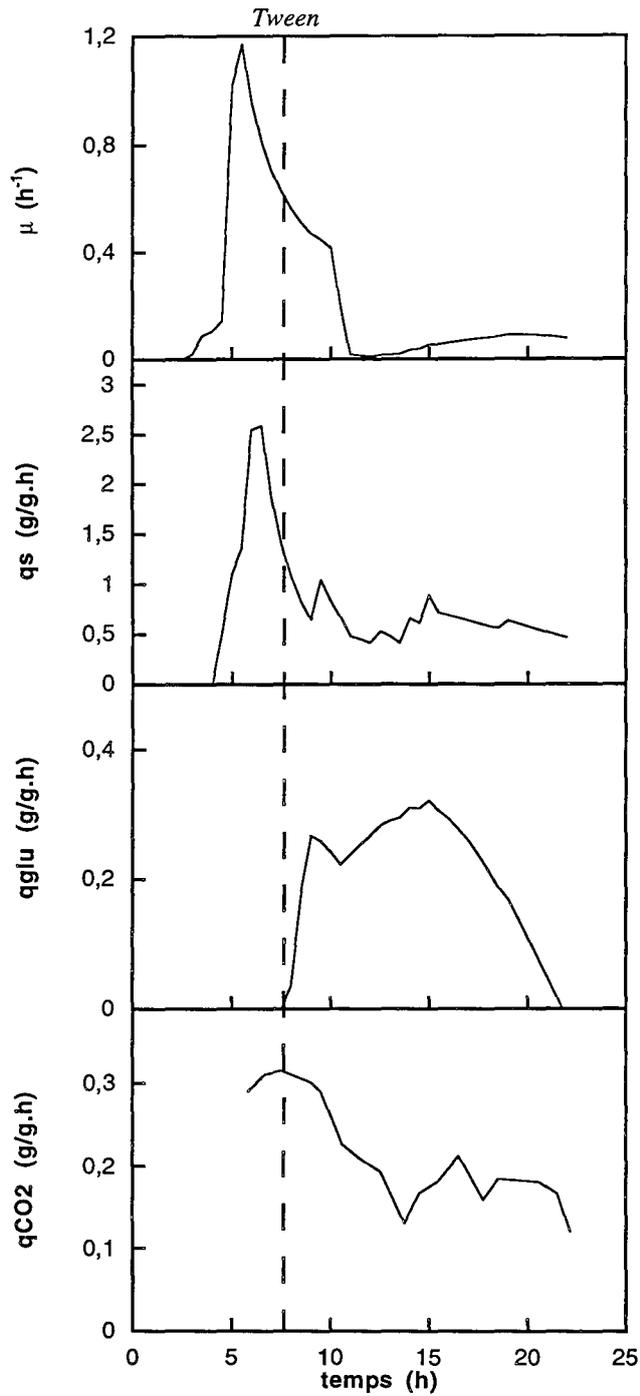


Figure III.25 : Vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation du glucose (q_s), de production de glutamate (q_{glu}) et de production de gaz carbonique en culture semi-continue.

Les évolutions de l'oxygène dissous et du CO₂ produit montrent des profils opposés. On observe un certain nombre de perturbations dues à une augmentation du débit d'aération pour éviter une limitation en oxygène dans le fermenteur. Malgré cela, le pourcentage d'oxygène dissous devient critique à partir de 20 heures de cultures. Des travaux antérieurs ont montré que la production de glutamate est dépendante de l'oxygénation du milieu, et cette limitation en oxygène pourrait être un des facteurs marquant la fin de la phase de production.

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation du glucose, de production de glutamate et de gaz carbonique sont présentées sur la figure III.25. Les deux premières ainsi que celle du CO₂ ont un maximum vers 6 heures de culture, avec des valeurs de 1,1 h⁻¹, 2,5 g.g⁻¹.h⁻¹ et 0,3 g.g⁻¹.h⁻¹. Ces vitesses se stabilisent ensuite à des valeurs faibles pendant la phase de production de glutamate : la croissance à 0,1 h⁻¹, la consommation du glucose à 0,5 g.g⁻¹.h⁻¹ et la production de CO₂ à 0,17 g.g⁻¹.h⁻¹, témoignant d'un métabolisme ralenti, sauf pour la production de glutamate. Celle-ci montre deux maxima, l'un à 9 heures de culture avec 0,26 g.g⁻¹.h⁻¹ correspondant à la phase de croissance rapide, l'autre vers 15 heures de culture avec une valeur de 0,32 g.g⁻¹.h⁻¹ qui correspond à la phase de ralentissement de croissance.

Les coefficients de conversion montrent des comportements différents avant et après l'ajout du Tween, c'est à dire selon que la culture se trouve en croissance ou en production (figure III.26). Le rendement de croissance ($Y_{X/S}$) est quasiment constant jusqu'à 10 heures, égal à 0,5 g.g⁻¹, puis il chute progressivement jusqu'à 0,2 g.g⁻¹. En revanche, le coefficient de production de glutamate par rapport à la biomasse ($Y_{glu/X}$) ou au glucose ($Y_{glu/S}$), nul en phase de croissance, augmente très fortement en phase de production, avec un maximum de 2 g.g⁻¹ vers 18 heures de culture pour le premier, et 0,45 g/g vers 15 heures pour le second. Enfin, le coefficient de production de CO₂ par la biomasse ($Y_{CO_2/X}$) augmente de façon constante du début jusqu'à la fin de la culture où il atteint la valeur de 2 g.g⁻¹, alors que le coefficient de production de CO₂ par rapport au glucose ($Y_{CO_2/S}$) apparaît constant sur la phase de production avec une valeur de 0,4 g/g. Les rendements par rapport au substrat traduisent une transition de la production de biomasse vers celle de glutamate. Le coefficient $Y_{CO_2/X}$ montre deux phases, correspondant en fait à la croissance et à la production. On constate que la biomasse produit plus et plus vite du gaz carbonique en phase de production qu'en phase de croissance. Un pic est observé à 5 heures de culture, qui correspond à l'interruption de la phase de croissance rapide par l'ajout du Tween. Cet ajout semble avoir pour effet de perturber fortement et transitoirement le métabolisme en augmentant la production de CO₂ par la biomasse.

Du tréhalose et du lactate ont également été détectés dans le milieu de culture. Très faiblement produit dès la 7^{ème} heure de culture, le tréhalose atteint la concentration finale de 4 g/l, alors que celle du lactate reste inférieure à 1 g/l.

Avec une valeur de 93 %, le calcul du recouvrement carboné prend en compte les productions de biomasse, glutamate et CO₂ et la consommation du glucose (figure III.27). Ce résultat très

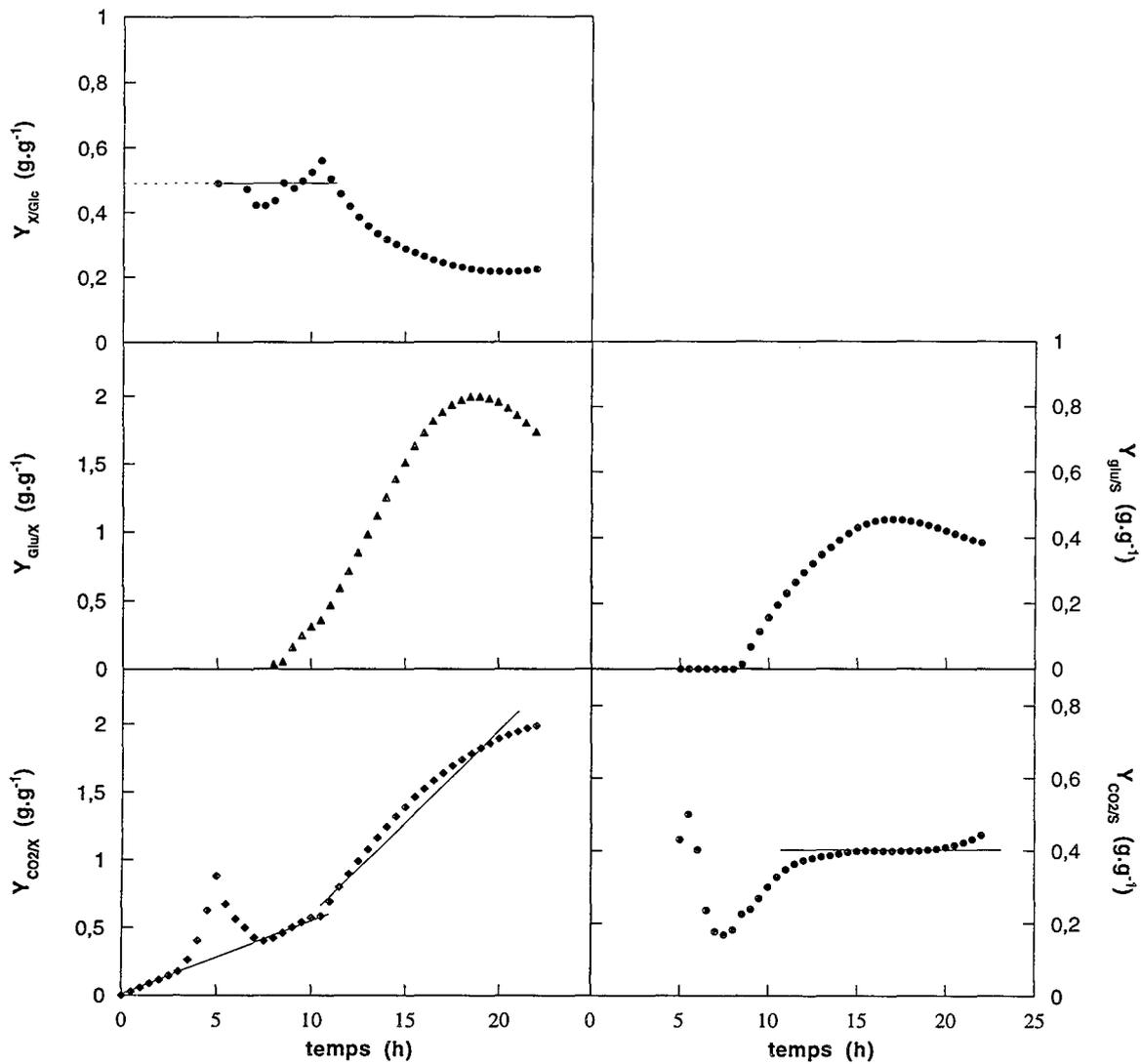


Figure III.26 : Evolution des différents coefficients cumulés de conversion ($Y_{X/S}$, $Y_{glu/X}$, $Y_{glu/S}$, $Y_{CO2/X}$ et $Y_{CO2/S}$) lors de la culture semi-continue.

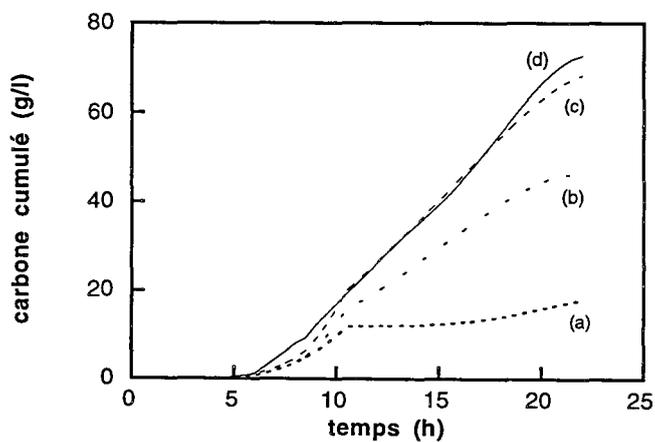


Figure III.27 : Recouvrement carboné pour la culture semi-continue.
 (a) biomasse, (b) biomasse+glutamate, (c) biomasse+glutamate+CO₂, (d) glucose.
 (même hypothèse sur la biomasse que pour les cultures discontinues)

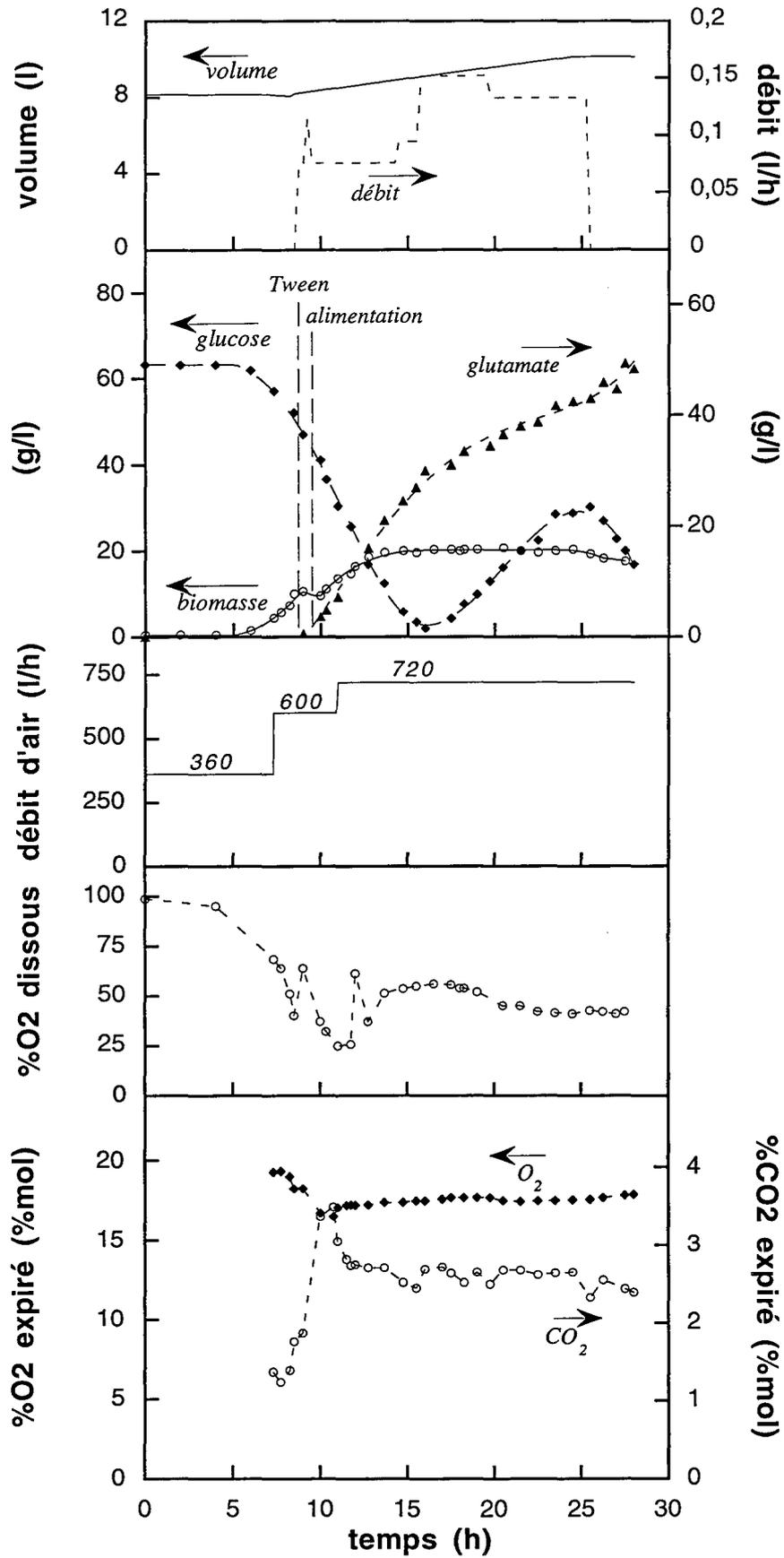


Figure III.28 : Cinétiques macroscopiques de la culture semi-continue "CHON".

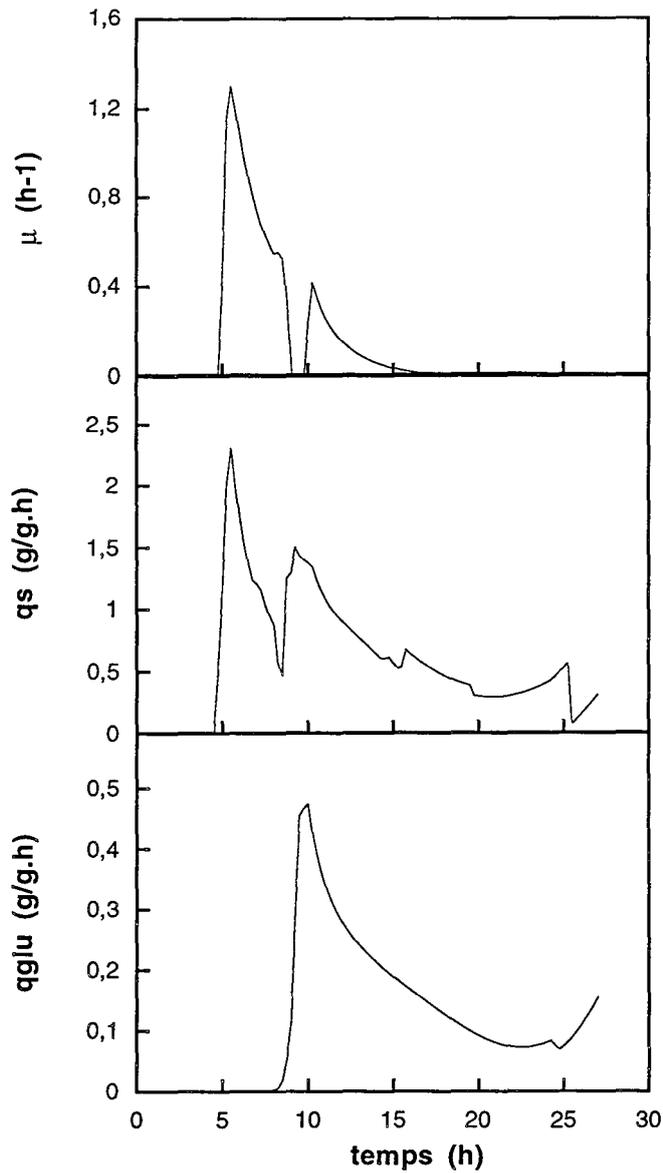


Figure III.29 : Vitesses spécifiques de croissance (μ), de consommation du glucose (q_s) et de production de glutamate (q_{glu}) en culture semi-continue "CHON".

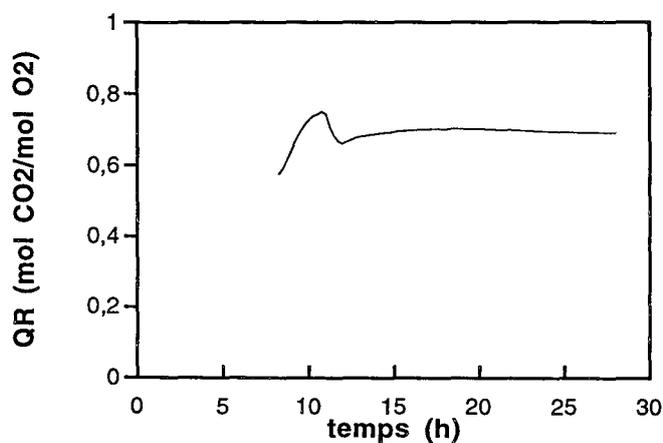


Figure III.30 : Quotient respiratoire sur la culture semi-continue "CHON".

acceptable indique bien que les autres métabolites détectés sont tout à fait négligeables. La biomasse participe pour 25% dans le recouvrement carboné total, le glutamate pour 42% et le CO₂, avec une part de 33%, montre un niveau identique à celui de la culture discontinuée en conditions normales d'osmolarité.

III.2.2. Etudes cinétiques et évolution de la composition élémentaire de la biomasse en culture semi-continue.

La composition élémentaire de la biomasse, c'est à dire la proportion de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène est généralement supposée constante pour une souche donnée au cours d'une culture. Cependant, de nombreuses études ont montré que cette composition varie avec l'avancement de la culture et les changements d'état physiologique (croissance, production...) Afin d'évaluer cette variation sur notre souche, nous avons réalisé une culture en réacteur de 20 litres en conditions de production de glutamate. Des échantillons ont été envoyés au Service Central d'Analyse du CNRS (Vernaison, France) pour le dosage des éléments CHON. Cette étude permettra également de confirmer ou de compléter les résultats de l'expérience précédente. Par rapport à cette dernière, le protocole suivi pour cette nouvelle expérience présente en plus une augmentation de température de 34°C à 38°C au moment de la mise en place de l'alimentation en glucose. Des études ont en effet montré que cette modification de température favorise la production du glutamate.

Remarque : pour différencier cette nouvelle culture de la précédente, nous la qualifierons de culture semi-continue "CHON".

III.2.2.1. Données cinétiques

Le réacteur contient un volume initial de milieu BMM de 8,2 litres, une concentration en glucose de 63 g/l et de biomasse de 0,4 g/l. L'agitation est maintenue à 500 rpm avec une aération initiale de 1 vvm. L'ajout de Tween est réalisé à 8,5 heures de culture (DO=19) et l'alimentation en glucose (765 g/l) est mise en place à 9,5 heures avec un débit initial de 70 ml/h.

La figure III.28 décrit les évolutions du volume, du débit d'alimentation du glucose, de la concentration en biomasse, glucose et glutamate, du pourcentage d'oxygène dissous, et les proportions de CO₂, mais aussi d'O₂, dans les gaz de sortie. Le volume final atteint 12,5 litres, avec une concentration finale de biomasse de 20 g/l et de glutamate de 50 g/l. La concentration en glucose chute en dessous de 3 g/l vers 16 heures de culture, puis augmente à nouveau à cause d'un débit d'alimentation mal ajusté. Le pourcentage d'oxygène dissous est maintenu au-dessus de 40%, ce qui témoigne d'une bonne oxygénation du réacteur. La proportion de CO₂ augmente fortement dans la phase de croissance, atteint un maximum à la mise en place de l'alimentation en glucose, puis se stabilise pendant la phase de production de glutamate.

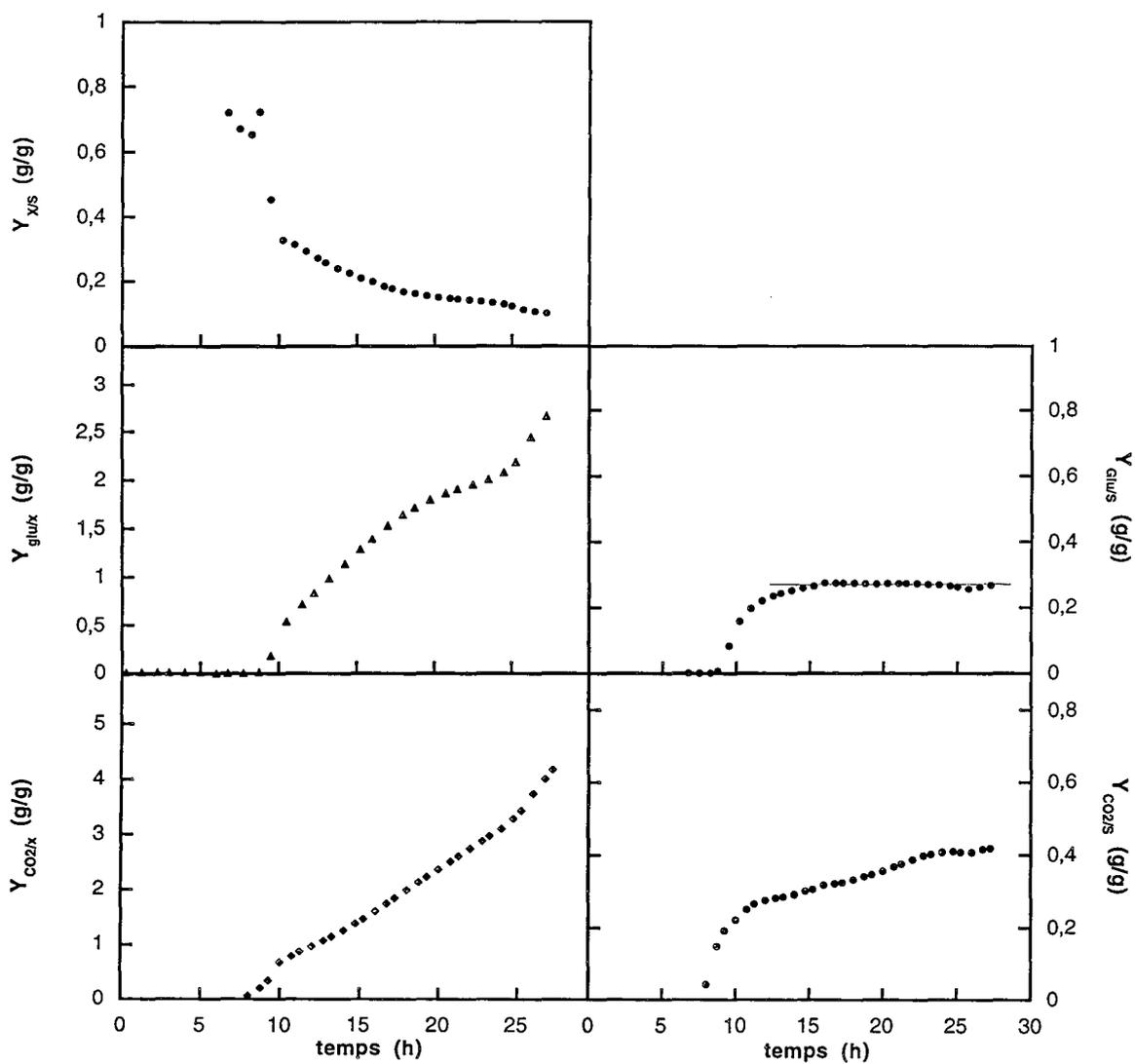


Figure III.31 : Evolution des différents coefficients cumulés de conversion ($Y_{X/S}$, $Y_{glu/X}$, $Y_{glu/S}$, $Y_{CO2/X}$ et $Y_{CO2/S}$) lors de la culture semi-continue "CHON".

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation du glucose et de production de glutamate sont reportées sur la figure III.29. Les deux premières montrent un maximum en phase de croissance à 6 heures de culture avec respectivement $1,2 \text{ h}^{-1}$ et $2,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Elles subissent une forte perturbation au moment de l'ajout de Tween et de l'alimentation en glucose, essentiellement par un phénomène de dilution. On observe d'autre part qu'il n'y a plus ici de croissance après 15 heures de culture, contrairement à la culture précédente, qui montrait une reprise de croissance en fin de fermentation. La vitesse spécifique de production du glutamate montre un maximum en début de phase d'excrétion avec $0,45 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, correspondant encore à une forte consommation de glucose ($1,5 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Puis les deux vitesses diminuent de concert jusqu'à la fin de la culture. Les mesures du CO_2 produit et de l'oxygène consommé ont permis de calculer le quotient respiratoire (rapport des vitesses de production de CO_2 sur celle de consommation d' O_2 , exprimées en $\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Il montre une augmentation de 0,6 à 0,8 en phase de croissance pour se stabiliser à 0,7 en phase d'excrétion du glucose (figure III.30).

Le calcul du rendement de croissance $Y_{X/S}$ donne une valeur de $0,7 \text{ g.g}^{-1}$ en phase de croissance, qui chute à $0,2 \text{ g.g}^{-1}$ en phase de production de glutamate. En revanche, le coefficient de production de glutamate par rapport au glucose $Y_{\text{glu}/S}$, nul en phase de croissance augmente à une valeur constante de $0,3 \text{ g/g}$ en phase de production, de même que le $Y_{\text{CO}_2/X}$ qui se stabilise à $0,4 \text{ g/g}$ (figure III.31). Lors de la production de glutamate, la répartition du glucose se fait donc à 20% dans la biomasse, à 30% dans le glutamate et à 40% dans le gaz carbonique. Le coefficient de production de glutamate par la biomasse ($Y_{\text{glu}/X}$) augmente régulièrement à partir de la dixième heure pour atteindre $2,7 \text{ g.g}^{-1}$ à la fin de la culture, de même que le coefficient de production de CO_2 par la biomasse ($Y_{\text{CO}_2/X}$) dont la valeur finale est calculée à 4 g.g^{-1} . Ce dernier ne montre pas le pic observé précédemment.

Le recouvrement carboné prenant en compte la biomasse, le glutamate et le CO_2 est estimé à 66% seulement du carbone consommé sous forme de glucose. Ce résultat peut s'expliquer par des erreurs de mesure, de calcul (lissage et interpolation) ou encore par l'omission d'un (ou plusieurs) métabolite non négligeable, bien que les dosages n'aient révélé la présence d'aucun acide aminé, acide organique, ni même de tréhalose.

III.2.2.2. Composition CHON

Cinq échantillons ont été prélevés, filtrés, rincés avec une solution isotonique puis lyophilisés pour procéder à l'analyse CHON de la biomasse. Ces échantillons ont été collectés à différents stades de la culture comme l'indique la figure III.32. Le premier échantillon (E_{8,5}) a été effectué en phase de croissance, les quatre autres (E₁₁, E_{16,5}, E_{21,5} et E_{27,5}) à différents moments de la phase de production (le chiffre en indice correspond au temps d'échantillonnage).

Seuls les pourcentages massiques des éléments C, H et N ainsi que celui du résidu sec (cendres minérales) ont été déterminés. La présence de métaux dans la cellule engendre en effet la

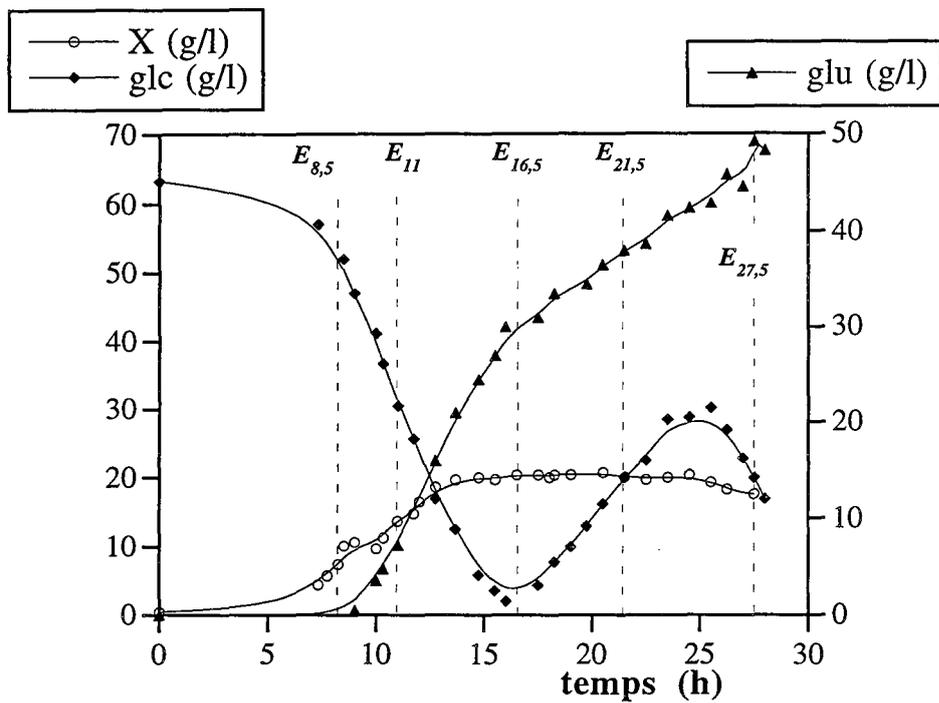


Figure III.32 : Cinétiques de la culture semi-continue "CHON", indiquant les prélèvements pour les dosages CHON. Le numéro placé en indice de E fait référence au temps d'échantillonnage.

(X, biomasse ; glc, glucose ; glu, glutamate)

formation d'oxydes métalliques avec l'oxygène, non destructibles, et qui rendent impossible le dosage de l'oxygène. Il se trouve donc réparti entre une forme "organique" et une forme "complexée", cette dernière se retrouvant dans le résidu sec. Cependant, étant donné la faible quantité intracellulaire de métaux par rapport à l'oxygène organique, nous estimerons que le pourcentage massique d'oxygène correspond au complément à 100% de la somme "C+H+N+résidu sec". Les résultats bruts fournis par le Service Central d'Analyse sont regroupés dans le tableau III.2 avec le calcul des écarts types pour les échantillons E₁₁ et E_{16,5}. Ces écarts types, obtenus par un traitement

Tableau III.2 : Résultats bruts des dosages CHON des échantillons bactériens prélevés lors de la culture semi continue de *Corynebacterium glutamicum* (pourcentages massiques). Excepté pour le résidu sec (RS), les dosages sont doublés, voire triplés (colonnes a, b et c). Dans le cas des échantillons E2 et E3, nous avons indiqué la moyenne et l'écart type, ce dernier étant ramené en pourcentage (valeur entre parenthèses).

Ces résultats sont fournis par le Service Central d'Analyse, sauf pour l'oxygène dont la valeur est obtenue en complétant à 100%.

	E1		E2			moyenne et écart type
	a	b	a	b	c	
C	37,3 %	36,9 %	42,0 %	40,3 %	39,7 %	40,7 ± 1 (± 2,5 %)
H	5,9	6,0	6,2	6,2	6,4	6,3 ± 0,08 (± 1,3 %)
O	37,7	37,2	30,4	33,0	34,3	32,6 ± 1,7 (± 7 %)
N	8,2	8,9	11,4	10,5	9,6	10,5 ± 0,75 (± 5 %)
RS	11	-	10	-	-	-

	E4			moyenne et écart type	E4		E5	
	a	b	c		a	b	a	b
C	42,4 %	41,7	40,8	41,5 ± 0,7 (± 1,5 %)	43,5 %	43,1 %	46,4 %	45,4
H	5,9	6,6	6,4	6,3 ± 0,3 (± 3 %)	6,5	6,6	7,3	7,4
O	35,6	35,9	-	35,7 ± 0,15 (± 0,5 %)	35,2	35,6	35,6	36,6
N	9,2	8,8	-	9,0 ± 0,2 (± 2 %)	8,1	8,0	5,7	5,7
RS	7	-	-	-	6,7	-	5	-

Tableau III.3 : Composition élémentaire de la biomasse aux différents échantillons et calcul d'une composition moyenne avec écart type sur chaque élément.
RS : Résidu Sec (ou cendres minérales), en pourcentage massique.

	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>RS</i>
<i>E_{8,5}</i>	3,10	5,9	2,35	0,60	11%
<i>E₁₁</i>	3,46	6,3	1,98	0,75	10%
<i>E_{16,5}</i>	3,48	6,3	2,25	0,64	7,0%
<i>E_{21,5}</i>	3,61	6,6	2,21	0,58	6,7%
<i>E_{27,5}</i>	3,83	7,4	2,25	0,41	5,0%
<i>moyenne et écart type</i>	3,5 ± 0,24 (± 7%)	6,5 ± 0,50 (± 7,7%)	2,2 ± 0,12 (± 5,5%)	0,6 ± 0,11 (± 18%)	8,0% ± 2,2 (± 27,5%)

Tableau III.4 : Composition élémentaire de la biomasse aux différents échantillons ramenée à une formule brute en 1 Carbone et masse molaire résultante (RS : Résidu Sec, en pourcentage massique).

	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>RS</i>	<i>masse molaire</i>
<i>E_{8,5}</i>	1	1,90	0,76	0,19	11%	32,3 g.mol ⁻¹
<i>E₁₁</i>	1	1,82	0,57	0,22	10%	28,9
<i>E_{16,5}</i>	1	1,81	0,65	0,18	7,0%	28,8
<i>E_{21,5}</i>	1	1,83	0,61	0,16	6,7%	27,7
<i>E_{27,5}</i>	1	1,93	0,59	0,11	5,0%	26,2
<i>moyenne</i>	1	1,86	0,68	0,18	8%	30,0

Tableau III.5 : Composition élémentaire de la biomasse pour différentes souches de Corynébactéries (ramenée à 1 Carbone).

<i>souche bactérienne</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>RS</i>	<i>masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>référence</i>
<i>formule moyenne d'une bactérie</i>	1	1,80	0,50	0,20	5%	25,9	Roels, 1983
<i>Brevibacterium flavum</i>	1	1,625	0,50	0,125	nc	(23,4)	Simon, 1986
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1	1,78	0,49	0,22	nc	(24,7)	Nezondet, 1992
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1	1,63	0,49	0,21	3%	25,2	Vallino, 1991
<i>Corynebacterium glutamicum melassecola</i>	1	1,61	0,40	0,25	12,5%	26,9	Péquignot, 1995

nc : non communiqué.

statistique des données, seront assimilés à l'erreur de dosage de l'élément correspondant, ce qui conduit à une variabilité des dosages allant de 3 à 5 %. (Remarque : pour un composé organique pur, la précision des dosages est estimée à $\pm 0,3\%$ (données du Service Central d'Analyse)).

Ces compositions élémentaires sont converties en quantités molaires afin de visualiser la formule élémentaire de la biomasse. Ces quantités molaires sont exprimées en mole de l'élément considéré par gramme de biomasse. Cette conversion est réalisée grâce à la relation suivante :

$$\text{quantité molaire} = \frac{\text{pourcentage massique de l'élément}}{100 \times \text{masse atomique de l'élément}}$$

Les résultats sont regroupés dans le tableau III.3. La dernière ligne du tableau indique une formule élémentaire moyenne sur les 5 échantillons. On constate que la formule CHON de la biomasse varie sensiblement entre les différents échantillons : le carbone augmente de 3,1 à 3,83 moles et l'hydrogène de 5,9 à 7,4 moles. En revanche, l'azote diminue de 0,75 à 0,41 moles. A partir de notre hypothèse de calcul, l'oxygène montre une proportion quasi constante à 2,2 moles par mole de biomasse. Les écarts types sont de 7% pour le carbone, 7,7% sur l'hydrogène et 18% sur l'azote. Ces valeurs sont supérieures à celles calculées sur les mesures du Service d'Analyse, et nous pouvons donc en conclure que les variations de formule élémentaire entre E_{8,5} et E_{27,5} sont significatives. La formule brute ramenée à un carbone permet de mieux apprécier la variation entre les différents échantillons (tableau III.4). On observe cette fois que l'hydrogène est quasiment constant, que l'oxygène diminue de 25 à 30% entre croissance et production (0,76 mole/mole C pour E_{8,5} contre 0,57 mole/mole C pour E₁₁), de même que l'azote qui diminue régulièrement du début à la fin de la culture (0,22 mole/mole C pour E₁₁ contre 0,11 mole/mole C pour E_{27,5}).

III.2.3 Conclusion - Discussion sur les cultures semi-continues

Les cinétiques des cultures semi-continues montrent deux phases bien distinctes, une phase de croissance et une phase de production de glutamate, séparées par l'ajout du surfactant. Aucun autre métabolite n'est produit de manière significative dans ces différentes cultures, ni acides aminés, ni acides organiques. Une faible quantité de tréhalose peut cependant être détectée en fin de culture, inférieure à 4 g/l.

Les caractéristiques cinétiques de la première phase sont identiques à celles d'une culture discontinue à pression osmotique normale, c'est à dire une vitesse maximale de croissance instantanée de 1 h⁻¹ (très certainement surestimée par le calcul des dérivées ; la valeur réelle se situe plutôt vers 0,8 h⁻¹ comme nous l'avons vu précédemment), un Y_{X/S} de 0,5 g/g et aucune production extracellulaire. En phase de production, la croissance ralentit fortement mais la consommation du glucose reste supérieure à 0,5 g/g.h⁻¹. Ce dernier est utilisé pour la synthèse de glutamate, qui démarre dès l'ajout du Tween et ne s'arrête qu'en fin de culture. Le glucose se répartit à 20% dans la biomasse, 30% dans le glutamate et 40% dans le gaz carbonique (répartition en masse). On pourra

remarquer qu'on est loin du rendement théorique maximum, puisqu'une mole de glucose peut théoriquement produire 1 mole de glutamate et une mole de CO₂ à condition qu'il n'y ait plus aucune croissance, soit respectivement 0,81 g/g et 0,24 g/g. Dans la culture, on observe une croissance résiduelle qui diminue ces rendements théoriques. Le coefficient $Y_{glu/X}$ non constant montre cependant que la production de glutamate n'est pas associée à la croissance, et qu'il serait donc possible d'augmenter le rendement $Y_{CO_2/X}$ en stoppant la croissance. L'excrétion et la surproduction du glutamate peut donc être attribuée à l'ajout et à l'action des surfactants, le mécanisme n'étant pas encore élucidé.

Nous avons montré une variation sensible de la composition élémentaire de la biomasse au cours d'une culture semi-continue, avec surtout une diminution de la quantité d'azote et d'oxygène. Ces études reflètent donc des modifications physiologiques, des variations de la composition intracellulaire de la bactérie et peuvent fragiliser les hypothèses sur la synthèse de la biomasse émises lors de l'estimation des flux métaboliques, si l'on n'intègre pas ces variations.

Il est possible de comparer nos résultats avec un certain nombre de données proposées par des auteurs précédemment cités (tableau III.5). Globalement, nos dosages révèlent une proportion supérieure en hydrogène mais surtout en oxygène, et une proportion inférieure en azote, en particulier comparativement aux données de Péquignot qui a utilisé la même souche mais en condition de croissance pure (milieu BMCG). Cependant, il est tout à fait possible que notre hypothèse sur l'oxygène conduise à une surestimation de sa proportion, et qu'une contamination de nos échantillons ait lieu par le glucose résiduel, le Tween, la bêtaïne et le glutamate qui sont mal éliminés lors de la filtration. Ces composés, riches en hydrogène et en oxygène mais pauvres en azote, pourraient ainsi fausser la composition élémentaire de la biomasse.

III.3. Conclusions

Les différents résultats présentés ci-dessus conduisent aux conclusions suivantes :

- Les études cinétiques menées sur les cultures discontinues sur la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en milieu BMCG-glucose ont conduit à montrer que l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture provoque une réorganisation du métabolisme cellulaire au profit de la synthèse de proline et de gaz carbonique, et au détriment de la biomasse (diminution de la vitesse spécifique de croissance, diminution du rendement de croissance ($Y_{X/S}$), augmentation du rendement de production de CO₂ ($Y_{CO_2/S}$) et une augmentation de la synthèse de proline intracellulaire). La culture discontinue en milieu BMM-glucose confirme que c'est bien l'augmentation de l'osmolarité qui est responsable de ce phénomène, puisque la présence d'un composé osmoprotecteur tel que la bêtaïne conduit à un comportement de la culture quasi identique à celui d'une croissance à pression osmotique normale.

■ Les cultures semi-continues présentent toutes deux des résultats semblables, avec deux phases : une phase de croissance, dont les caractéristiques cinétiques sont identiques à celles des cultures discontinues à pression osmotique normale, et une phase de production. Cette dernière, provoquée par l'ajout du Tween, montre un ralentissement de la croissance bactérienne - pouvant s'expliquer par un effet combiné des surfactants, du glutamate et de la température - et une augmentation du coefficient de production de CO₂ et de glutamate par rapport à la biomasse. Le réarrangement physiologique conduisant à la production de glutamate semble cette fois être le fait de l'ajout de surfactants et non de l'augmentation de la pression osmotique du milieu.

■ Enfin, nous avons constaté des variations significatives de la composition élémentaire CHON de la souche bactérienne au cours de la culture semi-continue, avec une augmentation de la proportion molaire de carbone et d'hydrogène, et une diminution de celle d'azote et d'oxygène.

Chapitre 4

*Modélisation
Cinétique*

SOMMAIRE du CHAPITRE IV

IV.1. Modélisation cinétique.....	114
IV.1.1. Données expérimentales	115
IV.1.2. Lois cinétiques.....	115
IV.1.3. Equations de bilans.....	118
IV.1.4. Identification des paramètres K_S , $K_{S\text{ lat}}$ et $K_{I\text{at}}$	119
IV.1.5. Validation du modèle.....	119
IV.1.6. Validité du modèle.....	120
IV.2. La procédure de Détermination du Domaine de Validité	120
IV.2.1. Rappel sur la logique floue.....	121
IV.2.2. Théorie de la procédure DDV	122
IV.2.2.1. Définitions préliminaires.....	122
IV.2.2.2. Traitement des données expérimentales.....	122
IV.2.2.3. Applications aux cinétiques et aux modèles biologiques.....	124
IV.2.3. Applications aux cultures discontinues à 0,45 et 1,5 Osm	127
IV.3.3. Interprétation du degré de réalisation d'une expérience de référence	129
IV.3.4. Elargissement du domaine de validité du modèle.....	130
IV.4. Conclusions sur la modélisation cinétique.....	132

Modélisation cinétique de la croissance de Corynebacterium glutamicum sous stress osmotique

Les résultats cinétiques décrits précédemment mettent en évidence un effet important de la pression osmotique du milieu de culture sur les **cinétiques de croissance** de *Corynebacterium glutamicum* en milieu BMCG-glucose. Il nous apparaît intéressant d'essayer de modéliser ce phénomène. Un modèle cinétique est un outil qui peut remplir plusieurs fonctions : stockage de la connaissance sous une forme compacte, structuration de cette connaissance, permettant de rendre compte des relations entre les différents paramètres, et enfin compréhension et étude du phénomène modélisé.

Nous nous efforcerons donc de rechercher, entre autres, quelle doit être la structure du modèle envisagé, quelles informations nous pouvons en tirer, et quelles sont les limites d'utilisation de ce modèle. Pour cela, nous aborderons successivement les points suivants :

- construction du modèle,
- présentation d'une méthode originale de détermination du domaine d'application d'un modèle, encore appelé domaine de validité (à ne pas confondre avec la notion de validation, voir paragraphe IV.1.2.),
- application de cette méthode à notre modèle.

IV.1. Modélisation cinétique

Nous avons décidé de nous intéresser à la modélisation de la croissance de la bactérie en réponse à un stress osmotique, en intégrant plus particulièrement le développement de la biomasse, la consommation du substrat carboné et la synthèse de la proline (convertie en une grandeur macroscopique). Nous n'intégrerons ni la phase stationnaire, ni la production de CO₂.

Tableau IV.1 : Récapitulatif des paramètres cinétiques obtenus à différentes osmolarités pour les cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum* (milieu BMCG-glucose). Les prédictions par les lois du modèle sont indiquées entre parenthèses.

Osmolarité (Osm)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{\text{pro}/X}$ (g.g ⁻¹)
0,45	0,70 (0,72)	0,60 (0,59)	0,007 (0,012)
1,0	0,60 (0,58)	0,50 (0,50)	0,018 (0,05)
1,5	0,60 (0,46)	0,41 (0,42)	0,17 (0,13)
2,2	0,30 (0,28)	0,38 (0,0,37)	0,2 (0,25)
2,7	0,15 (0,16)	0,34 (0,35)	0,36 (0,32)
3,0	0,08 (0,08)	0,34 (0,35)	0,34 (0,35)
3,3 *	0 (0,005)	0,34 (0,34)	0,34 (0,37)

* osmolarité n'autorisant plus la croissance. Valeurs extrapolées.

IV.1.1. Données expérimentales

Le modèle que nous avons construit repose sur les cultures discontinues présentées précédemment, en partie complétées par celles de Guillouet (1996). Ces différentes expériences ont permis d'identifier les paramètres cinétiques influencés par la pression osmotique : la vitesse spécifique de croissance (μ_{\max}) et le rendement de production de biomasse par rapport au substrat ($Y_{X/S}$) et le coefficient de production de proline par la biomasse ($Y_{\text{Pro}/X}$). L'ensemble de ces valeurs est résumé dans le tableau IV.1. L'osmolarité maximale supportable par les bactéries, c'est à dire celle pour laquelle on n'observe plus de croissance est de $3,3 \pm 0,2$ Osm (valeur déterminée en fiole d'Erlenmeyer par Guillouet). Dans ces conditions, nous prendrons les valeurs théoriques $\mu_{\max} = 0$, $Y_{X/S} = 0,34$ et $Y_{\text{Pro}/X} = 0,34$ g/l. Ces deux dernières données correspondent aux valeurs mesurées pour la culture à 3,0 Osm et que nous extrapolons à 3,3 Osm. Lorsque la pression osmotique augmente, on observe donc :

- une diminution de la vitesse spécifique maximale de croissance et du rendement de production de biomasse par rapport au glucose.
- une augmentation du rendement de production de proline intracellulaire par rapport au substrat.

Pour modéliser la phase de latence initiale, nous avons choisi un modèle à deux populations de cellules : une population latente et une population active. Les cellules latentes sont présentes dès le début de la culture, ne se développent pas mais se transforment petit à petit en cellules actives. Elles consomment du glucose mais ne produisent aucun métabolite. Les cellules actives se développent, consomment du glucose et synthétisent de la proline. Chaque population aura ainsi ses propres lois cinétiques et ses propres équations de bilan.

IV.1.2. Lois cinétiques

Les lois cinétiques utilisées dans le modèle sont des relations classiques, modulées par des corrélations entre les paramètres du modèle et l'osmolarité du milieu de culture. Ces relations sont décrites ci-dessous :

- cellules latentes :

Etant donné la faible consommation de glucose par ce type de cellules, nous choisirons une vitesse spécifique de consommation du glucose constante. Il apparaît ainsi la constante de vitesse $k_{S_{\text{lat}}}$, dont la valeur est déterminée par régression (voir paragraphe IV.1.4.).

$$q_{S_{\text{lat}}} = k_{S_{\text{lat}}} \quad [\text{IV.1}]$$

- cellules actives :

La vitesse spécifique de croissance est décrite par une cinétique de Monod vis à vis du substrat :

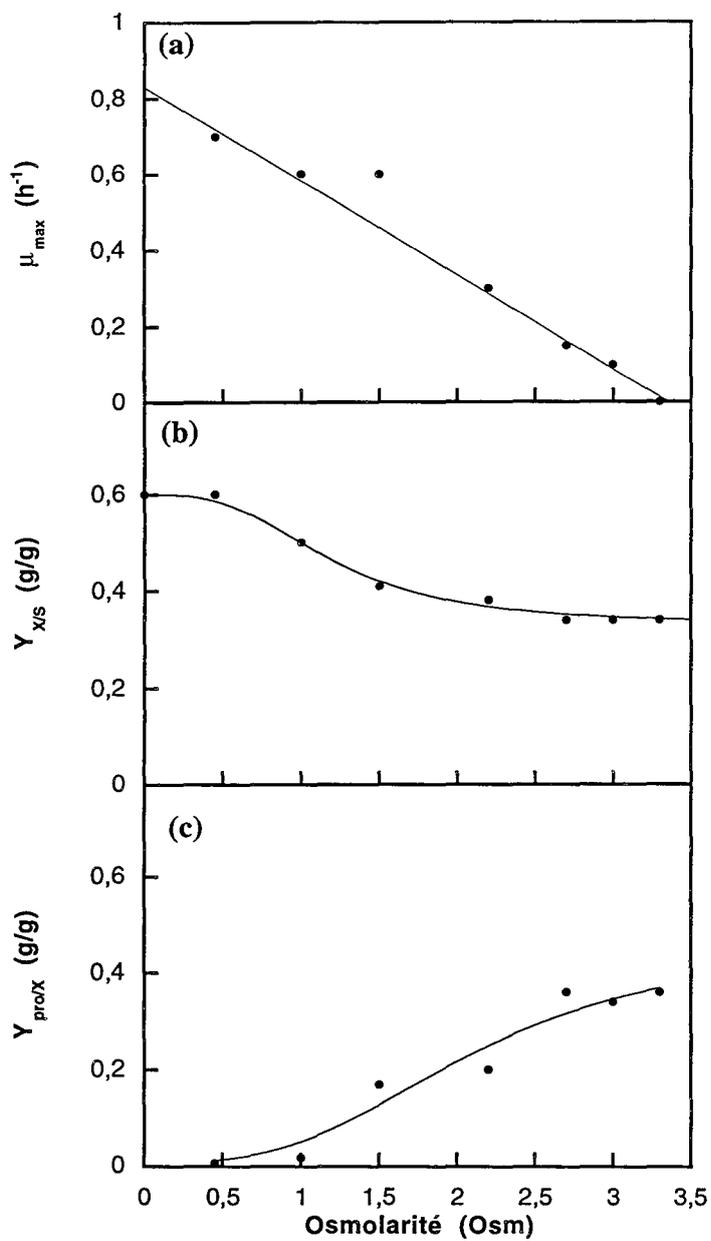


Figure IV.1 : Corrélation des paramètres cinétiques à l'osmolarité du milieu de culture :
 (a) vitesse spécifique maximale de croissance μ_{max} ,
 (b) rendement de conversion du glucose en biomasse $Y_{X/S}$
 (c) coefficient de synthèse de proline par la biomasse $Y_{pro/X}$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad [\text{IV.2}]$$

μ_{\max} est donné par l'expérience et K_S par régression (voir paragraphe IV.1.4.).

Une relation linéaire corrèle la vitesse spécifique de croissance et la vitesse spécifique de consommation du substrat, grâce à l'inverse du rendement de croissance $Y_{X/S}$, obtenu expérimentalement :

$$q_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \quad [\text{IV.3}]$$

De même pour la relation entre la vitesse spécifique de croissance et la vitesse spécifique de production de la proline grâce au coefficient de production instantané de proline par la biomasse, $Y_{\text{pro}/X}$, déterminé par l'expérience. La proline est ici considérée en grandeur extracellulaire, exprimée en g/l. Pour des raisons de simplicité, nous avons choisi une production de proline associée à la croissance, ce qui représente d'ailleurs une approximation valable, surtout aux pressions osmotiques inférieures à 2 Osm :

$$q_{\text{Pro}} = Y_{\text{Pro}/X} \cdot \mu \quad [\text{IV.4}]$$

L'influence de l'osmolarité sur les paramètres cinétiques μ_{\max} , $Y_{X/S}$ et $Y_{\text{pro}/X}$ a été déterminée en représentant l'évolution de ces paramètres en fonction de la pression osmotique (figure IV.1). L'évolution de la vitesse spécifique maximale de croissance (figure IV.1-a) permet de proposer la corrélation suivante :

$$\mu_{\max} = 0,83 - 0,25 \times \text{PO} \quad [\text{IV.5}]$$

Cette relation linéaire n'a aucune signification physiologique réelle, en particulier aux extrémités du domaine de pression osmotique. On la transformera pour faire apparaître des données cinétiques plus familières :

- la pression osmotique maximale autorisant une croissance microbienne (PO_{\max}),
- le maximum de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_M), correspondant à la vitesse spécifique maximale observée à 0,45 Osm,

$$\mu_{\max} = 1,19 \cdot \mu_M \left(1 - \frac{\text{PO}}{\text{PO}_{\max}} \right) \quad [\text{IV.6}] \quad \text{avec } \mu_M = 0,70 \text{ h}^{-1} \text{ et } \text{PO}_{\max} = 3,32 \text{ Osm}$$

Le calcul de ces dernières données est en accord avec les valeurs expérimentales extrapolées.

En ce qui concerne le rendement de conversion du glucose en biomasse (figure IV.1-b), les données expérimentales peuvent être représentées par la relation suivante :

$$Y_{X/S} = Y_{\max} - \left(Y_{\min} \cdot \frac{PO^n}{K_{PO} + PO^n} \right) \quad [IV.7]$$

avec $Y_{\max}=0,60$ g/g, $Y_{\min}=0,27$ g/g, $K_{PO}=1,67$ Osm³ et $n=3$

Il apparaît distinctement dans cette relation la valeur maximale du rendement (observée à 0,45 Osm et extrapolée à 0), la valeur minimale (observée au delà de 3 Osm) et une constante d'ajustement K_{PO} (de même que la puissance) qui impose la courbure de la sigmoïde. Toutes ces valeurs sont obtenues par calcul, les deux premières correspondant bien aux valeurs expérimentales.

Enfin, pour le rendement de production de proline nous pouvons choisir entre deux coefficients :

- le rendement de production de proline par rapport au substrat consommé ($Y_{Pro/S}$).
- le rendement de production de proline par rapport à la biomasse produite ($Y_{Pro/X}$).

Ce deuxième paramètre permet d'obtenir une meilleure corrélation que le premier, avec la loi suivante (figure IV.1-c) :

$$Y_{Pro/X} = Y_{proM} \cdot \frac{PO^n}{K'_{PO} + PO^n} + Y_{pro0} \quad [IV.8]$$

avec $Y_{proM}=0,46$ g.g⁻¹
 $K'_{PO}=9,5$ (Osm/kg)³
 $Y_{pro0}=0,008$ g.g⁻¹
 $n=3$

Y_{proM} est la valeur maximale du rendement de production de proline par rapport à celle de biomasse. Elle est obtenue par ajustement de la courbe aux points expérimentaux et par extrapolation aux fortes pressions osmotiques. Comme pour la vitesse spécifique de croissance, on peut faire apparaître la valeur maximale observée expérimentalement ($Y_{pro_{\max}}=0,34$ g/g) en prenant $Y_{proM}=1,35 \times Y_{pro_{\max}}$. La valeur des autres paramètres est également le résultat du calcul d'ajustement.

La relation [IV.8] peut s'expliquer en considérant trois phases de réaction de la cellule vis à vis de l'osmolarité du milieu :

- une première phase jusqu'à environ 1,0 Osm, où $Y_{Pro/X}$ est faible et quasi constant. Pendant cette période, la cellule serait peu sensible à la pression osmotique ou bien disposerait de moyens de lutte plus simple qu'une néosynthèse de proline.
- une phase active où le "système proline" entre en action pour lutter contre l'hyperosmolarité. Cette phase s'étend jusqu'à 2,7 Osm environ.
- une phase de saturation où le rendement $Y_{Pro/X}$ a atteint une valeur maximale constante. La cellule ne peut pas fournir plus de proline. On atteint alors la limite de viabilité (3,3 Osm).

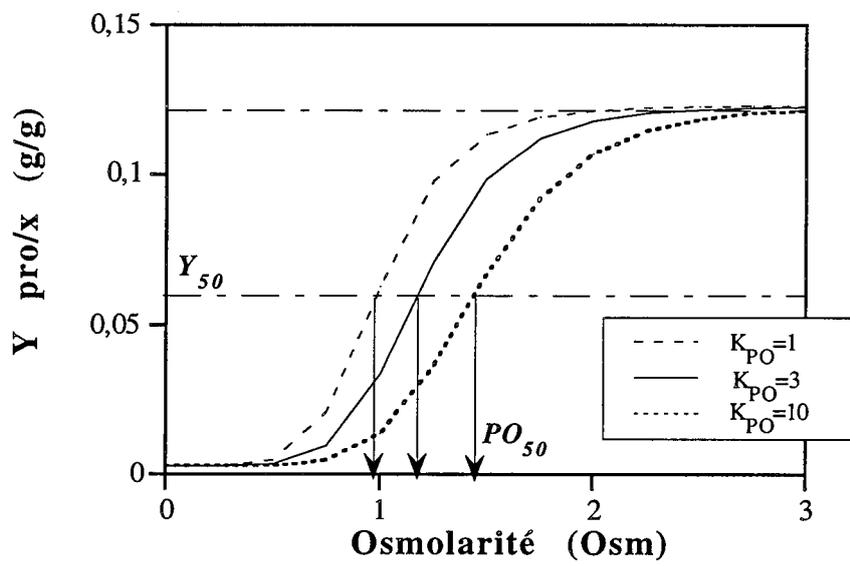


Figure IV.2 : Influence du paramètre K_{PO} sur le coefficient de production de proline par la biomasse.

Dans les deux dernières relations, K_{PO} (ou K'_{PO}) peut être interprété comme une constante cinétique de type "affinité" qui traduirait la sensibilité du rendement considéré par rapport à la pression osmotique. Dans le cas du rendement $Y_{Pro/X}$, plus K_{PO} est faible, plus la courbe s'infléchit tôt et plus $Y_{Pro/X}$ augmente vite. Par analogie aux cinétiques enzymatiques, si on considère $Y_{50} = \frac{Y_{proM}}{2}$, alors $PO_{50} = \sqrt[6]{K_{PO}}$. La fonction racine carrée étant une fonction positive croissante, si K_{PO} diminue, PO_{50} diminue et inversement (figure IV.2).

Les valeurs calculées par les relations proposées ci-dessus pour les paramètres μ_{max} , $Y_{X/S}$ et $Y_{pro/X}$ sont données entre parenthèses dans le tableau IV.1. On observe une bonne adéquation entre valeurs expérimentales et simulées, excepté pour le μ_{max} à 1,5 Osm et pour le $Y_{pro/X}$ à 0,45 et 1,5 Osm. Dans le premier cas, il peut s'agir d'un biais dans les calculs (lissage, interpolation et dérivée) conduisant à une surestimation du μ_{max} à 1,5 Osm. Concernant les $Y_{pro/X}$, les expériences ont montré que les valeurs de proline à ces osmolarités sont faibles et certainement entachées d'erreur, ce qui se reportent sur le $Y_{pro/X}$.

IV.1.3. Equations de bilans

Comme nous l'avons décrit précédemment, seule la population latente est présente initialement. Elle se transforme en population active avec une constante de vitesse k_{lat} et une vitesse spécifique de consommation du glucose (q_{Slat}), mais elle ne produit aucun métabolite. La population active consomme du glucose (vitesse spécifique q_s), se développe (vitesse spécifique μ) et lutte contre l'hyperosmolarité en synthétisant de la proline (vitesse spécifique q_{pro}).

Les équations de bilan appliquées aux différentes variables conduisent aux relations suivantes :

- cellules latentes :

$$\frac{dX_{lat}}{dt} = -k_{lat} \cdot X_{lat} \quad [IV.9]$$

- cellules actives, pour lesquelles nous n'introduisons pas de terme de décès puisque nous n'avons pas étudié ce paramètre :

$$\frac{dX_{act}}{dt} = \mu \cdot X_{act} + k_{lat} \cdot X_{lat} \quad [IV.10]$$

- substrat :

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X_{act} - q_{Slat} \cdot X_{lat} \quad [IV.11]$$

- à la production de proline intracellulaire (convertie en grandeur extracellulaire) :

$$\frac{dPro}{dt} = q_{Pro} \cdot X_{act} \quad [IV.12]$$

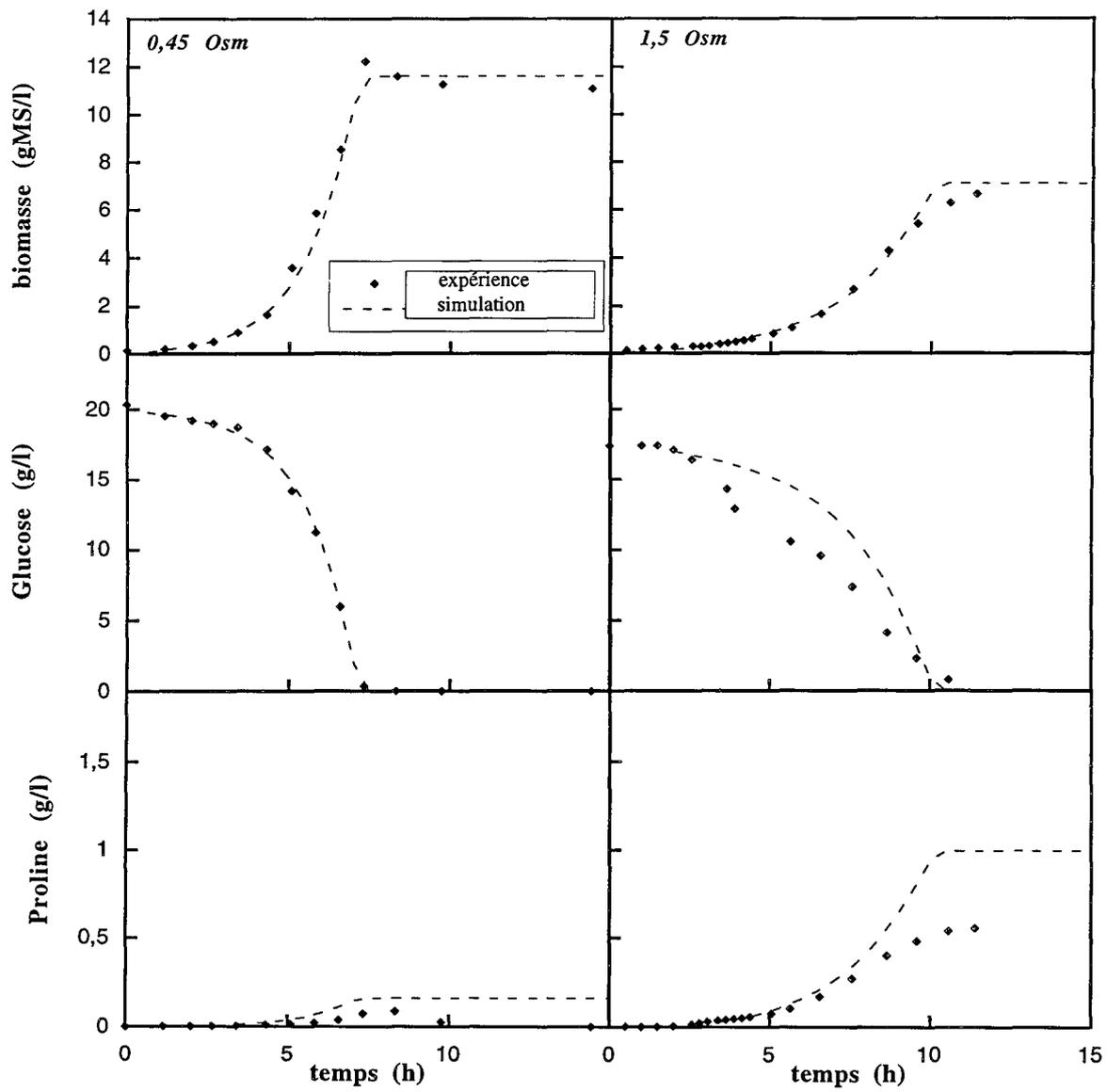


Figure IV.3 : Comparaison des cinétiques expérimentales et simulées des cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum* à 0,45 et 1,5 Osm (milieu BMCG).

IV.1.4. Identification des paramètres K_S , $K_{S\text{ lat}}$ et $K_{I\text{at}}$

Un certain nombre de paramètres ont déjà été identifiés grâce aux corrélations avec la pression osmotique. Les autres paramètres (le K_S , les valeurs initiales des variables, en particulier des cellules latentes et des cellules actives, la valeur des constantes de vitesse $k_{I\text{at}}$ et $k_{S\text{ lat}}$) seront déterminés par ajustement des simulations aux données expérimentales. Nous obtenons ainsi une valeur de K_S égale à 0,5 g/l (soit $2,8 \cdot 10^{-3}$ M de glucose), de $1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la constante de vitesse $k_{I\text{at}}$ et de $2,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour $k_{S\text{ lat}}$.

Enfin, par hypothèse de construction du modèle, seules les cellules latentes sont présentes au démarrage de la culture. La population initiale de cellules latentes est donc égale à l'ensemencement et celle des cellules actives est nulle.

IV.1.5. Validation du modèle

Elle est réalisée en comparant les simulations aux données expérimentales. Les exemples de validation sont proposés sur les figures IV.3 et IV.4 pour les cultures discontinues à 0,45, 1,5 Osm d'une part, et 2,2, 2,7 et 3,0 Osm d'autre part.

On remarquera tout d'abord que nous avons fait démarrer la simulation à partir du choc osmotique lorsqu'on n'est plus à osmolarité normale. Les populations de cellules latentes et de cellules actives sont alors ajustées de manière à reproduire la phase de latence qui suit le choc osmotique. Les résultats obtenus sont ainsi très satisfaisants comme le montre les figures, en particulier pour la biomasse et le glucose. Cependant, un décalage apparaît pour la culture à 1,5 Osm (voir chapitre III) et à 2,2 Osm (non expliqué). En ce qui concerne l'accumulation de proline (exprimée en g/l), les simulations reproduisent correctement la phase de synthèse rapide de la proline, mais "décrochent" par la suite. Les études cinétiques ont montré que la synthèse de proline par la biomasse se décompose en deux phases : une phase de synthèse rapide, avec un $Y_{\text{pro}/X}$ élevé, et une phase de synthèse ralentie, avec un $Y_{\text{pro}/X}$ plus faible. Or dans le modèle, nous n'avons considéré que la première phase, et la surestimation de la proline en fin de culture est donc tout à fait normale. Il serait peut-être possible de remédier à ce problème en introduisant une inhibition de la synthèse de proline (via le $Y_{\text{pro}/X}$) par sa propre concentration, mais nous n'avons pas cherché à approfondir cet aspect du modèle. On remarquera finalement que l'approximation d'une synthèse de proline associée à la croissance conduit à des résultats satisfaisants.

Remarque : pour la biomasse et la proline, on obtient un plateau en fin de culture. Ceci est dû à la structure du modèle qui n'intègre ni le décès cellulaire, ni une éventuelle consommation de la

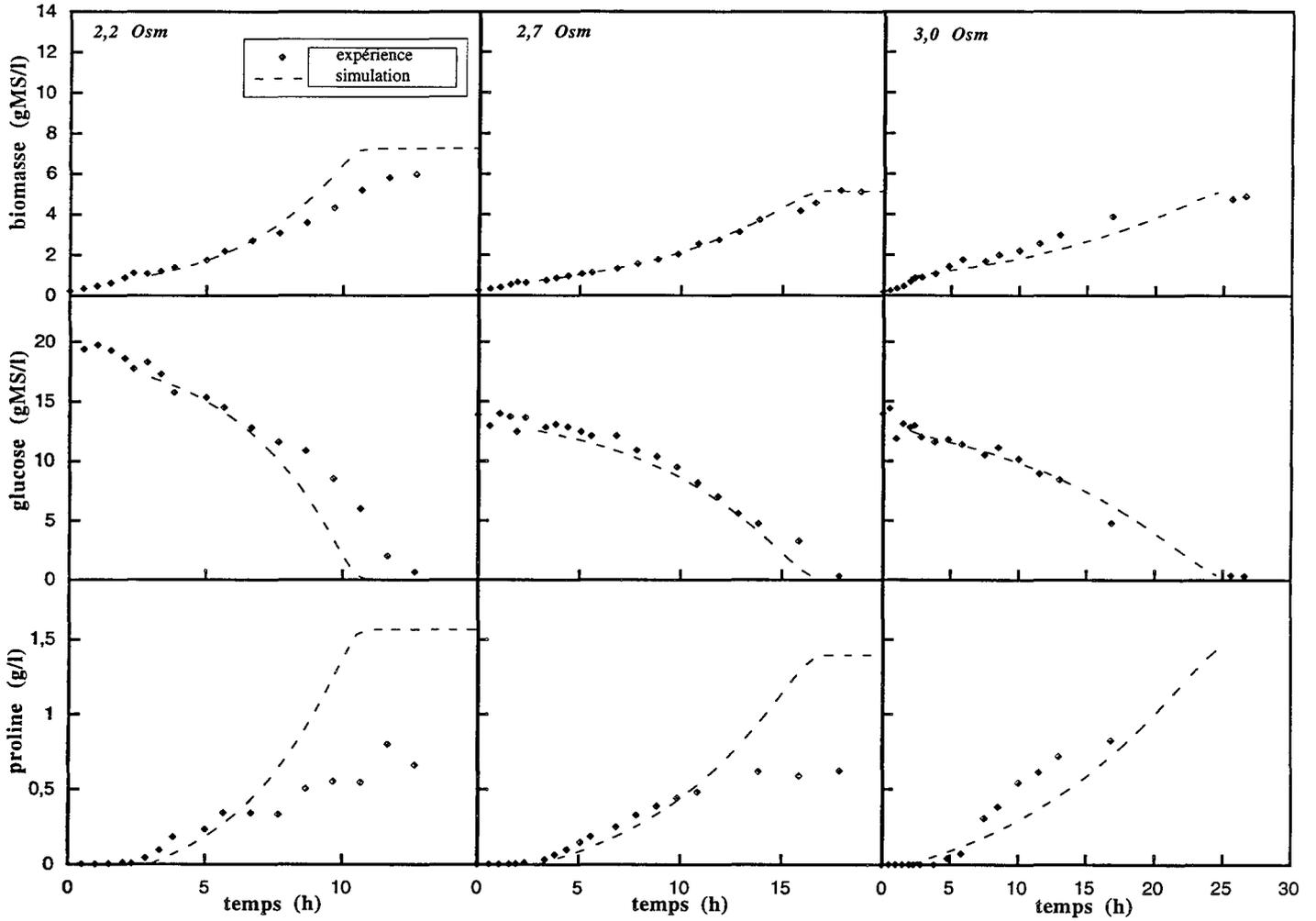


Figure IV.4 : Comparaison des cinétiques expérimentales et simulées des cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum* à 2,2, 2,7 et 3,0 Osm (milieu BMCG).

proline. Pour les raisons invoquées précédemment, nous ne chercherons pas à approfondir cet aspect du modèle.

IV.1.6. Validité du modèle

Comme nous venons de le décrire, la **notion de validation** consiste à vérifier l'accord entre simulations et expériences ; celle de **validité** consiste à déterminer, au vu des données expérimentales qui ont servi à la construction du modèle, le domaine d'état (domaine de variation possible des variables) pour lequel il est réellement applicable. Cette détermination du domaine d'application est très importante, car elle permet de n'utiliser le modèle que pour des conditions où il est soutenu expérimentalement et préserve des intrapolations et des extrapolations abusives.

Un modèle "valide" dans une zone expérimentale particulière signifie qu'il existe des données expérimentales dans cette zone qui ont servi à construire ce modèle. Cependant, strictement parlant, un modèle "valide" n'est pas forcément "valable", c'est à dire qu'il ne correspond pas forcément à la réalité expérimentale dans cette zone. Pour être réellement utile, le concept de validité doit donc également intégrer celui de validation, c'est à dire tenir compte de la **cohérence** entre expérience et modèle. Cette notion de cohérence décrit le degré d'ajustement des données simulées avec les points expérimentaux.

L'étude d'un phénomène suivant un plan d'expériences complet ou fractionnaire (ou autres) (Diamond, 1989) conduit généralement à l'exploration de tout le domaine d'état, à la mise en évidence des variables influentes et de leurs interactions. Mais dans la pratique, l'utilisation de tels plans n'est pas toujours facile, en particulier lorsqu'il s'agit de phénomènes dynamiques tels que les cultures microbiennes. Les expériences sont "lourdes" à mettre en oeuvre et réclament du temps et du matériel. La plupart des variables est de nature dynamique et donc non contrôlable. Ainsi, seulement quelques expériences sont généralement réalisées, dont on essaiera d'extraire un maximum d'informations, et que l'on extrapolera à l'ensemble du domaine d'état.

Nous avons développé un outil original, qui permet de déterminer le domaine de validité d'un modèle (procédure **DDV**, **D**étermination de **D**omaine de **V**alidité), mais également d'intégrer la cohérence entre les simulations et les données expérimentales. Cette procédure est décrite dans le paragraphe suivant.

IV.2. La procédure de Détermination du Domaine de Validité

Remarque : Initialement, cette procédure avait été baptisée Plan d'Expériences Dynamique Flou (PEDF). Bien que dans son algorithme de traitement d'une expérience dynamique grâce à la théorie

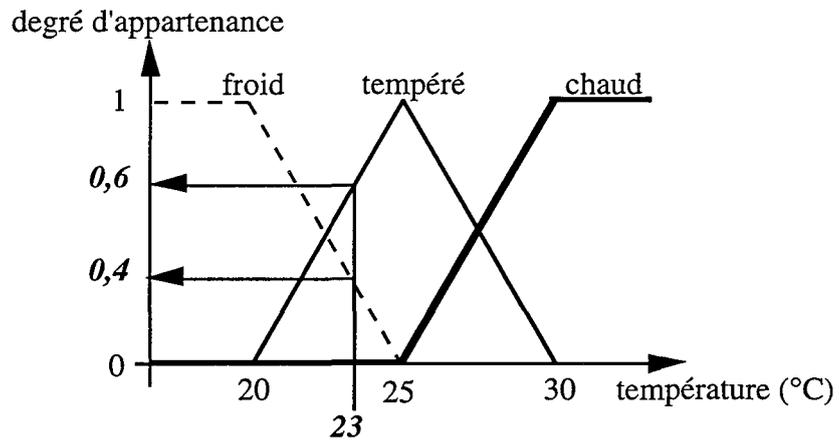


Figure IV.5 : Théorie des sous-ensembles flous : exemple de traitement de la température.
 Le calcul du degré d'appartenance de la température de 23°C à chacune des classes conduit aux résultats suivants :

- degré d'appartenance à la classe "froid" : 0,4
- degré d'appartenance à la classe "tempéré" : 0,6
- degré d'appartenance à la classe "chaude" : 0

de la logique floue, la procédure DDV fasse effectivement appel à un plan d'expériences classique, la démarche utilisée ne peut en aucun cas être assimilée à un plan d'expériences dans le sens reconnu actuellement. C'est pourquoi la terminologie PEDF, mal choisie et pouvant induire des erreurs d'interprétation, a été remplacée par l'appellation DDV. Précisons enfin que cette procédure a été exposée à la communauté scientifique sous le terme PEDF.

Cette nouvelle méthodologie répond à un triple objectif :

- déterminer le domaine de validité d'un modèle,
- intégrer la cohérence entre expériences et simulations,
- proposer - si c'est nécessaire - une (ou plusieurs) expérience complémentaire pour améliorer l'exploration de l'espace d'état.

En réalité, la procédure DDV ne s'adresse pas directement au modèle, mais elle va déterminer le domaine expérimental exploré par la ou les expériences utilisées pour construire ce modèle, domaine que l'on appellera alors domaine de validité du modèle. Le principe est de comparer, a posteriori, les expériences réalisées avec celles d'un plan d'expériences classique fictif. Ce dernier correspond au plan d'expériences que l'on aurait théoriquement dû appliquer pour explorer correctement l'espace d'état relatif au procédé étudié. Mais ce plan est fictif car il n'est pas réalisé, il sert simplement de référence à la comparaison.

La comparaison entre les expériences réalisées et le plan fictif s'effectue au niveau de chaque temps d'échantillonnage grâce à l'utilisation de la théorie des sous-ensembles flous (plus communément appelée logique floue (Zadeh, 1965)). On cherchera en effet à déterminer, à chaque échantillonnage, le degré avec lequel chaque variable (concentration en biomasse, en substrat carboné, en produit...) correspond à chacune des expériences qui définissent le plan de référence.

Enfin, il est important de retenir que la procédure DDV ne se préoccupe pas des réponses obtenues pour chaque expérience, contrairement à un plan d'expériences classique, puisqu'ici les expériences ont déjà été réalisées. Le but fondamental est de comparer "les questions" (l'espace d'état exploré) et non les "réponses".

IV.2.1. Rappel sur la logique floue

Cette approche permet d'apporter des nuances à la logique binaire classique. Dans cette dernière, un élément appartient ou n'appartient pas à un ensemble donné. Dans la logique floue, un élément appartiendra plus ou moins à cet ensemble. Un élément sera donc caractérisé par son degré d'appartenance à chacun des ensembles (valeur comprise entre 0 et 1). Chaque ensemble - ou sous-ensemble flou - sera caractérisé par une fonction d'appartenance qui permet le calcul de ce degré d'appartenance. La forme des fonctions d'appartenance peut être diverse : triangulaire, trapézoïdale, gaussienne... et on notera qu'une forme carrée (rectangulaire) nous ramènerait à la logique binaire. La figure IV.5 illustre cette notion de logique floue en déterminant le degré d'appartenance d'une

température de 23°C à 3 classes : "froide", "tempérée" et "chaude". Compte tenu des classes définies, la température de 23°C est froide à 40% et tempérée à 60%. L'utilisation de la logique floue permet d'introduire des nuances, de la souplesse et d'être ainsi plus précis dans la formulation des conclusions et dans les actions qui en dépendraient.

IV.2.2. Théorie de la procédure DDV

Nous ne développerons ici qu'une théorie simplifiée (présentée au 5^{ème} congrès international Information Processing and Management of Uncertainty, voir Kuehm et coll., 1994). Une théorie détaillée sur le domaine couvert par une expérience dynamique, le domaine de validité d'un modèle, ainsi que sur le degré de validité d'une commande (dans un procédé automatisé) est donnée en annexe 1. Cette théorie prend également en compte l'erreur estimée sur les mesures expérimentales et celle estimée sur les simulations du modèle.

IV.2.2.1. Définitions préliminaires

Un plan d'expériences classique définit un ensemble E d'expériences "statiques" tel que $E = \{E_1, E_2, \dots, E_n\}$. Les expériences E_i servent de référence et ne sont pas réellement réalisées. La seule expérience effectuée est notre expérience dynamique, avec des temps d'échantillonnage t_k (k variant de 1 à p). Chaque expérience "statique" E_i est caractérisée par un ensemble de niveaux (ou qualificatifs) décrivant chaque variable mesurée x_j (j varie de 1 à q). Ainsi,

$$E_i = \{L_{i1}, L_{i2}, \dots, L_{ij}, \dots, L_{iq}\}.$$

On définit le sous-ensemble flou F_{ik} de E_i tel que $F_{ik} = \sum_{L_{ij} \in E_i} f_{ijk}/L_{ij}$, qui représente la réalisation totale de l'expérience E_i au temps t_k . Il s'ensuit $f_{ijk} = 1 \forall i, j, k$.

IV.2.2.2. Traitement des données expérimentales

L'**objectif de la procédure** est de déterminer r_i le degré de réalisation de l'expérience "statique" E_i par l'expérience dynamique, ceci pour chaque E_i du plan d'expérience de référence.

Une fois l'expérience dynamique réalisée, on définit le sous-ensemble V de E tel que $V = \sum_{E_i \in E} r_i/E_i$. V représente la réalisation du plan d'expérience classique par l'expérience dynamique. V peut se définir par rapport à chaque échantillonnage, soit $V = \cup_{(k)} V_k$ avec $V_k = \sum_{E_i \in E} a_{ik}/E_i$ qui représente le degré de réalisation du plan d'expérience par l'expérience dynamique au temps t_k . Il en résulte que $r_i = \sup_{(k)} (a_{ik})$ (l'opérateur "union" se traduit en "sup" dans la théorie des sous-ensembles flous).

On définit ensuite la réalisation d'une expérience de référence par l'expérience dynamique au temps t_k par le sous-ensemble flou W_{ik} de E_i tel que $W_{ik} = \sum_{L_{ij} \in E_i} b_{ijk}/L_{ij}$. Ainsi, b_{ijk} est la

possibilité que la mesure expérimentale de la variable x_j au temps t_k soit compatible avec le qualificatif L_{ij} . Donc a_{ik} est la nécessité de W_{ik} par rapport à F_{ik} , et il s'ensuit

$$a_{ik} = N(W_{ik} ; F_{ik}) = \inf_{(L_{ij} \in E_i)} \max(b_{ijk}, 1-f_{ijk}) = \inf_{(L_{ij} \in E_i)} b_{ijk}$$

On introduit enfin la fonction d'appartenance $\mu_{A_{jk}}(x_j)$ du sous-ensemble flou A_{jk} , défini par $A_{jk} = \int_{x_j} \mu_{A_{jk}}(x_j)/x_j$. Elle est construite à partir des mesures expérimentales et/ou des simulations des variables x_j au temps t_k pour tenir compte de l'erreur estimée sur les mesures et/ou les simulations. Le sous-ensemble flou A_{jk} peut se subdiviser en deux sous-ensembles flous, M_{jk} et S_{jk} . M_{jk} est défini par $M_{jk} = \int_{x_j} \mu_{m_{jk}}(x_j)/x_j$; la fonction d'appartenance associée $\mu_{m_{jk}}(x_j)$ est déduite de la mesure de la variable x_j au temps t_k et de l'incertitude estimée sur cette mesure (figure IV.5). Cette fonction peut être triangulaire ou gaussienne et représente la possibilité d'avoir la mesure x_j à t_k . Le sous ensemble flou S_{jk} défini par $S_{jk} = \int_{x_j} \mu_{s_{jk}}(x_j)/x_j$ est caractérisé par la fonction d'appartenance $\mu_{s_{jk}}(x_j)$. Cette dernière résulte de la simulation de x_j à t_k et de l'erreur acceptable sur les simulations. Cette erreur est choisie par l'expert humain (figure IV.6). Ainsi,

$$A_{jk} = M_{jk} \cap S_{jk} \quad \text{et} \quad \mu_{A_{jk}}(x_j) = \min(\mu_{m_{jk}}(x_j), \mu_{s_{jk}}(x_j))$$

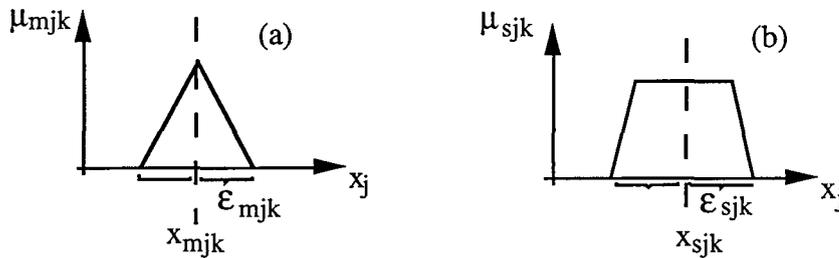


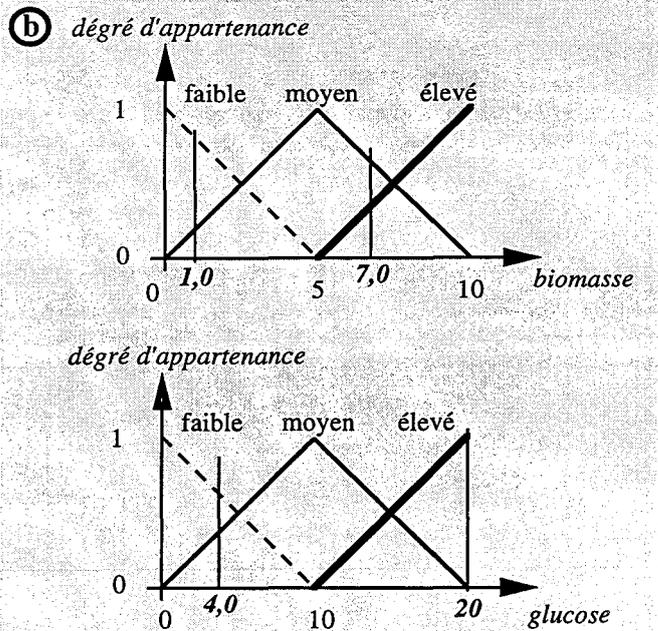
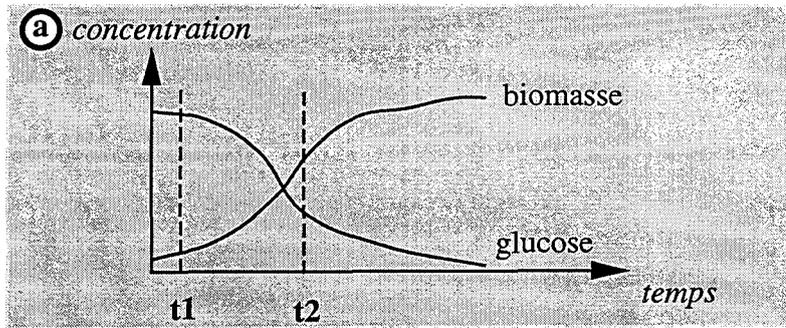
Figure IV.6 : Fonctions d'appartenance pour la mesure $x_{m_{jk}}$ de la variable d'état x_j au temps t_k pour une erreur estimée $\epsilon_{m_{jk}}$ (schéma (a)) et pour la simulation $x_{s_{jk}}$ par le modèle de la variable d'état x_j au temps t_k avec une erreur acceptable $\epsilon_{s_{jk}}$ (schéma (b)).

De même, on introduit la fonction d'appartenance $\mu_{L_{ij}}(x_j)$ du sous ensemble flou Q_{ij} pour chaque qualificatif L_{ij} . Elle se définit par $Q_{ij} = \int_{x_j} \mu_{L_{ij}}(x_j)/x_j$. C'est l'expert humain qui choisit les qualificatifs et les fonctions d'appartenance associées. Donc b_{ijk} , qui est la possibilité de A_{jk} par rapport à Q_{ij} , s'écrit

$$\begin{aligned} b_{ijk} &= \Pi(A_{jk} ; Q_{ij}) = \sup_{(x_j)} \min(\mu_{A_{jk}}(x_j), \mu_{L_{ij}}(x_j)) \\ &= \sup_{(x_j)} \min(\min(\mu_{m_{jk}}(x_j), \mu_{s_{jk}}(x_j)), \mu_{L_{ij}}(x_j)) \end{aligned}$$

Finalement, le degré de réalisation r_i de l'expérience "statique" i au travers de l'expérience dynamique est calculé par la relation suivante :

$$r_i = \sup_{(k)} (\inf_{(L_{ij} \in E_i)} (\sup_{(x_j)} \min(\min(\mu_{m_{jk}}(x_j), \mu_{s_{jk}}(x_j)), \mu_{L_{ij}}(x_j)))) \quad [IV.13]$$



(c)

	biomasse	glucose
t1	1,0	20,0
faible	0,8	0
moyen	0,2	0
élevé	0	1
t2	7,0	4,0
faible	0	0,6
moyen	0,6	0,4
élevé	0,4	0

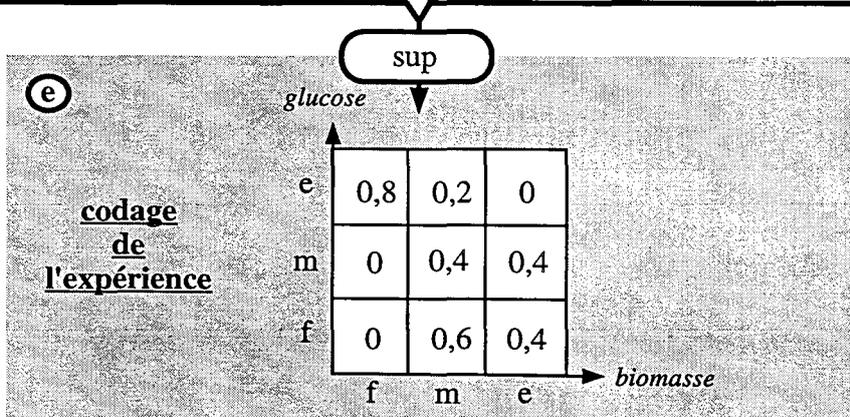
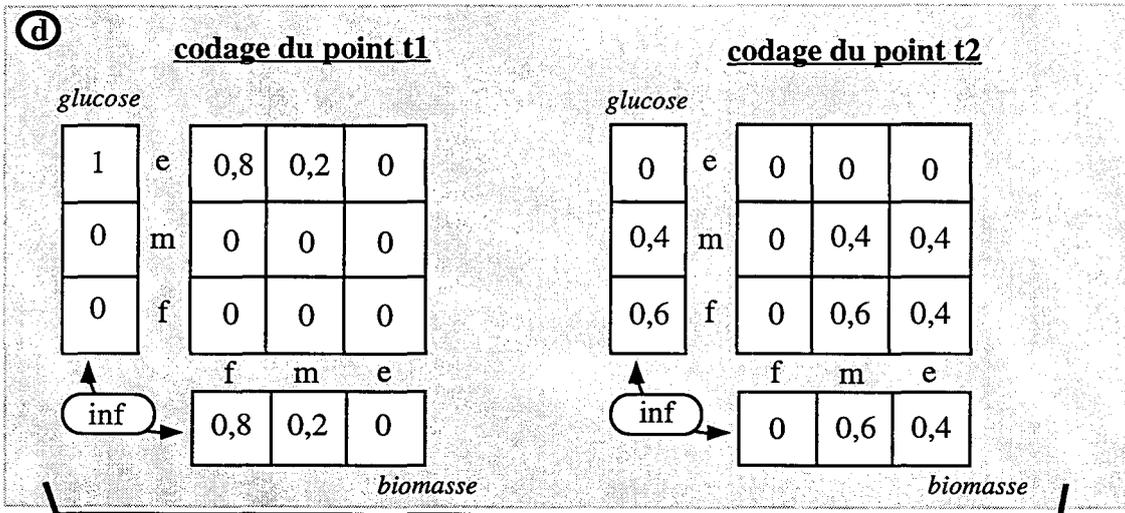


Figure IV.7 : Application pratique de la procédure DDV à une expérience dynamique en biotechnologie.

IV.2.2.3. Applications aux cinétiques et aux modèles biologiques

Dans ce paragraphe, nous allons présenter succinctement, à partir de cinétiques microbiennes et d'un modèle cinétique, différentes applications possibles de la théorie développée ci-dessus. Il s'agit

- de la détermination du domaine expérimental exploré par une expérience, en intégrant ou non l'erreur estimée sur les mesures,
- de la détermination du domaine d'application du modèle, en intégrant ou non l'erreur estimée sur les simulations (c'est à dire la confiance accordée au modèle),
- de la détermination du domaine d'application d'un modèle, en intégrant l'accord entre expériences et simulations,
- de la recherche d'une expérience complémentaire pour accroître le domaine d'application du modèle.

a. détermination du domaine expérimental exploré par une expérience

Dans ce cas précis, on dispose uniquement d'une série de données expérimentales, que l'on jugera sans erreur dans un premier temps. La fonction d'appartenance rattachée aux simulations (μ_{sjk}) n'existe donc pas, et celle rattachée aux mesures expérimentales n'est plus de forme triangulaire, mais se résume à un simple pic au niveau de la mesure elle-même (puisque l'erreur est nulle, ε_{mjk} est nulle (voir figure IV.6). La relation [IV.13] se ramène donc à la forme suivante :

$$r_i = \sup_{(k)} (\inf_{(Lij \in E_i)} (\sup_{(x_j)} \min (x_{mjk} , \mu_{Lij}(x_j)))) \quad [IV.14]$$

En pratique, la démarche pour utiliser la procédure DDV après avoir réalisé une expérience est donc la suivante (figure IV.7) :

- définir les variables d'état (en l'occurrence biomasse et glucose, figure IV.7 (a))
- définir les fonctions d'appartenance, c'est à dire le nombre de niveaux pour chaque variable, les bornes et la forme des fonctions. Par exemple, 3 niveaux (faible, moyen et élevé) ont été choisis pour chacune de nos deux variables. Les fonctions sont triangulaires, de bornes [0 ; 0 ; 5] pour le niveau faible de la biomasse, [0 ; 5 ; 10] pour le niveau moyen, et [5 ; 10 ; 10] pour le niveau élevé (remarque : la borne du milieu indique l'abscisse du sommet du triangle). On procède de même pour le glucose (figure IV.7 (b)). Ces fonctions serviront à coder l'expérience.
- coder chaque point expérimental à l'aide de ces fonctions d'appartenance. Par exemple, le point t1 (défini par une concentration en biomasse de 1,0 g/l et en glucose de 20,0 g/l) sera codé de la manière suivante : degré d'appartenance de la valeur 1,0 au niveau faible de la biomasse = 0,8 ; au niveau moyen = 0,2 et au niveau élevé de la biomasse = 0. Pour le glucose, la valeur 20,0 est codée 0 ; 0 ; 1 (figure IV.7 (c)). Cette étape correspond à la parenthèse "sup min" de la relation [IV.13].
- calculer le degré de réalisation des 9 expériences de référence (déterminées par la combinaison des niveaux : "biomasse faible-glucose faible" ; "biomasse faible-glucose moyen" ; etc ...) pour chaque point expérimental. Par exemple, le degré de réalisation de l'expérience "biomasse moyen-glucose

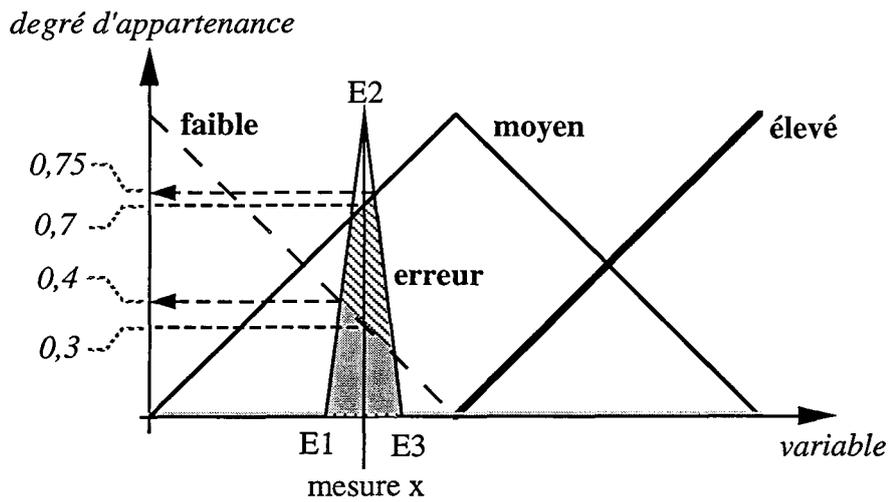


Figure IV.8 : Principe de la prise en compte de l'erreur de mesure dans la détermination du degré d'appartenance aux différentes classes d'une variable d'état.

fort” au point t1 est donné par le minimum de 0,2 et 1, soit 0,2 (figure IV.7, (d), codage du point t1). Cette étape correspond à l’opérateur “inf” de la relation [IV.13].

- calculer les degrés de réalisation de chaque expérience de référence par l’ensemble des points expérimentaux, grâce à l’opération “sup” effectuée sur tous les points expérimentaux. Dans notre exemple, on prend le maximum (équivalent de l’opérateur “sup” de la relation [IV.13]) de t1 et t2 pour chacune des 9 expériences de référence (figure IV.7, (e)). C’est ce dernier résultat que nous définissons comme étant le domaine de validité de l’expérience. Ainsi, la zone “biomasse moyen-glucose fort” n’est représentée qu’avec un degré de 0,2 par les données expérimentales. En d’autres termes, notre expérience n’explore pas bien cette zone, comparée à la zone “biomasse faible-glucose fort”, dont le degré de réalisation vaut 0,8.

Si maintenant on désire introduire une erreur sur les mesures, ces dernières ne seront alors plus considérées comme un trait vertical, mais elles seront représentées par une fonction d’appartenance μ_{mjk} de forme triangulaire pour les mesures x_j , avec comme base l’erreur estimée ϵ_{mjk} (figure IV.6). La relation devient :

$$r_i = \sup(k) (\inf_{(Lij \in E_i)} (\sup_{(x_j)} \min (\mu_{mjk} (x_j) , \mu_{Lij} (x_j)))) \quad [IV.15]$$

Considérons la figure IV.8, qui illustre le traitement de l’erreur de mesure. La mesure x , ponctuelle, est représentée par un trait vertical. Son degré d’appartenance à la classe “faible” est de 0,7, de 0,3 à la classe “moyen” et 0 à la classe “élevé”. L’erreur estimée sur cette mesure x est introduite sous la forme d’une fonction triangulaire, décrite par les points E1, E2 et E3. La fonction intersection est définie comme étant la valeur minimum, en tous points, de la fonction d’erreur et de la fonction d’appartenance d’une classe donnée. La valeur maximale de l’aire comprise sous la courbe de cette fonction intersection détermine le degré d’appartenance de la “mesure+erreur” à la classe considérée. Ainsi par exemple, l’aire grisée représente la fonction intersection entre la fonction d’appartenance d’erreur et celle décrivant la classe “faible” ; le degré d’appartenance de la “mesure+erreur” à cette classe “faible”, c’est à dire le sommet du trapèze grisé, vaut donc 0,4. De même, le degré d’appartenance de la “mesure+erreur” à la classe “moyen” est obtenu en prenant le sommet du trapèze hachuré, soit 0,75 (Le trapèze hachuré correspond à la fonction intersection de la fonction d’erreur au point x avec la fonction représentant la classe “moyen”).

On remarquera que l’introduction de l’erreur de mesure a pour conséquence d’augmenter le degré d’appartenance. Cette augmentation n’est pas le résultat d’une appartenance plus forte de la mesure x à la classe considérée, mais provient au contraire d’une incertitude supplémentaire. Ainsi, pour tenir compte de l’erreur, le calcul surestime artificiellement le degré d’appartenance en l’évaluant à sa limite supérieure. C’est une règle générale en logique floue où l’imprécision se traduit par un degré d’appartenance plus large.

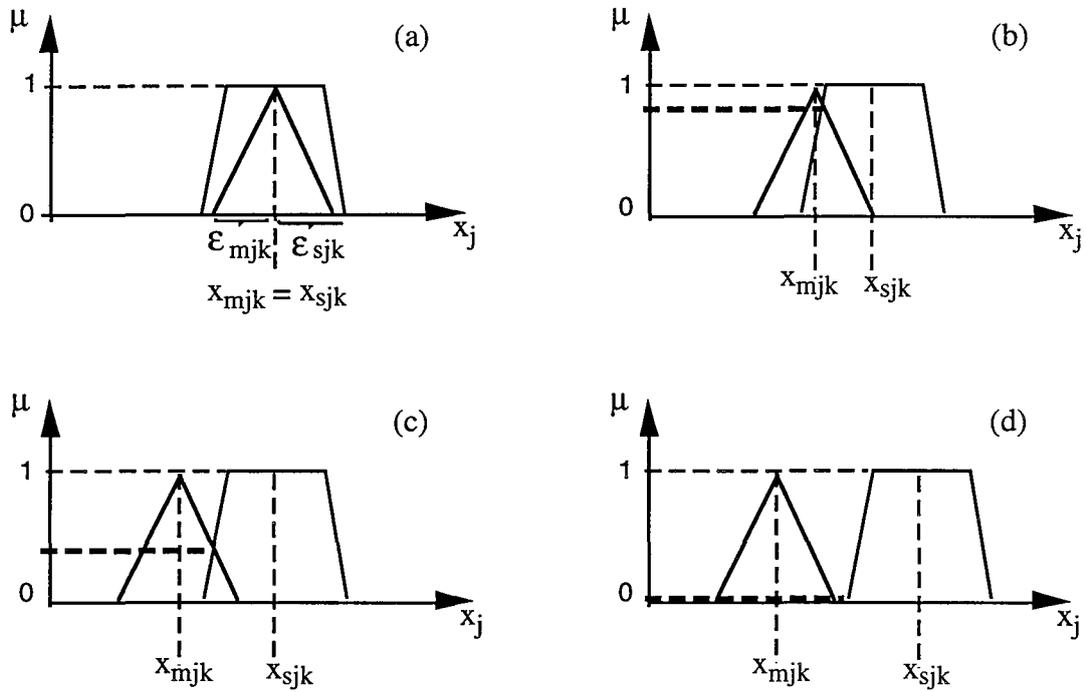


Figure IV.9 : Illustration du concept de cohérence entre mesure et simulation au travers de la théorie des sous-ensembles flous. x_{mjk} et x_{sjk} sont respectivement la mesure et la simulation de la variable x_j au temps t_k . ϵ_{mjk} et ϵ_{sjk} représentent respectivement l'erreur estimée sur les mesures et sur les simulations. μ désigne le degré d'appartenance à la fonction considérée.

b. détermination du domaine d'application d'un modèle

La démarche est exactement la même que ci-dessus puisque l'on considère que le domaine d'application d'un modèle n'est rien d'autre que le domaine expérimental exploré par la ou les expériences qui ont servi à construire ce modèle. Les relations [IV.14] et [IV.15] restent donc valables. On constate bien ici que l'on ne prend pas en compte l'accord entre expériences et modèle puisque la base de calcul est constituée par les seules expériences.

Une autre approche consisterait à déterminer le domaine exploré par le modèle lui-même, c'est à dire que ce sont les simulations qui sont prises comme base de calcul. Selon que l'on désire intégrer ou non l'erreur estimée sur les simulations (ϵ_{sjk} , figure IV.6), on utilisera respectivement les relations [IV.16] et [IV.17] :

$$r_i = \sup(k) (\inf_{(Lij \in Ei)} (\sup_{(xj)} \min (\mu_{sjk} (x_j) , \mu_{Lij} (x_j)))) \quad [IV.16]$$

$$r_i = \sup(k) (\inf_{(Lij \in Ei)} (\sup_{(xj)} \min (x_{sjk} , \mu_{Lij} (x_j)))) \quad [IV.17]$$

c. domaine d'application d'un modèle intégrant la cohérence entre expériences et simulations

C'est l'application la plus intéressante car elle permet de décrire le domaine d'application du modèle et sa qualité, car elle tient compte de l'ajustement entre les mesures et les simulations (intégrant de plus les erreurs estimées sur ces deux types de données). Elle utilise la relation complète [IV.13]. Pour illustrer ce concept de quantification de la cohérence entre mesure et simulation, nous présentons quelques exemples de comparaison d'une mesure x_{mjk} (variable j au temps t_k) accompagnée de son erreur de mesure ϵ_{mjk} , avec la simulation x_{sjk} de cette variable au même temps, accompagnée de l'erreur estimée sur les simulations ϵ_{sjk} (figure IV.9).

Le premier cas (figure IV.9 (a)) suppose que le modèle est parfait, soit $x_{mjk} = x_{sjk}$. Nous avons alors $\min (\mu_{mjk} (x_j) , \mu_{sjk} (x_j)) = 1$.

Le deuxième cas présente une simulation proche de la valeur mesurée expérimentalement, c'est à dire un très bon accord entre mesure et simulation. la valeur de l'expression $\min (\mu_{mjk} (x_j) , \mu_{sjk} (x_j))$ est alors proche de 1 (figure IV.9 (b)). Dans ces deux premiers cas, simulation et expérience seront dites cohérentes.

Dans le troisième cas, la simulation est assez mauvaise et s'éloigne de la valeur mesurée. l'expression $\min (\mu_{mjk} (x_j) , \mu_{sjk} (x_j))$ prend alors une valeur faible, proche de 0 (figure IV.9 (c)).

Enfin, le dernier cas montre un désaccord total entre mesure et simulation, le modèle est faux dans cette zone. Dans ces conditions, $\min (\mu_{mjk} (x_j) , \mu_{sjk} (x_j)) = 0$ (figure IV.9 (d)).

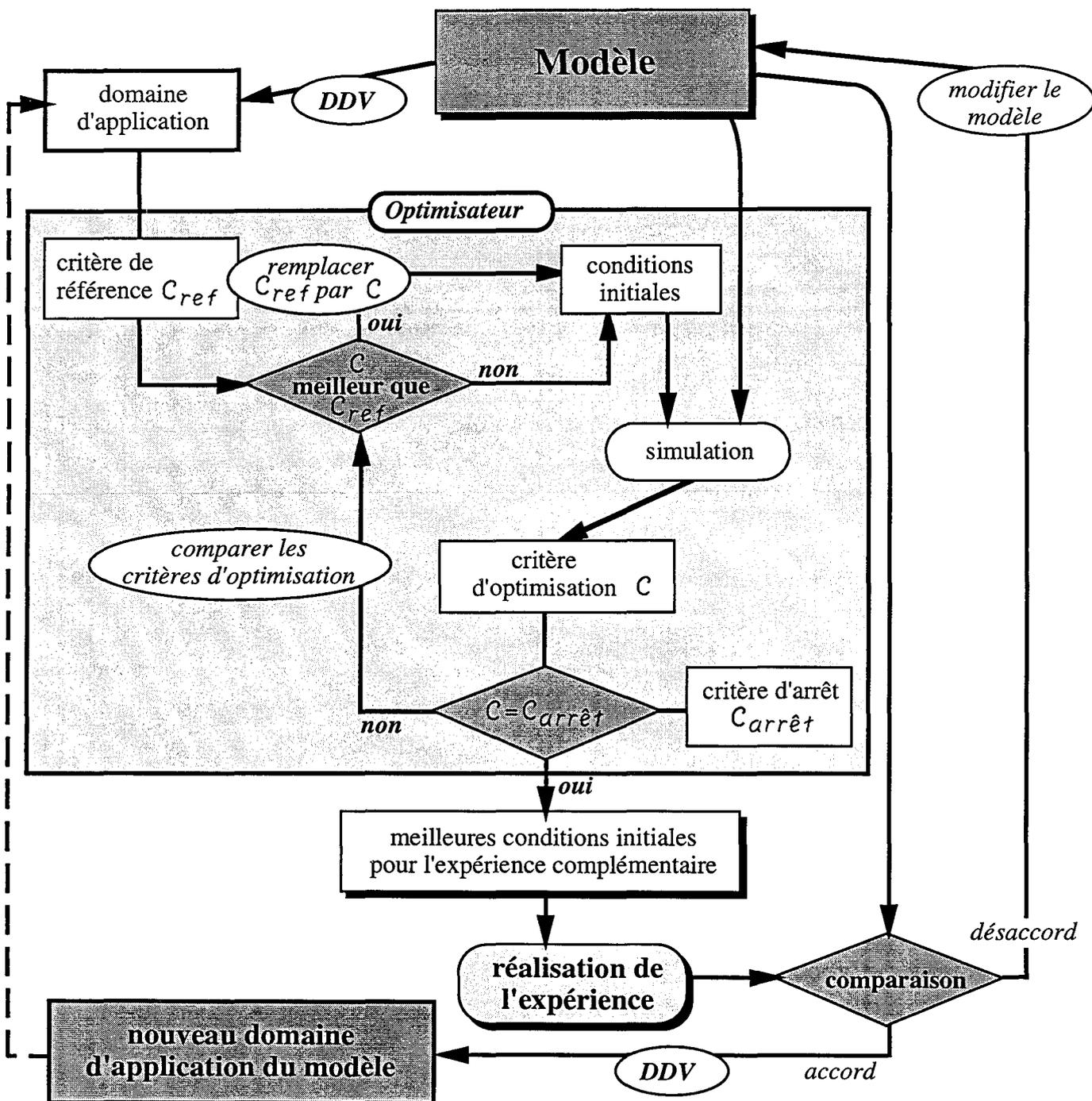


Figure IV.10 : Schématisation de la procédure de recherche d'une expérience complémentaire.

d. recherche d'expériences complémentaires

C'est également une application importante et très intéressante de la procédure DDV. Elle peut constituer une aide à l'expert humain pour choisir une expérience complémentaire. Cette expérience est destinée à apporter de nouvelles informations sur le processus étudié, et doit donc explorer des conditions non représentées par les expériences précédentes. Grâce à la quantification du degré de réalisation de chaque expérience du plan de référence, un optimisateur mathématique va pouvoir rechercher l'expérience qui complétera celle(s) existante(s) de manière à explorer au mieux le plan de référence. En pratique, on cherchera par exemple à minimiser la somme des écarts entre les r_i et le r_{\max} désiré. En théorie, $r_{\max} = 1$, mais on pourra considérer qu'une expérience du plan est satisfaite si son degré de réalisation est supérieur ou égal à un seuil donné, par exemple 0,9.

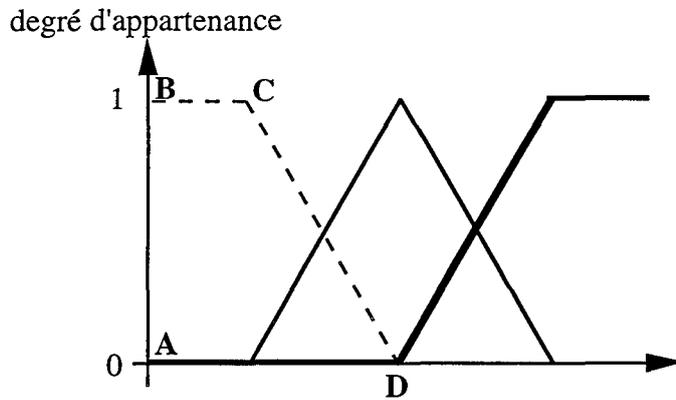
L'optimisateur devra donc choisir des conditions initiales, simuler l'expérience à l'aide du modèle, calculer les r_i et évaluer le critère d'optimisation jusqu'à déterminer la meilleure expérience à effectuer compte tenu du critère fixé. Dans cette procédure de recherche, le modèle est extrapolé à l'ensemble de l'espace d'état. Il faudra donc bien vérifier a posteriori que le modèle et l'expérience réalisée sont cohérents. Dans le cas contraire, il faudra recommencer la procédure en intégrant au modèle les informations apportées par cette nouvelle expérience. L'ensemble de cette procédure est schématisée sur la figure IV.10.

L'utilité d'une telle démarche est de pouvoir appliquer le modèle dans des conditions pour lesquelles il n'avait pas été jugé valide, soit pour un même type de culture (en l'occurrence, discontinue), soit pour d'autres types de culture utilisant des zones de l'espace d'état impossible à observer avec les expériences initiales (exemple d'une culture continue en limitation substrat, qui reflète une zone biomasse faible, glucose faible, très peu représentée en culture discontinue).

Nous avons développé un programme informatique en langage C pour mettre en oeuvre la méthodologie DDV couplée à la recherche d'une nouvelle expérience. Des études sont en cours au laboratoire pour développer les potentialités et les applications de cet outil, que nous ne détaillerons pas d'avantage.

IV.2.3. Applications aux cultures discontinues à 0,45 et 1,5 Osm

Nous utiliserons ici la procédure DDV pour déterminer le domaine expérimental couvert par les cultures discontinues à 0,45 et 1,5 Osm. Nous réaliserons deux calculs différents pour bien illustrer l'intérêt de cette technique : le premier pour déterminer le domaine de validité du modèle à partir de ces expériences, ce que peut faire intuitivement l'expert humain, le second pour déterminer ce domaine en tenant compte de l'accord expérience-modèle, ce qui est beaucoup plus difficile à évaluer par l'expert.



<i>Variable</i>		<i>Classe</i>	<i>Fonction d'appartenance</i> <i>(abscisse des points A, B, C et D)</i>
Biomasse (g/l)	faible	[0 ; 4]	(0 ; 0 ; 2 ; 6)
	moyenne	[4 ; 8]	(2 ; 6 ; 6 ; 10)
	élevée	[8 ; 15]	(6 ; 10 ; 15 ; 15)
Glucose (g/l)	faible	[0 ; 7,5]	(0 ; 0 ; 5 ; 10)
	moyenne	[7,5 ; 12,5]	(5 ; 10 ; 10 ; 15)
	élevée	[12,5 ; 25]	(10 ; 15 ; 25 ; 25)
Pression osmotique (Osm)	faible	[0 ; 1,4]	(0,4 ; 0,4 ; 1,0 ; 1,8)
	moyenne	[1,4 ; 2,2]	(1,0 ; 1,8 ; 1,8 ; 2,6)
	élevée	[2,2 ; 4]	(1,8 ; 2,6 ; 4 ; 4)

Figure IV.11: Définition des variables, de leurs niveaux et des fonctions d'appartenance en rapport avec l'étude de l'effet de l'osmolarité sur des cultures discontinues de *Corynebacterium glutamicum*.

Les variables d'état retenues pour la construction du plan de référence sont la biomasse (X), le glucose (Glc) et la pression osmotique (PO). Trois niveaux ou qualificatifs ont été choisis : faible (f), moyen (m) et élevé (e), dont les limites, déterminées grâce à l'expertise humaine, sont données dans le tableau de la figure IV.11 (2ème colonne). Au total, le plan de référence compte donc 27 expériences définies par toutes les combinaisons des niveaux des variables : “X^f : Glc^f : PO^f”, “X^f : Glc^f : PO^m”, “X^f : Glc^f : PO^e”, etc...

Les fonctions d'appartenance sont choisies de type trapézoïdale aux extrémités du domaine et triangulaire à l'intérieur. Chaque fonction sera définie par quatre points correspondant aux quatre sommets du trapèze ; dans le cas des triangles, les deux sommets d'ordonnée 1 sont confondus (tableau de la figure IV.11, 3ème colonne). Le “codage” des données expérimentales est réalisé grâce à ces fonctions d'appartenance. Le degré d'appartenance à chacune des expériences de référence sera donné par une des relations décrites précédemment ([IV.13] à [IV.17]).

Le premier calcul proposé correspond au codage des données expérimentales, sans et avec erreur sur les mesures. Il utilise les relations [IV.14] et [IV.15]. Les erreurs de mesure que nous avons introduites sont des erreurs absolues de 0,1 g/l sur la biomasse et le glucose, et de 0,05 Osm sur la pression osmotique. Les résultats sont indiqués sur la figure IV.12, sous la forme d'un cube représentant l'espace expérimental, subdivisé en 27 “sous-cubes” correspondant chacun à une expérience de référence. Cet espace a été découpé en tranches suivant la profondeur pour des raisons de lisibilité. La biomasse est indiquée horizontalement, le glucose verticalement et la pression osmotique en profondeur. Si on regarde les deux figures dans leur ensemble, on peut lire des zones (“sous cubes”) ayant un degré d'appartenance élevé qui correspondent aux zones bien représentées par les expériences. Inversement, un degré d'appartenance faible traduit une zone expérimentale faiblement explorée. Il apparaît que les zones peu explorées par les deux expériences considérées sont “biomasse faible : glucose faible”, “biomasse forte : glucose fort” et “biomasse forte : pression osmotique moyenne”, (représentées par **des lignes** de valeurs faibles), et “pression osmotique forte” (représenté par **un plan** de valeurs nulles). En revanche, les zones bien explorées correspondent aux **diagonales** décroissantes des “tranches” “pression osmotique faible” et “pression osmotique moyenne”. Ce profil est typique de cultures discontinues.

Si l'on compare maintenant les deux figures entre elles, on constate que le domaine est plus étendue dans le cas où les erreurs sont prises en compte. Par exemple, le degré de réalisation de l'expérience de référence “biomasse faible : glucose moyen : pression osmotique faible” passe de 0,16 à 0,29. Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'erreur constitue une incertitude qui augmente les degrés d'appartenance, et entraîne donc l'élargissement du domaine de validité. Ceci peut se comprendre intuitivement : pour intégrer l'incertitude sur un point (qui serait alors représenté par un disque et non plus un simple point), il faut bien reculer les limites de l'ensemble qui le contient.

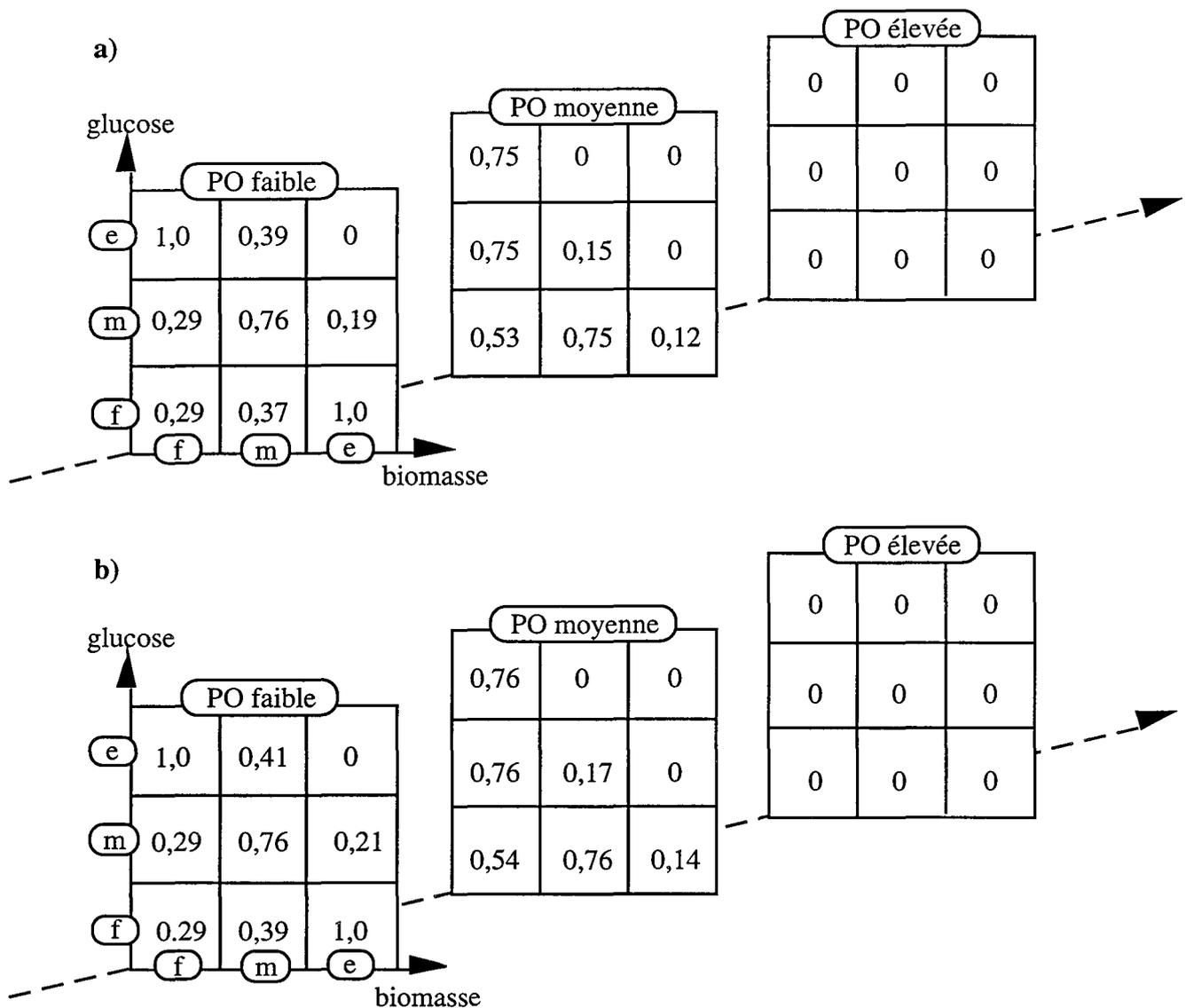


Figure IV.12 : Application de la technique DDV : couverture de l'espace expérimental par les cultures discontinues à 0,4 et 1,5 Osm : **a)** sans erreur sur les mesures. **b)** avec erreur sur les mesures. (Variables : biomasse, glucose, pression osmotique (PO) ; Niveaux : faible (f), moyen (m), élevé (e)).

Un degré d'appartenance proche de 1 indique que l'expérience correspondante est bien représentée par les données expérimentales. Inversement, un degré d'appartenance proche de 0 reflète une expérience peu représentée.

Le deuxième cas présente l'application complète de la procédure DDV (relation [IV.13]). Les résultats du calcul des degrés d'appartenance sont donnés sur la figure IV.13. Le domaine de validité reste globalement le même, et les différences avec la figure IV.12-b ne sont visibles que pour la zone "biomasse faible : glucose faible : pression osmotique moyenne", qui passe de 0,54 à 0,41. En fait, le domaine de validité obtenu par les valeurs expérimentales est inchangé lorsqu'il y a accord entre modèle et expérience, mais dès qu'il y a désaccord, on se trouve en face d'une situation de conflit qui provoque une diminution de la validité du modèle dans la zone considérée. Si on se reporte aux cinétiques (figure IV.3) et aux définitions des fonctions d'appartenance (figure IV.11), le désaccord au niveau de la concentration du glucose est bien reflétée par la zone énoncée ci-dessus.

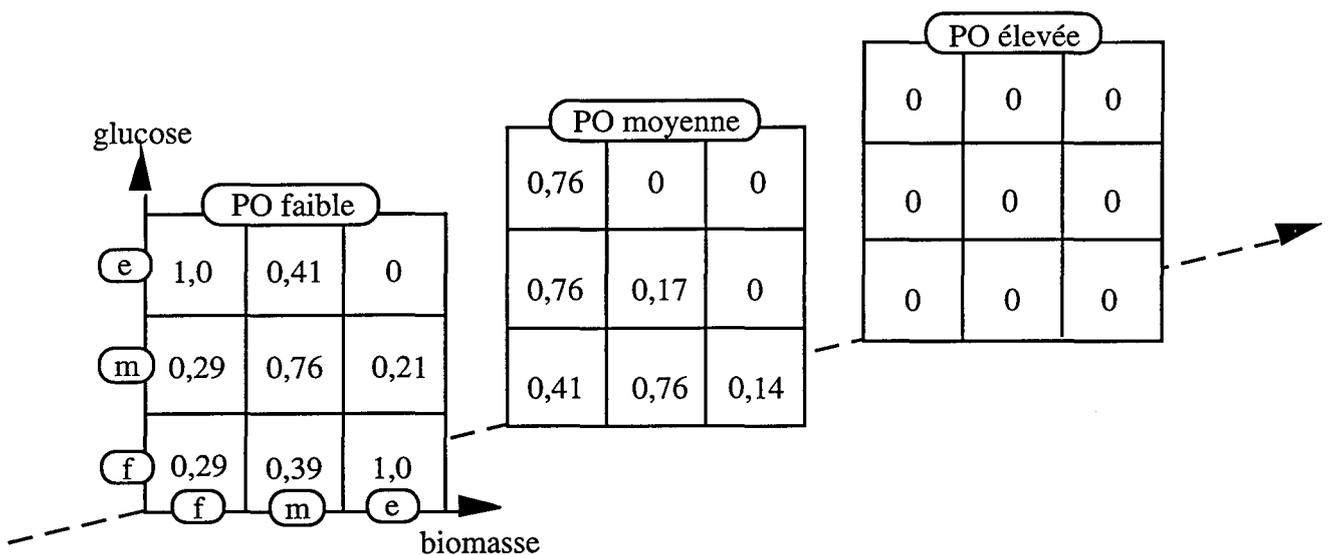


Figure IV.13 : Application de la technique DDV : détermination du domaine de validité du modèle prenant en compte la cohérence entre les données expérimentales accompagnées de l'erreur de mesure (0,4 et 1,5 Osm) et les simulations accompagnées de l'erreur de simulation. (Variables : biomasse, glucose, pression osmotique (PO) ; Niveaux : faible (f), moyen (m), élevé (e)). Un degré d'appartenance proche de 1 indique que l'expérience correspondante est bien représentée par les données expérimentales. Inversement, un degré d'appartenance proche de 0 reflète une expérience peu représentée.

IV.3.3. Interprétation du degré de réalisation d'une expérience de référence

Le degré de réalisation d'une expérience de référence correspond donc au degré de réalisation de cette expérience par les points expérimentaux. Le degré de validité d'un modèle tient en plus compte de l'ajustement des données expérimentales avec celles simulées pour l'expérience de référence considérée. Ainsi, plus le degré est proche de 1, mieux l'expérience de référence est représentée par les données expérimentales et meilleur est le modèle dans cette zone. Au contraire, un

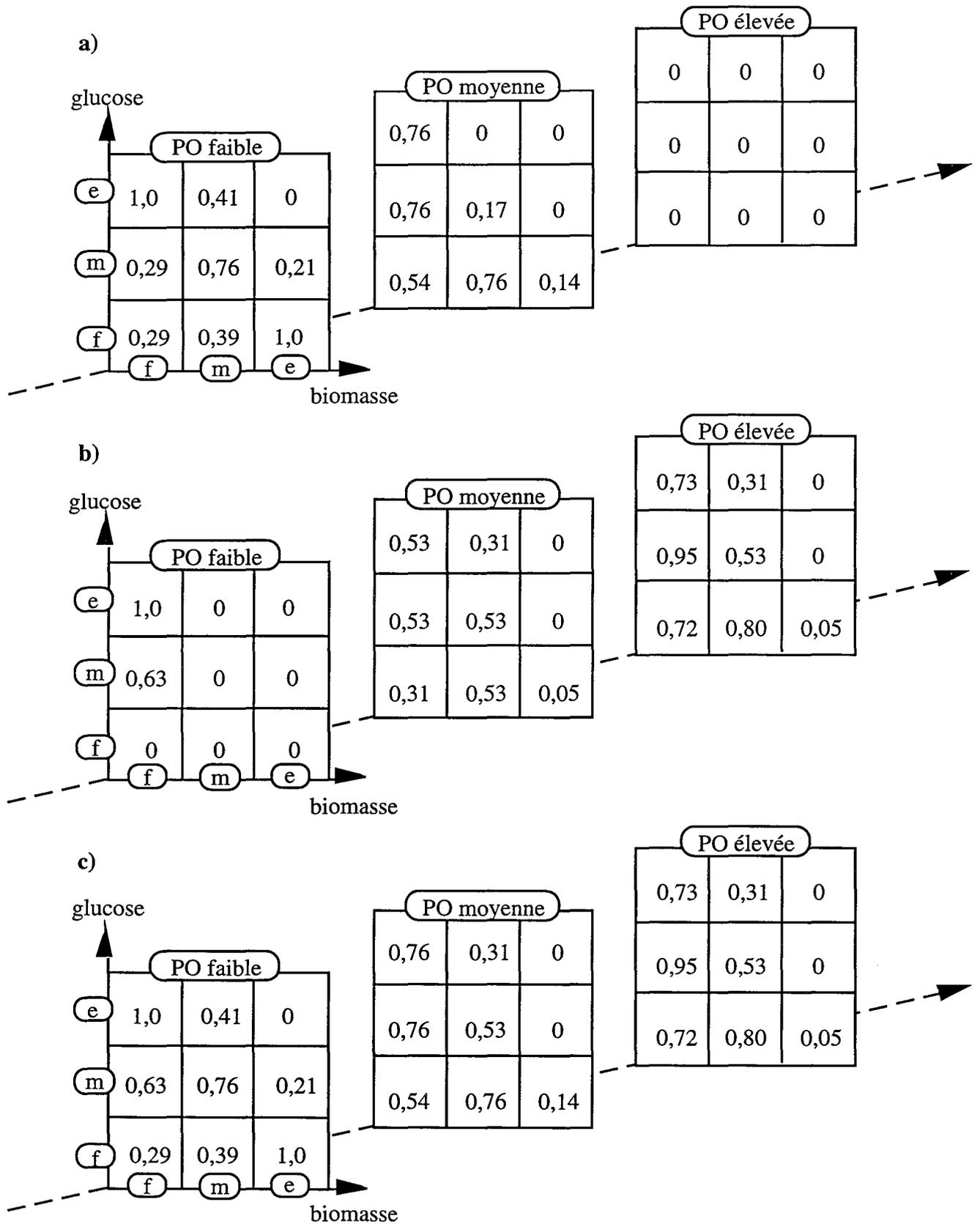


Figure IV.14 : Domaine de validité du modèle.

(a) en se basant sur les expériences à 0,45 et 1,5 Osm, avec erreur de mesure

(b) expériences à 2,2 , 2,7 et 3,0 Osm avec erreur

(c) résultante prenant en compte toutes les expériences avec erreur.

degré proche de 0 traduira une mauvaise représentation de cette expérience de référence et/ou un modèle qui donne des simulations qui ne s'ajustent pas aux points expérimentaux.

Il n'existe pas de règle précise pour interpréter un degré de réalisation intermédiaire. Cela dépend du but fixé et de l'expertise humaine. En pratique, un degré de réalisation égal à 1 n'est quasiment jamais rencontré, et l'expert devra alors se fixer un seuil au-dessus duquel il considérera l'expérience effectuée. Le choix du seuil dépend de la précision et de la fiabilité requises : pour un résultat très fiable, le seuil doit être élevé (par exemple 0,9), il peut être plus faible pour un résultat plus moyen (par exemple 0,6). De la même manière, une expérience de référence sera considérée non réalisée en dessous d'un seuil donné, comme 0,1 par exemple.

En tous cas, le calcul du degré de réalisation dépend du découpage de l'espace d'état, c'est à dire du nombre de niveaux par variable. Plus le découpage sera fin, meilleure sera la représentation de l'expérience initiale. Dans notre exemple, le découpage de l'espace d'état semble trop grossier puisqu'une seule zone subit une variation lorsqu'on intègre la cohérence entre modèle et expérience alors que d'après les cinétiques à 1,5 Osm pour le glucose, on aurait pu s'attendre à plus de changements. Inversement, le découpage ne doit pas être trop fin non plus car chaque zone doit refléter un minimum de points expérimentaux pour que le calcul du degré de réalisation ait un sens. Il faut donc trouver un juste équilibre entre finesse du résultat et valeurs significatives (voir également la fin du paragraphe IV.3.4.).

Ces considérations sont encore à l'étude au laboratoire pour définir et maîtriser les paramètres influents de cette nouvelle technique.

IV.3.4. Elargissement du domaine de validité du modèle

Il est possible de quantifier l'apport des trois nouvelles expériences quant à la couverture de l'espace expérimental. On peut en effet montrer que la couverture de l'espace d'état résultant de deux expériences distinctes est l'union de la couverture de l'espace d'état obtenue par chaque expérience séparée. Au sens logique du terme, l'union se traduit par l'opérateur "max" défini par $\max(A,B)=A$ si $A>B$, et par l'opérateur "sup" s'il s'agit d'une fonction continue. Le degré de réalisation de chaque expérience de référence par l'ensemble des données acquises s'obtient en prenant le "max" des degrés de réalisation des différentes séries d'expériences : "0,45 et 1,5 Osm", "2,2 Osm", "2,7 Osm" et "3 Osm". La figure IV.14 rappelle les degrés de réalisation du plan de référence par les cultures à 0,45 et 1,5 Osm (figure IV.14-(a)), puis présente ceux calculés pour les trois nouvelles expériences ainsi que le résultat final prenant en compte toutes les expériences réalisées (figure IV.14-(b) et (c) ; tous les calculs sont effectués en intégrant une erreur sur les mesures, comme décrit précédemment). On observe que les nouvelles expériences permettent bien de combler une partie des lacunes à pression osmotique élevée (PO élevée). Il reste cependant quelques zones de degré de validité faible telles que

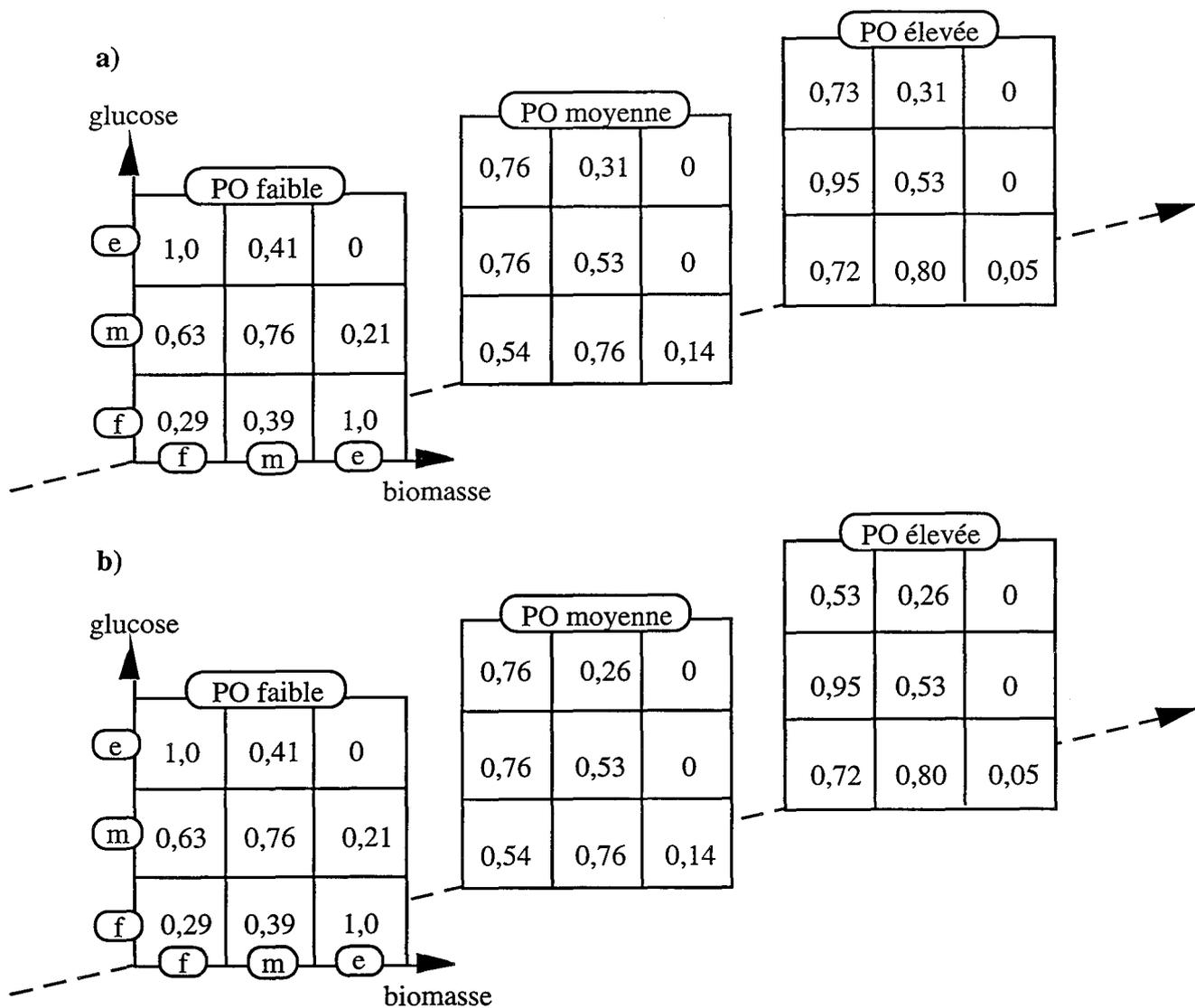


Figure IV.15 : Domaine de validité du modèle prenant en compte l'accord entre expériences et simulations.

(a) résultante de toutes les expériences avec erreur.

(b) résultante incluant les simulations par le modèle, avec erreur.

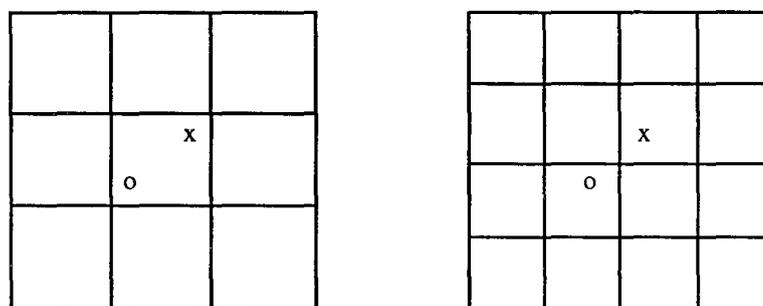


Figure IV.16 : Influence du "découpage" de l'espace d'état.

Le grand carré symbolise l'espace d'état subdivisé en 9 et 16 zones par la définition des fonctions d'appartenance de la logique floue. x et o représentent deux points expérimentaux.

le plan “biomasse élevée” (excepté “biomasse élevée : glucose faible : pression osmotique forte” qui montre une valeur de 1 due aux premières cultures). Ces lacunes résiduelles proviennent du fait que l’augmentation de l’osmolarité diminue la production de biomasse ne permettant plus d’atteindre le niveau “élevé” de cette variable. Le moyen de combler ces zones seraient, par exemple, d’ensemencer avec une forte quantité de biomasse. L’intérêt d’explorer également ces zones du domaine d’état est de pouvoir appliquer le modèle pour d’autres types de culture que le mode discontinu, puisque ces conditions (biomasse et glucose élevés simultanément) peuvent se rencontrer en mode semi-continu ou continu.

La figure IV.15 montre l’accord entre points expérimentaux et simulations pour l’ensemble des expériences réalisées. Nous rappellerons tout d’abord que la détermination de la validité du modèle ne prend pas en compte la proline dans l’exemple que nous avons développé. L’analyse de la cohérence des simulations avec les données expérimentales ne doit donc se faire que sur la biomasse et le glucose. Ceci explique que les différences entre les expériences “seules” (figure IV.15-(a)) et les “expériences+modèle” (figure IV.15-(b)) ne soient pas très importantes. Elles sont surtout localisées à PO élevée, pour “biomasse faible : glucose élevé” et pour “biomasse moyenne : glucose élevé”. Ces zones montrent une diminution du degré de validité du modèle (de 0,73 à 0,53 dans le premier cas et de 0,31 à 0,26 dans le second) qui traduit un désaccord entre les simulations et les données expérimentales en fin de cultures à pressions osmotiques élevées (voir en particulier 2,2 Osm, figure IV.4).

Pour expliquer le peu de différences entre les deux calculs précédents, on peut impliquer un découpage trop grossier de l’espace d’état. Par exemple, on notera que la valeur du degré d’appartenance correspondant à “biomasse moyenne : glucose moyen : pression osmotique élevée” avec une valeur de 0,53 ne varie pas malgré le désaccord expérience-modèle. En choisissant plus de 3 niveaux, le découpage aurait été plus fin et aurait permis de mettre en valeur le désaccord. Ceci est illustré sur la figure IV.14. Pour bien comprendre cette figure, nous précisons que l’interprétation graphique du degré d’appartenance à une expérience du plan de référence est constituée par la distance du point considéré par rapport au centre de la zone considérée de l’espace d’état : ainsi, le degré de réalisation sera d’autant plus élevé que le point considéré est proche du centre de la zone. Deux points (en l’occurrence expérience et simulation) équidistants du centre ont donc même degré d’appartenance. Pour les départager, il faut modifier les fonctions d’appartenance, c’est à dire le découpage de l’espace d’état en modifiant leurs bornes ou leur nombre. Sur la figure, un découpage en 16 zones permet de séparer les deux points qui ne l’étaient pas dans le découpage en 9 zones.

IV.4. Conclusions sur la modélisation cinétique

■ le modèle cinétique proposé décrit l'influence de l'osmolarité du milieu sur la croissance de la bactérie en cultures discontinues. Nous avons établi des relations entre les principaux paramètres cinétiques et la pression osmotique, qui conduisent à des résultats satisfaisants quant à la simulation de la croissance, de la consommation de glucose et de la production de proline considérée extracellulairement. Ce modèle nous a permis de montrer que l'hypothèse d'une synthèse de proline associée à la croissance est suffisante pour représenter la première phase post choc osmotique (phase à $Y_{\text{pro}/X}$ élevé, voir les cinétiques expérimentales).

En revanche, la production de proline en fin de culture est mal estimée et nécessiterait encore des améliorations. Deux voies pourraient être envisagées : la première serait une inhibition de la proline sur sa synthèse, la seconde reviendrait à introduire une synthèse de proline non associée à la croissance en première phase post choc, en plus d'une synthèse liée à la croissance, mais plus faible que celle utilisée dans le modèle (par exemple, en utilisant le $Y_{\text{pro}/X}$ mesuré en deuxième phase post choc).

■ La technique de détermination du domaine de validité (DDV) mise au point pour déterminer le domaine d'application d'un modèle est nouvelle, performante et simple à utiliser.

L'utilité première de ce type d'outil réside dans la quantification de la réalisation de chaque expérience de référence. Si l'expert peut intuitivement localiser les zones non explorées, il lui est difficile de quantifier et de définir ces zones avec précision. Il peut donc être efficacement secondé dans cette tâche par la procédure DDV. D'autre part, la procédure DDV offrent la possibilité de tenir compte de l'erreur de mesure et/ou de simulation et de quantifier l'accord entre les données expérimentales et les simulations du modèle.

La seconde utilité apparaît pour l'étude de procédés moins bien maîtrisés, pour des variables moins "conventionnelles" ou lorsque les données sont très nombreuses. En effet, la procédure DDV n'offre aucune limitation théorique dans le nombre de variables et de classes. Le découpage de l'espace expérimental peut donc être plus ou moins fin selon les désirs de l'utilisateur. Cependant, la technique doit garder une signification physique et il est nécessaire que chaque classe compte un nombre minimum d'échantillons, de points expérimentaux (cf annexe 1).

Enfin, elle permet de quantifier la cohérence entre les données expérimentales et les simulations d'un modèle, c'est à dire l'ajustement de ce modèle aux données expérimentales.

Chapitre 5

La méthodologie “Métaflux”

SOMMAIRE du CHAPITRE V

V.1. La méthodologie Métaflux.....	133
V.1.1. publication	134
ABSTRACT	134
INTRODUCTION.....	135
MATERIALS AND METHODS.....	136
THE "METAFLUX" METHOD FOR METABOLIC FLUX EVALUATION	137
The general principles.....	137
The metabolic network for <i>Corynebacterium glutamicum</i>	138
Regeneration reactions for the consumed intermediates.....	139
The determination of the individual metabolic map for a produced metabolite .	141
Selection between competing biosynthetic pathways	143
Determination of the individual lysine map.....	143
The individual map for biomass production.....	145
The determination of the global flux distribution	146
METABOLIC FLUX EVALUATION DURING LYSINE FERMENTATION....	147
Kinetics of lysine fermentation.....	147
Metabolic flux distribution.....	148
CONCLUSIONS	149
REFERENCES	150
V.1.2. Discussion générale sur Métaflux	152
V.1.2.1. Concept général.....	152
V.1.2.2. Intégration de nouvelles données spécifiques aux Corynébactéries	152
V.2. Influence de la biomasse	153
V.2.1. Influence de la composition macromoléculaire	153
V.2.2. Influence de la composition élémentaire.....	154
V.2.3. Influence de la construction de la carte biomasse.....	154
V.3. Procédures annexes.....	157
V.3.1. Construction automatique des cartes individuelles de biosynthèse.....	157
V.3.1.1. Principe	157
V.3.1.2. Procédure de calcul	158
V.3.1.3. Validation : carte individuelle de la lysine	158
V.3.1.4. Limites d'application	158

V.3.2. Analyse de sensibilité de la vitesse de consommation du glucose et de la participation de la voie des pentoses par rapport à la production d'un métabolite	159
V.3.2.1. Principe et interprétations.....	159
V.3.2.2. Applications	160
V.4. Comparaison Métaflux - Bionet.....	165
V.4.1 Les réseaux métaboliques	165
V.4.2. Les fichiers de données.....	166
V.4.3. Calcul des flux et comparaison des résultats.....	167

La méthodologie "Métaflux"

Une orientation récente de la recherche en biotechnologie est l'étude, la maîtrise et la modification du métabolisme cellulaire *in vivo*. Ceci a conduit au développement de techniques analytiques de plus en plus précises et rapides, de mesures expérimentales *in vivo*, mais également d'outils mathématiques et informatiques de simulation du métabolisme cellulaire. Parmi ces derniers, les méthodes d'évaluation des flux métaboliques tiennent une place importante. Ces outils sont de complexité variable, allant du simple tableur, facile d'accès mais peu performant, au logiciel très complet, performant mais difficile à mettre en œuvre. Nous avons voulu développer un outil intermédiaire, à la fois simple à comprendre et à utiliser mais suffisamment puissant pour permettre l'étude et l'exploitation des réseaux biochimiques. Les objectifs de ce chapitre sont d'expliquer la construction et le fonctionnement de notre méthode (baptisée **Métaflux**), de présenter les procédures qui permettent de l'utiliser et de l'adapter à d'autres réseaux biochimiques, et d'en comparer les résultats avec ceux de la méthode de référence actuelle (Bionet, Vallino et Stephanopoulos (1990)).

Nous présenterons successivement

- l'outil **Métaflux**, sous la forme d'une publication. L'algorithme développé permet de calculer les flux carbonés à partir des seules données biochimiques et des vitesses de productions des métabolites extracellulaires (acides aminés, acides organiques, trehalose...) et de la biomasse. Les vitesses de consommation de la source carbonée, les échanges gazeux ne sont pas requis pour le calcul, mais sont des résultats de la procédure Métaflux. Notre outil présente donc un aspect prédictif à opposer à celui d'autres méthodes basées sur la réconciliation de l'ensemble des données à disposition, telles que Bionet.
- l'**influence de la biomasse** (composition élémentaire CHON, composition macromoléculaire, voie de biosynthèse) sur le calcul des flux. Ce point particulier est valable pour la quasi totalité des méthodes d'évaluation de flux métaboliques puisqu'elles reposent presque toutes sur la méthode de biosynthèse simplifiée développée par Ingraham (1983). Cependant, certains auteurs tels que Péquignot (1995) ont choisi une autre approche, plus complexe mais plus proche de la réalité biochimique (voir chapitre I).
- des **procédures informatiques annexes**, qui confèrent à Métaflux une convivialité, une souplesse et une puissance supplémentaire. En l'occurrence, deux annexes ont été développées : une procédure de **construction automatique des cartes individuelles**, qui permet de calculer

voie de biosynthèse donnée ; et une procédure d'**analyse de sensibilité** du calcul des flux par rapport à la variation de la vitesse spécifique de production d'un métabolite choisi.

- une **comparaison avec le logiciel Bionet**, par le biais d'un exemple traité par les deux méthodes.

V.1. La méthodologie Métaflux

V.1.1. publication

METAFLUX : A New Method for Cellular Flux Analysis Based on the Concepts of Individual Metabolic Maps for Metabolites and Biomass Production

Nicolas Kuehm, Jean Luc Simon and Jean Marc Engasser

Abstract : In order to analyze metabolic fluxes within the central metabolism of *Corynebacteria* on glucose, we developed a new methodology named Metaflux. It relies on an assumed biochemical reaction network for the conversion of consumed glucose into biomass and excreted metabolites. Input data consist of extracellular production rates and a pseudo-steady state approximation is assumed for all the intracellular metabolites. The central feature of Metaflux is to consider the self-sufficiency for the individual metabolites and biomass producing pathways in terms of intermediate compounds regeneration. A set of regeneration reactions for these metabolic intermediates and cofactors was identified and is used to obtain individual metabolic maps representing the flux distribution through the central metabolism for the production of each excreted metabolite. The global biochemical network is then restored adding all the individual contributions. Applied to lysine production by *Corynebacterium glutamicum* in batch culture on glucose, this procedure leads to a pentose phosphate pathway participation of 54% during the growth phase, increasing to 66% during lysine production. The part of the anaplerotic pathway, represented by phosphoenolpyruvate carboxylase, is found to increase from 25% in growth phase up to 50% in lysine production phase.

Key words : metabolism modeling - carbon flux analysis - *Corynebacterium glutamicum* - Lysine

INTRODUCTION

Flux analysis using mass balance techniques have been recently introduced to evaluate the fluxes through the metabolic pathways from the measured substrate uptake rates and biomass and metabolites production rates. Theoretical flux analysis is a valuable method for the consolidation and validation of metabolic networks in a living cell. It gives an idea of the carbon partitioning between the competing reactions of the central metabolism, and helps identifying the anaplerotic and cofactor regeneration reactions. It can also be used to determine the maximum theoretical conversion yield of sugar into a metabolite through a given biochemical network. Moreover it may contribute to the identification of metabolic bottlenecks and key branch points, and thus provide a rationale approach for the application of genetic engineering in order to reorient the cellular metabolism¹⁰.

Published flux analysis procedures rely first on a known or assumed biochemical reaction network for the conversion of a consumed carbon source into biomass and excreted metabolites. Second, they consider a pseudo-steady state approximation for all the intracellular metabolites, which amounts to global regeneration of all the intermediates and cofactors.

The simplest approach for flux evaluation is the "top-down" procedure in which the fluxes are calculated stepwise from the measured carbon source uptake rate to the measured metabolites productions rates¹. For each intracellular metabolite the total production flux is taken equal to the total transformation rate. When reaching a node of the network where a metabolite can be transformed by two or several competing enzymatic reactions, a partition of the flux between the possible pathways has to *a priori* be postulated. A different and more global approach, called Bionet, has been proposed by Vallino and Stephanopoulos¹¹. The pseudo-steady state approximation for intracellular metabolites is used to generate a bioreaction network matrix equation. Once constructed, singularity and sensitivity analyses routines are applied to determine if the system is well defined. Often these algebraic systems have more equations than unknown parameters and redundancy analysis is thus used to check the consistency of measurements and the pseudo-steady state analysis approximation. Least-squares or quadratic programming techniques can then be employed to solve the equations and produce an estimate of the carbon fluxes. This procedure does not require an *a priori* knowledge of the flux distribution at the nodes of the network, but a barrier to its more widespread use is the mathematical nature of the matrix operation involved. When many intracellular metabolites are considered the representational matrices become very large and the overall manipulations cumbersome.

We here describe a new flux analysis procedure, named "Metaflux", which does not make use of a mathematical matrix approach, but instead relies on a more biochemical analysis of intracellular metabolism. The basic idea in the Metaflux method is to individually consider the different pathways of conversion of the consumed carbon source into either the formed biomass or the excreted

metabolites, and to apply the principle of self-sufficiency to each of the individual pathways in terms of intermediates regeneration. The general methodology of Metaflux is described in detail in a first part, then used for the evaluation of carbon flux distribution through the central pathways of *Corynebacterium glutamicum* during a lysine producing fermentation.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and medium : The used *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 21543 requires homoserine and leucine for growth. Stock cultures were lyophilized in brain heart medium (DIFCO) and skim milk, and stored at -20°C. Working cultures were maintained at 4°C on brain heart agar plates and transferred at 1 month intervals. Fermentations were carried out on the following medium composition per liter of distilled water : 33 g glucose·H₂O, 3 g NH₄NO₃, 15 g NH₄Cl, 2 g Na₂SO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 3.4 g KH₂PO₄, 10 mg L-cysteine, 10 mg ethyle gallate, 0.1 mg biotine, 0.1 mg thiamine, 90 mg Na₂B₄O₇, 40 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 130 mg CuCl₂, 1 g FeCl₃, 90 mg ZnSO₄·7H₂O, 70 mg MnCl₂·4H₂O, 100 mg L-leucine, 100 mg D-L-homoserine, 3 g urea. Inorganic compounds were obtained from Sigma Chemical Co., vitamins and amino acids from Fluka. Glucose, mineral salts and oligoelements were autoclaved separately at 121°C for 20 minutes. Vitamins and urea were filtered separately on a 0.22 µm Millipore membrane.

Fermentation : 300 ml baffled Erlenmeyer flasks containing 30 ml of medium were inoculated with a small colony of the working culture that was grown overnight on a brain heart agar plate at 30°C. Flasks cultures were used to inoculate 2 liters reactor (Biolafitte) with 1 liter working volume at 30°C. Initial biomass concentration was about 0.025 gDW.l⁻¹. Dissolved oxygen was monitored by an Ingold oxygen electrode, and maintained above 20% of saturation by manually adjusting impeller rpm. Culture pH was monitored by an Ingold electrode and controlled at pH 7.0 by the addition of sodium hydroxyde 10 N.

Analysis : Biomass dry weight was determined by centrifuging 20 ml samples at 3000 g for 10 min, washing the cell pellet twice with water, and drying it for 24 h at 105°C. The C, H, O, N elemental composition of *Corynebacterium glutamicum* was measured by the CNRS analysis department (Vernaison, France). Glucose was measured enzymatically with a Technicon auto-analyser. Amino acids were measured from the supernatant on GPC (Packard) after derivatization with isobutanol.

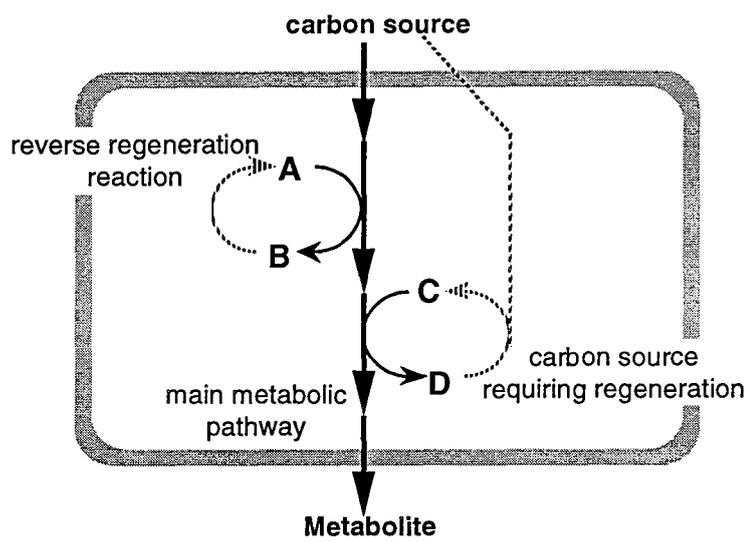


Figure 1 : Concept of individual synthesis pathway for a given metabolite.

THEORETICAL : THE "METAFLUX" METHOD FOR METABOLIC FLUX EVALUATION

The general principles

The Metaflux method was designed to calculate intracellular fluxes from externally measured cell kinetics. The metabolic reactions leading from the consumed carbon source to the excreted metabolites and to the biomass precursors, as well as the anaplerotic and other intermediates regeneration reactions have to be specified. In addition Metaflux requires the following data : i) the specific rate of cell growth; ii) the specific rates of metabolites production ; iii) the biochemical composition of cellular biomass in carbohydrates, proteins, lipids, RNA, DNA and other significant components ; iv) the stoichiometry of the synthesis reaction of biomass from metabolic precursors. The specific rates of carbon source uptake or of CO₂ production are not necessary for the flux evaluations. If available they are nevertheless useful for the validation of the procedure.

Central to the flux analysis procedure is the concept of the individual metabolic map for an excreted product and for the formed biomass⁸. The individual map first considers the biochemical reactions sequence converting the consumed carbon source, generally a sugar, into a given metabolite. Most often this sequence is made of the common fueling reactions of the central metabolism and of the individual pathway leading to the metabolite. The individual map takes also into consideration the regeneration of the intermediates which are consumed or produced along the main pathway. A consumed intermediate or cofactor can be directly regenerated, if available, from a related compound produced at an other point of the pathway. Alternatively, it may be indirectly regenerated from the consumed carbon source (Figure 1). Most common intermediates to be considered are the major cofactors, ATP, ADP, AMP, NAD, NADH, NADP, NADPH, FAD, FADH, as well as other compounds as pyruvate, phosphoenolpyruvate, glutamate, α -ketoglutarate, succinate, succinyl coenzyme A, acetyl coenzyme A, oxaloacetate, coenzyme A. Regeneration reactions are thus associated to the main metabolic pathway for all the produced intermediates.

The basic hypothesis of the Metaflux procedure is to consider each biosynthetic pathway as self-sufficient in terms of intermediates regeneration. Each intermediate consumed in the main pathway is regenerated either by an other reaction of the considered pathway, or from the consumed substrate by a sequence of independent reactions. Application of this principle for a given metabolite yields the total molar amount of substrate necessary for the biosynthesis of one mole of metabolite, which is calculated as the sum of the molar quantity necessary for the synthesis of one mole of metabolite following the main pathway, and of the molar quantity necessary for the regeneration of the consumed intermediates. This procedure also gives the distribution of the carbon flux at the major nodes of the central pathways, such as the proportion of carbon flux entering the pentose phosphate

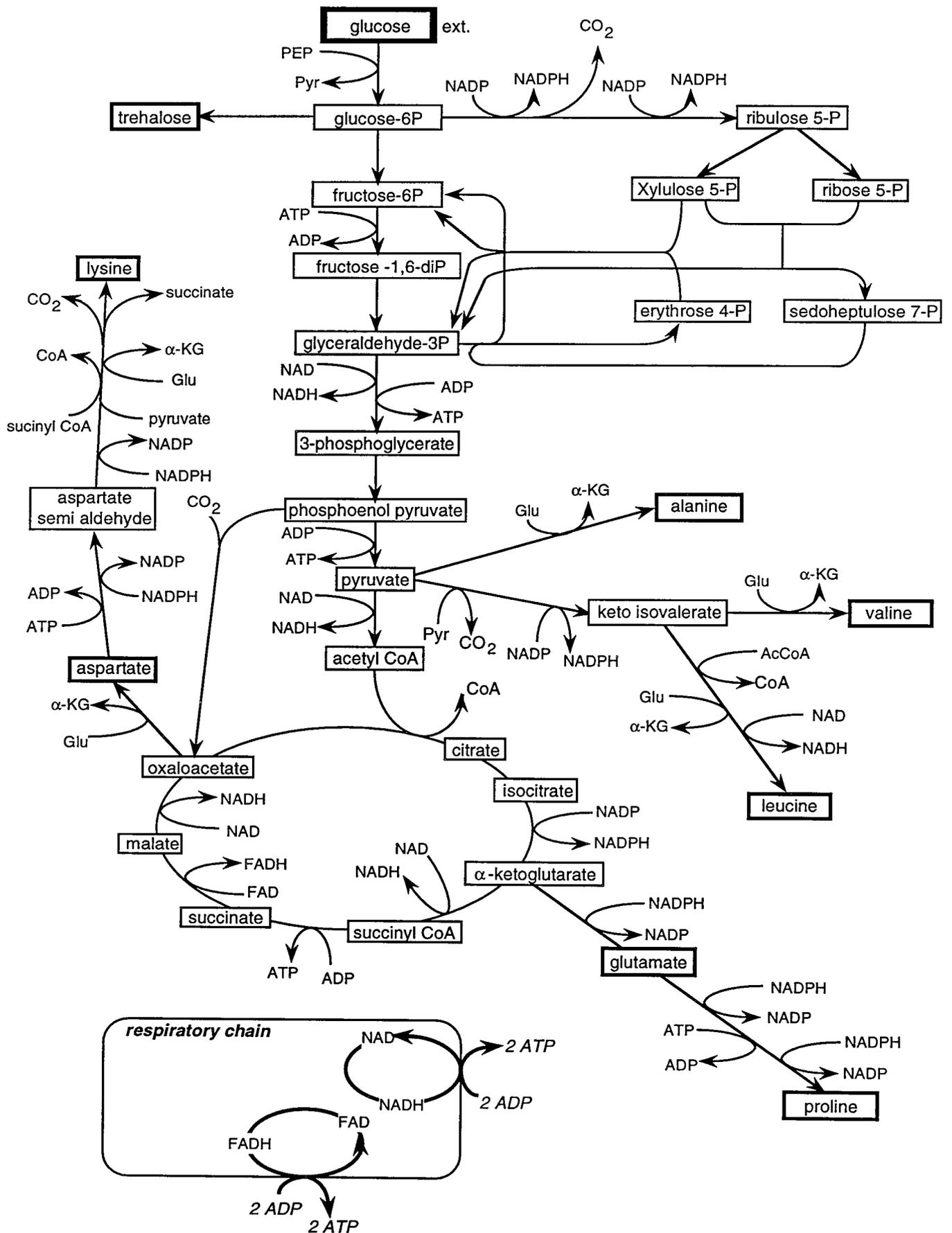


Figure 2: Biochemical network for the metabolism of glucose in *Corynebacteria*

pathway at the G6P node or the split ratio at the PEP node between glycolysis and the anaplerotic route. When several pathways are available for the synthesis of a given metabolite, the thermodynamically most efficient one is selected, which generally corresponds to the pathway that requires the least amount of consumed carbon source.

A similar approach is applied to the produced cellular biomass. Following the concept of Ingraham *et al.*³, biomass is considered to be synthesized from 12 precursors. An individual metabolic map is then associated with each of the precursors, giving the molar quantity of substrate necessary for the synthesis of one mole of precursor. Knowing the stoichiometry of the biomass production from these precursors, one calculates the individual metabolic map for biomass. It yields the molar quantity of substrate necessary to produce 1 gram of biomass, as well as the flux distribution at the nodes of the considered pathways.

From these determined individual metabolic maps corresponding to the production of one mole of metabolite or 1 gram of biomass, the Metaflux procedure then determines the actual specific rates of substrate consumption for the produced metabolites and biomass by multiplying the molar or unit mass quantities of substrate of the individual maps by the corresponding measured specific rate of metabolites or biomass production. This directly yields the actual intracellular fluxes leading to the considered metabolites and biomass. From the measured production rates is also calculated an average flux partition at the nodes of the network.

The final step in the Metaflux procedure is to calculate the total substrate uptake rate and the total intracellular fluxes by adding the previously determined contributions of the individual metabolites and biomass.

The metabolic network for *Corynebacterium glutamicum*

The flux analysis procedure is described for the production of lysine from glucose by *Corynebacterium glutamicum*. In addition to lysine and biomass, the fermentation yields other metabolites, namely glutamate, proline, leucine, valine, alanine and trehalose⁸. Figure 2 indicates the metabolic reactions network of *Corynebacterium glutamicum* for the production of the various metabolites from glucose. According to available biochemical data, the central metabolism consists of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the tricarboxylic acid cycle (TCA) and the pentose phosphate pathway (PPP). Several anaplerotic pathways, namely Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC), Pyruvate Carboxylase, (PC) and Malic Enzyme (ME) have been detected. But on glucose minimal media PEPC seems to be the only operational anaplerotic pathway. The transport of glucose occurs mainly via a phosphotransferase system (PTS) with the simultaneous transformation of phosphoenolpyruvate (PEP) into pyruvate (Pyr). Biomass synthesis is lumped into a global stoichiometric reaction from 12 precursors present in the central metabolism. To account for

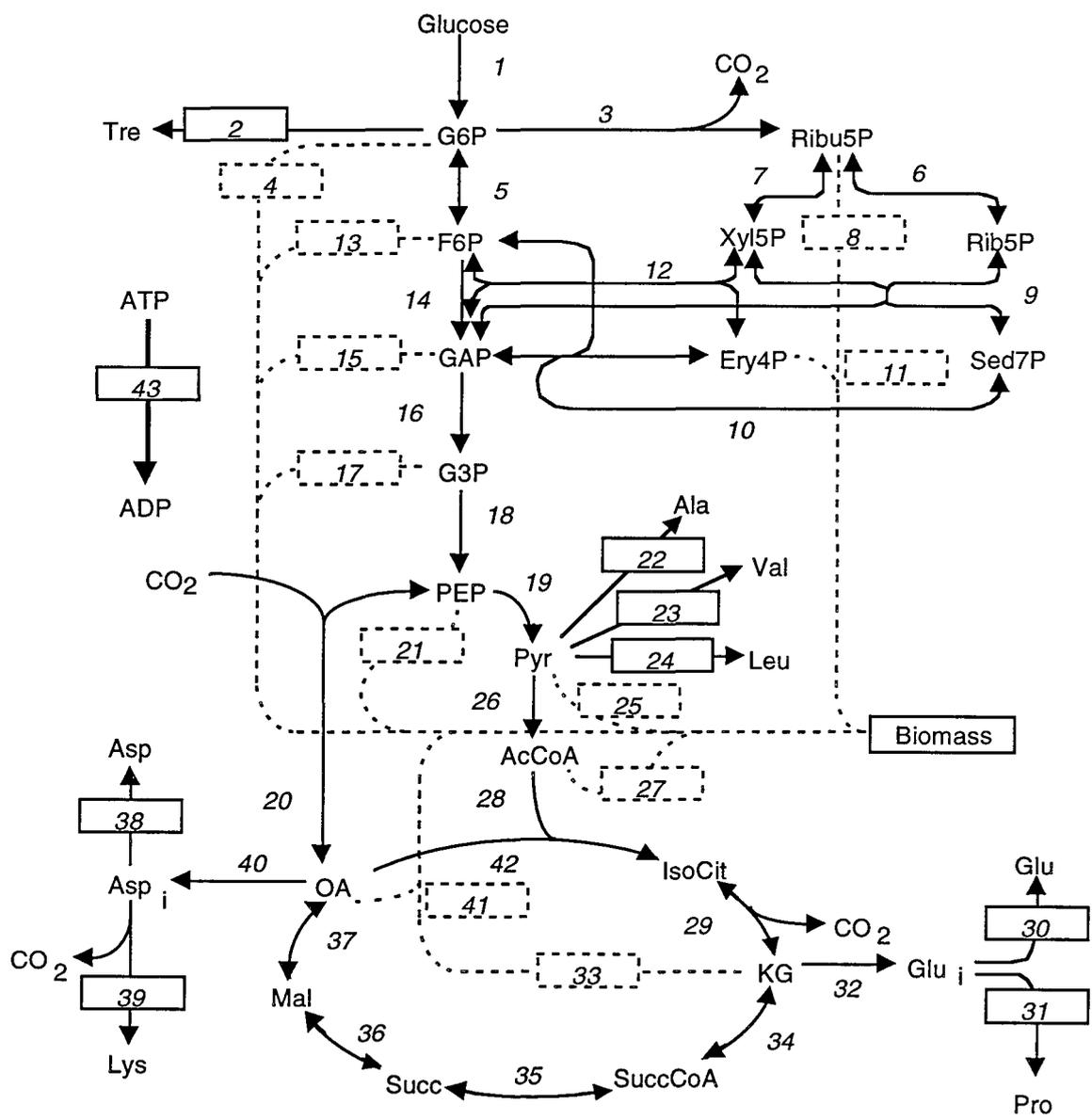


Figure 3: Biochemical network for Metaflux.

maintenance and futile cycles, a reaction of dissipation of excess ATP into ADP is included. The simplified reactions network used for the flux calculation is shown in Figure 3.

The two key nodes to be considered are the Glucose-6-Phosphate (G6P) node that determines the flux distribution between the glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway (PPP) and the Phosphoenolpyruvate (PEP) node leading either to pyruvate via the pyruvate kinase (PK) and PTS reactions or to oxaloacetate (OAA) via the PEPC reaction.

Regeneration reactions for the consumed intermediates

According to the metabolic network in Figure 2, several cofactors and intermediates are utilized in the metabolic reactions of *Corynebacterium glutamicum* leading from glucose to the excreted products : ATP, ADP, NAD, NADH, NADP, NADPH, FAD, FADH, glutamate, succinyl-coenzyme A, pyruvate, acetyl-coenzyme A, oxaloacetate. To maintain a steady-state pool of these intermediates, they have to be replenished by additional reactions : either by other enzymatic reactions in the network, if available, or by a sequence of reactions of the main pathway leading from glucose to this intermediate. Thus, a set of 12 regeneration reactions can be identified.

The direct regeneration reactions : When an intermediate is transformed into another, the simplest regeneration reaction is the reverse reaction catalysed by another enzymatic reaction, occurring at a different point of the cellular metabolism. Such reactions are found for ADP, NAD, FAD, NADP, glutamate and succinyl CoA :

- regeneration of ADP directly by ATP hydrolysis



- regeneration of NAD or FAD by the respiratory chain, assuming a P/O ratio of 2 :



- regeneration of glutamate from α -KG :



- regeneration of succinyl coenzyme A from succinate :

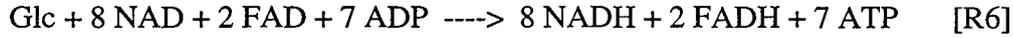


The regeneration reactions from glucose : For the regeneration of ATP, NADH, FADH, NADPH, pyruvate, acetyl-coenzyme A and oxaloacetate, the following global stoichiometric reactions, corresponding to the most probable regeneration pathways from glucose are used :

- regeneration of ATP, involving glucose transport, glycolysis, the TCA cycle and the respiratory chain :

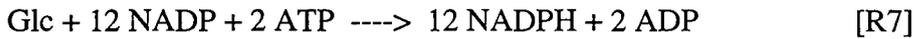


- regeneration of NADH and FADH, involving glucose transport, glycolysis, TCA :



- for the regeneration of NADPH two different reactions are considered depending on the availability of ATP in the cell :

- i) regeneration of NADPH in case of ATP excess, involving glucose transport, the PPP cycle and a complete glucose oxidation :



- ii) regeneration of NADPH in case of ATP requirement, involving glucose transport, glycolysis and TCA cycle :



Actually, in the presence of an ATP deficiency, it is preferable to use a combination of the two reactions [R7] and [R8] to regenerate the required NADPH, without producing an excess of ATP. Thus, if y_{NADPH} and y_{ATP} are the respective requirements of NADPH and ATP per mole of produced metabolite or biomass precursor, and ρ_7 and ρ_8 the respective coefficients of reactions [R7] and [R8] utilization, we obtain $12.\rho_7 + 2.\rho_8 = y_{\text{NADPH}}$ and $23.\rho_8 - 2.\rho_7 = y_{\text{ATP}}$.

Coefficients ρ_7 and ρ_8 can be calculated as :

$$\rho_7 = \frac{23.y_{\text{NADPH}} - 2.y_{\text{ATP}}}{280} \quad \text{and} \quad \rho_8 = \frac{y_{\text{NADPH}} + 6.y_{\text{ATP}}}{140}$$

- regeneration of pyruvate, involving glucose transport and glycolysis :



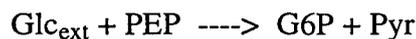
- regeneration of acetyl coenzyme A, involving glucose transport, glycolysis, and the pyruvate dehydrogenase reaction :



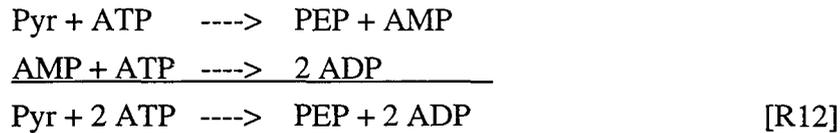
- regeneration of oxaloacetate, involving glucose transport, glycolysis, and the PEPC reaction:



The regeneration of PEP for the glucose transport system : In *Corynebacterium glutamicum*, glucose mainly enters the cell via the specific phosphotransferase system (PTS) :



The utilized PEP is regenerated by the PEP synthetase reaction combined to the Adenylate Cyclase activity (ADP synthesis from AMP), that yields the regeneration reaction [R12] :



It can be noticed that globally PTS and PEP regeneration reactions [R12] yield the overall reaction for the glucose transport : $\text{Glc}_{\text{ext}} + 2 \text{ ATP} \text{ ---->} \text{G6P} + 2 \text{ ADP}$.

This overall reaction can also represent the other possible mechanism of glucose transport, namely the uptake by an active permease system coupled to the utilization of ATP. In this case there is no simultaneous consumption of PEP, and thus no requirement for PEP regeneration.

The determination of the individual metabolic map for a produced metabolite

To establish the individual metabolic map of a produced metabolite, one considers in the network of Figure 2 the main reaction pathway converting glucose into the metabolite. In a first step, from the stoichiometry of the involved reactions, one evaluates the molar quantity of glucose necessary for the production of one mole of metabolite.

A second step consists in applying the appropriate regeneration reactions in order to assure self-sufficiency of the main reaction pathway in terms of needed cosubstrates or cofactors. One first lists and counts the moles of intermediates that are consumed as cosubstrates of the main pathway reactions for the production of one mole of metabolite. The previously defined regeneration reactions are then applied sequentially for each of these consumed intermediates, excepted NADPH and ATP. If the resulting global balance for ATP is positive, reaction [R7] is then applied for the regeneration of NADPH. On the contrary, if the ATP balance is negative, NADPH is regenerated with the combination of the reactions [R7] and [R8] using the appropriate coefficients. Finally if the regeneration procedure leaves an excess of ATP, the regeneration reaction [R1] is used to maintain constant the intracellular level of ATP.

Application of the whole cosubstrates regeneration procedure to the main pathway yields first the global requirement for the direct regeneration [R1] to [R4]. On the other hand, when accounting for all the regeneration reactions [R5] to [R8] requiring the consumption of glucose, one also obtain the global amount of moles of glucose necessary for the regeneration of the intermediates.

Combining the analysis of the main pathway and the regeneration reactions yields what can be called the individual metabolic map of a produced metabolite. It represents the flux distribution through the central metabolism which leads to the formation of one mole of metabolite, independently of the other metabolic processes.

A first characteristic of this individual map is the total molar amount of glucose required for the biosynthesis of one mole of metabolite, $Y_{S/P}$. It is calculated as the sum of the moles of glucose directly linked to the main pathway and of the moles of glucose necessary for the regeneration of the consumed intermediates. It represents the inverse of the theoretical maximum sugar conversion yield into the considered metabolite.

A second characteristic of the metabolic map is the flux repartition at the G6P branching point towards either the PPP cycle or the glycolysis. From the previous requirement for NADPH regeneration by regeneration reaction [R7], one can calculate the factor α_{PPP} defined as the ratio of the carbon source which is fully oxidized to CO_2 in the PPP to the glucose flux entering the cell (flux (1))

$$\alpha_{PPP} = \frac{\text{flux}[R7]}{\text{flux}(1)}$$

The actual stoichiometry of a single pass through the PPP results in a partial oxidation of the carbon source following the reaction $G6P + 2 NADP \rightarrow Rib5P + 2 NADPH + CO_2$.

This shows that one pass through the PPP yields 2 NADPH, whereas the complete oxidation described in [R7] generates 12 NADPH. Consequently the actual carbon flux partition at the G6P node necessary to generate the NADPH is given by

$$\frac{\text{flux}(3)}{\text{flux}(1)} = 6 \cdot \alpha_{PPP}$$

A third characteristic of the individual metabolic map is the flux repartition at the PEP node. One defines respectively α_{PK} and α_{PC} , as the fraction of the PEP flux entering the glycolysis, via pyruvate kinase and the PTS, or the anaplerotic pathway via PEP carboxylase

$$\alpha_{PK} = \frac{\text{flux}(19)}{\text{flux}(18)} \quad \text{and} \quad \alpha_{PC} = \frac{\text{flux}(20)}{\text{flux}(18)}$$

The two repartition factors α_{PK} and α_{PC} are evaluated by taking into account both the flux through the main pathway leading to the metabolite and the previously determined regeneration fluxes.

A fourth characteristic is the molar production of CO_2 per mole of produced metabolite. It is evaluated from a balance of all the produced and consumed moles of CO_2 by the reactions of the main pathway and by the regeneration reactions.

A fifth characteristic of the metabolic map is the global requirement of intermediates regeneration, namely ADP, NAD, FAD, glutamate and succinyl CoA by direct reverse reactions. Of particular interest is the molar ATP dissipation per mole of produced metabolite, which represents the

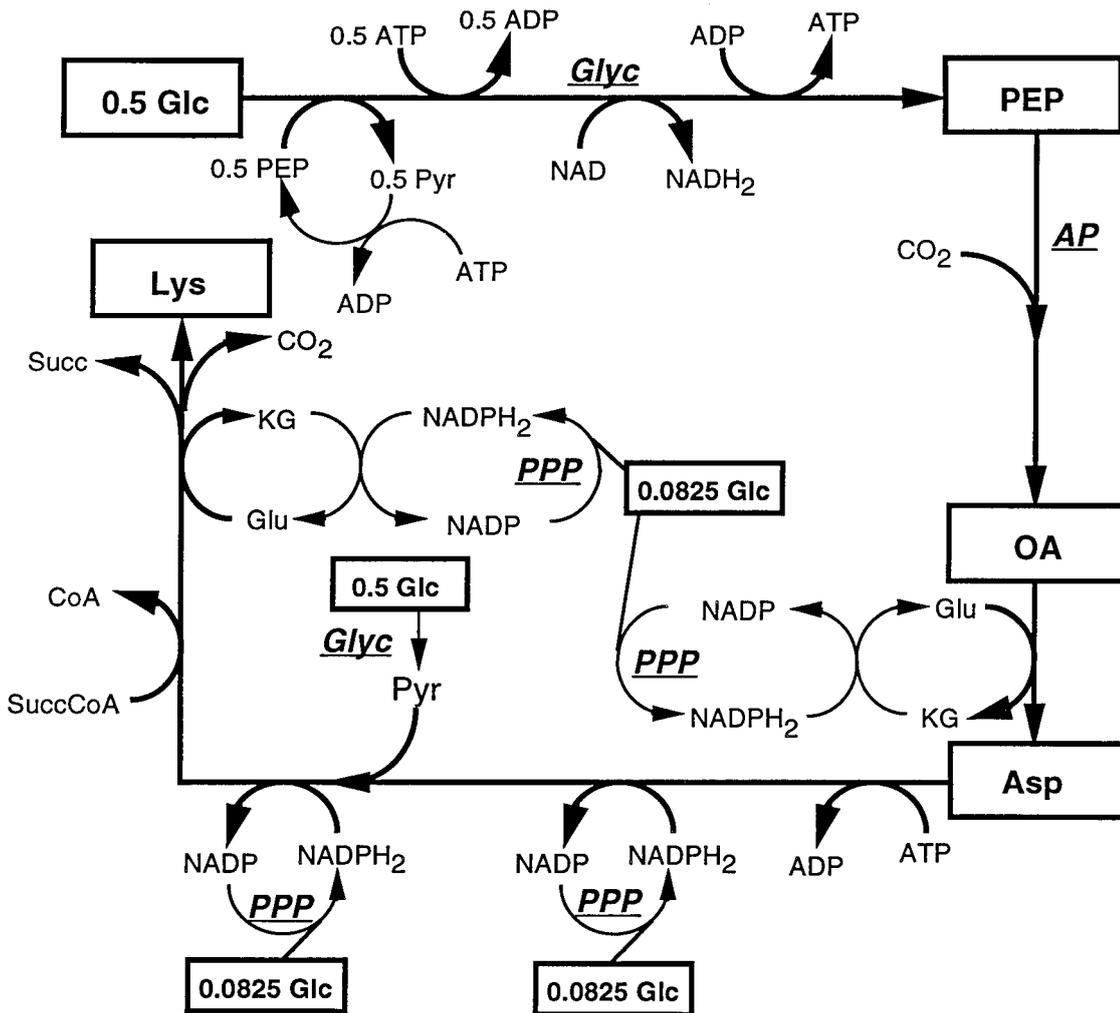
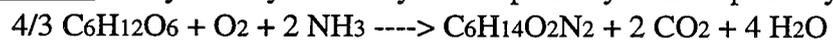


Figure 4a : Analysis of lysine biosynthesis pathway : PEPC pathway.



CS_{mol}=4/3 ; ppp=1/4 ; pk=1/2 ; pc=1/2

ATPd=4/3 mol/mol lysine (9,3 kcal)

excess of produced ATP in the individual pathway which has to be dissipated to maintain steady-state ATP and ADP pools inside the cell.

Selection between competing biosynthetic pathways

When there are several biosynthetic pathways possible for the conversion of the consumed sugar into a metabolite, the previously described individual map approach can be applied to each of them. The selection of one of the pathways is then performed on the basis of the minimal energy dissipation principle or highest thermodynamic efficiency, according to the concepts introduced by Roels⁶. The consumed sugar and the produced metabolite can be characterized by their enthalpy of combustion Δh , found in thermodynamic handbooks for usual metabolites. Alternatively they can be estimated from the degree of reduction of the compound, γ , which is given by $4 + b - 2c - 3d$ for an organic compound of composition $\text{CH}_b\text{O}_c\text{N}_d$. Δh is then approximatively equal to 115γ (kJ/mole).

One can evaluate the thermodynamic efficiency of the chemical transformation, defined as the ratio of the enthalpy of combustion of the products to the enthalpy of combustion of the substrate⁶. For an individual metabolic map where $Y_{S/P}$ moles of glucose are necessary to yield 1 mole of metabolite, the thermodynamic efficiency of the metabolic pathway is calculated as :

$$\eta = \frac{\Delta h(\text{metabolite})}{Y_{S/P} \cdot \Delta h(\text{glucose})}$$

The different possible pathways are then compared on the basis of their respective thermodynamic efficiency, and the one with the highest efficiency is selected. The method is equivalent to selecting the pathway characterized by the lowest stoichiometric demand in glucose, $Y_{S/P}$.

Application to the determination of the individual lysine map

In this section the methodology of individual map construction and characterization is illustrated for the production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*. If one considers two possible pathways for the transformation of glucose into lysine : i) the "anaplerotic pathway" (PEPC pathway) consisting of the glycolysis, the PEPC reaction, and the transformation of oxaloacetate into lysine ; ii) the "TCA cycle pathway", consisting of the glycolysis for the transformation of glucose into acetyl coenzyme A, the TCA cycle to oxaloacetate and its transformation into lysine. Each of these two pathways can be characterized by its individual metabolic map, described below.

The individual map of the "PEPC pathway" : Figure 4a represents the main pathway of transformation of glucose into lysine when PEP is transformed into OAA by the PEPC reaction. It

Table 1 : Metabolite balance of lysine biosynthetic pathway.

<i>Regeneration step</i>	<i>consumed</i>	<i>produced</i>
<i>listing of intermediates</i>	0.5 glucose 0.5 PEP 1 pyruvate 2 glutamate 1 SuccCoA 1 NAD+ 2 NADPH2 0.5 ATP	1 lysine 0.5 pyruvate 2 KG 1 succinate 1 coenzyme A 1 NADH2 2 NADP+ 0.5 ADP
[R12], [R9], 2*[R3], [R4], 2*[R2],	1 glucose 4 NADPH2 2 ADP	1 lysine 4 NADP+ 2 ATP
4*[R7], 4/3*[R1]	4/3 glucose	1 lysine

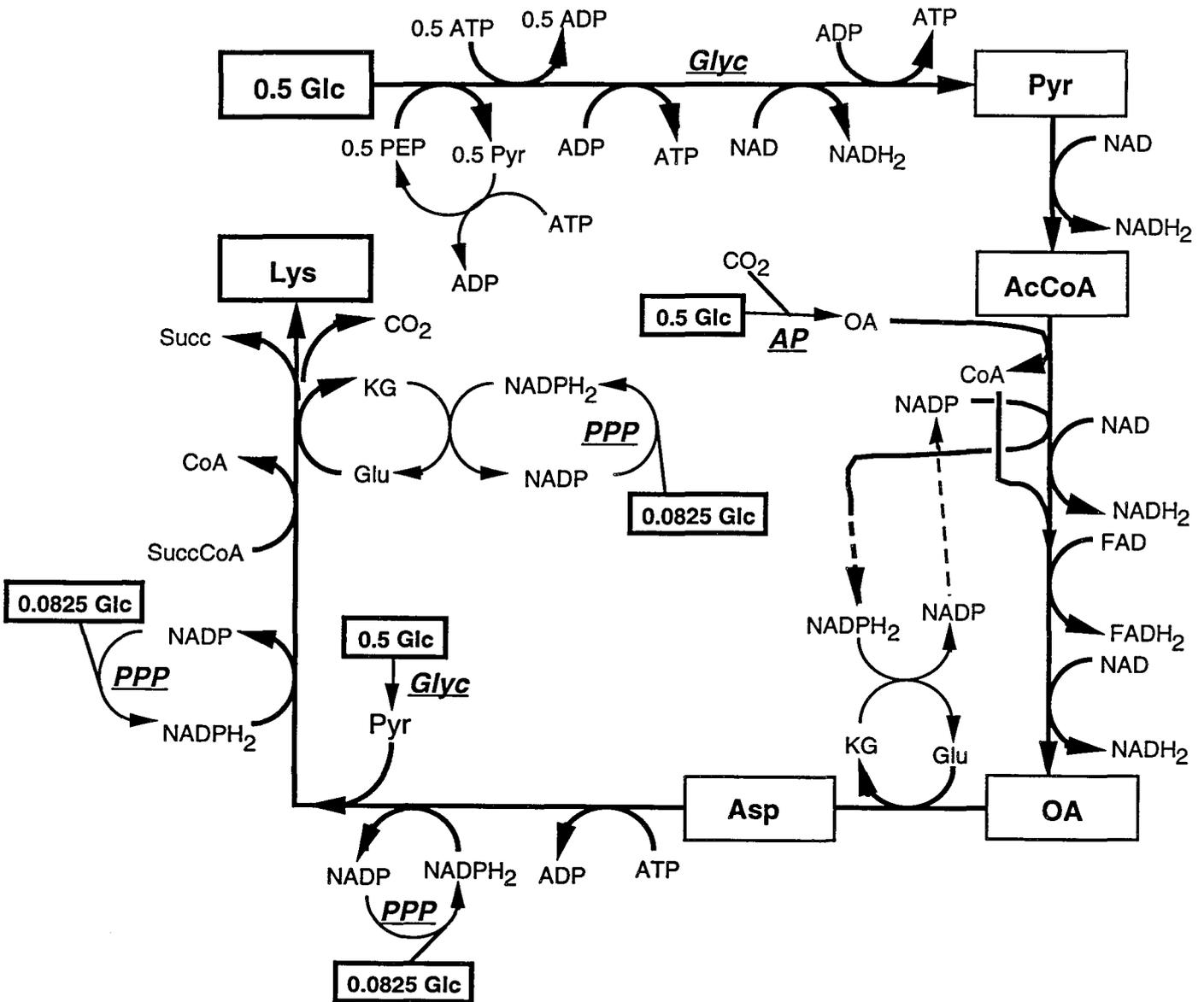
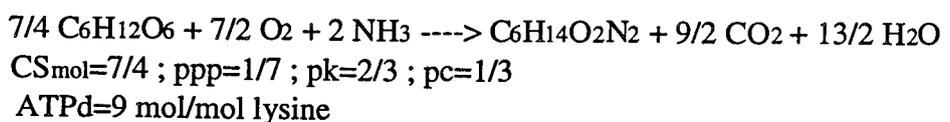


Figure 4b : Analysis of lysine biosynthesis pathway (pathway 2).



also indicates all the cosubstrates which are utilized by the main reactions together with the corresponding regeneration reactions.

In a first step, the consumed and produced metabolites are listed, as indicated in Table 1. The main pathway consumes 1 mole of glucose to produce 1 mole of lysine. As cosubstrates of the reactions the main pathway consumes 0.5 mole of PEP, 0.5 ATP, 1 NAD, 2 glutamates, 2 NADPH, 1 pyruvate, 1 SuccCoA and generates simultaneously 0.5 pyruvate, 0.5 ADP, 1 NADH, 2 ketoglutarates, 2 NADP, 1 coenzyme A, 1 succinate.

Application of the regeneration reactions for PEP, NAD, glutamate, pyruvate and succinyl CoA yields a global consumption of 1 mole of glucose, 4 NADPH and 2 ADP for the production of 1 mole of lysine, 4 NADP and 2 ATP (Table 1). Since a global excess of ATP is obtained, reaction [R7] is used for the regeneration of the 4 NADPH consumed. Finally reaction [R1] is applied for the dissipation of the excess of ATP. The overall balance for the main pathway and the regeneration reactions indicates a global consumption of 4/3 mole of glucose per mole of lysine formed : 1/2 mole for the basic lysine backbone, 1/2 mole for the pyruvate regeneration, and 1/3 mole of glucose for NADPH regeneration (Table 1).

The corresponding flux distribution to produce 1 mole of lysine can then be determined, as indicated in Figure 5. 4/3 mole of glucose are transported inside the cell and transformed into 4/3 mole of G6P. A total of 2 moles of G6P enter the PPP cycle : 4/3 coming from the uptake and 2/3 from the recycling of F6P leaving the PPP cycle by the reversible hexose isomerase. The other formed 2/3 mole of F6P enters the glycolysis, providing 4/3 mole of GAP. Combined to an additional 2/3 mole coming from the PPP, this yields 2 moles of GAP flowing down the glycolysis pathway. At the PEP branch point, 2 moles of PEP are transformed into 1 mole of OAA and 1 mole of pyruvate necessary to produce lysine. The final condensation of one aspartate with one pyruvate yields 1 lysine.

Consequently, the characteristics of the individual lysine map are the following : the molar glucose requirement, $Y_{S/P}$, is 4/3, the repartition factor at the G6P node, α_{ppp} , is 1/4, and both the split ratio at the PEP node, α_{PK} and α_{PC} , are equal to 1/2. Regeneration reactions are required for 2 moles of glutamate and 1 mole of SuccCoA per mole of produced lysine. Finally, this pathway leads to a production of 2 moles of CO₂ and has an excess of 4/3 mole of ATP, which have to be dissipated to maintain a steady pool of intracellular ATP.

From a thermodynamic point of view, the enthalpy of combustion of glucose and lysine are 880 kcal/mole and 770 kcal/mole respectively, which yields a thermodynamic efficiency of 0.88 for this PEPC pathway.

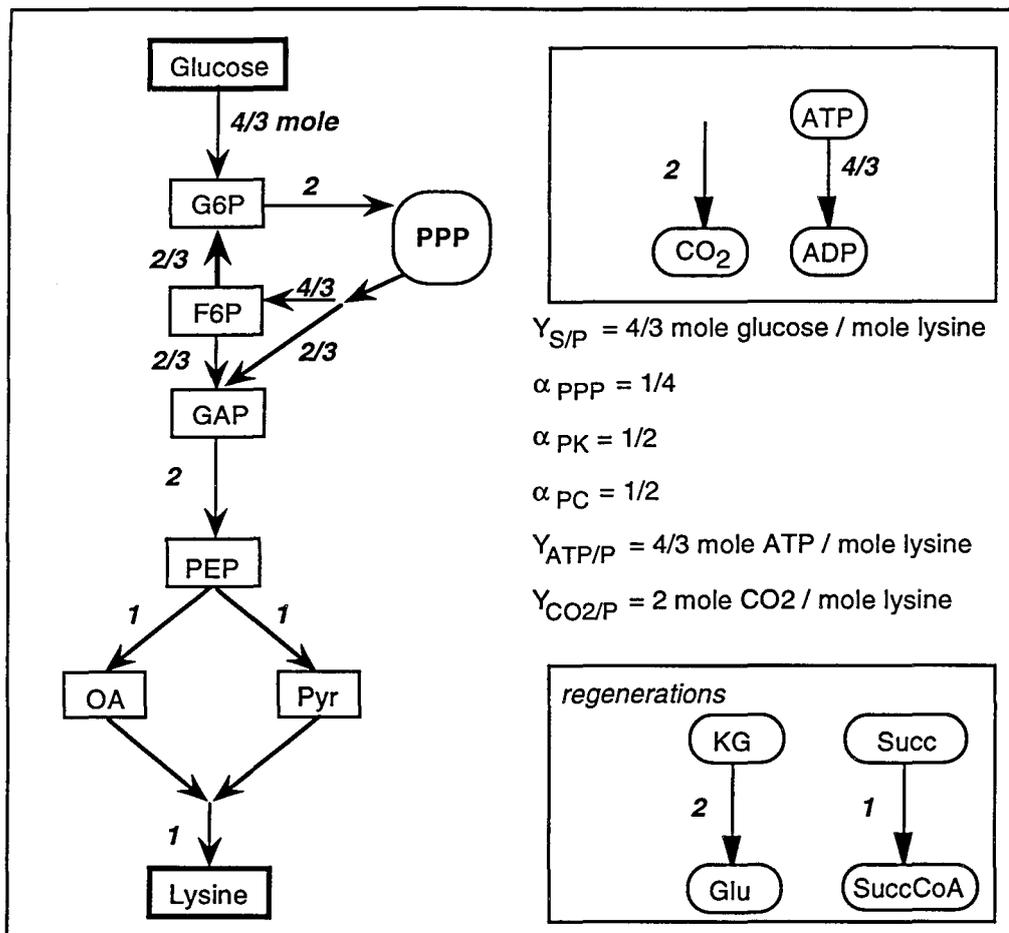


Figure 5 : Results of the lysine PEPC pathway analysis.

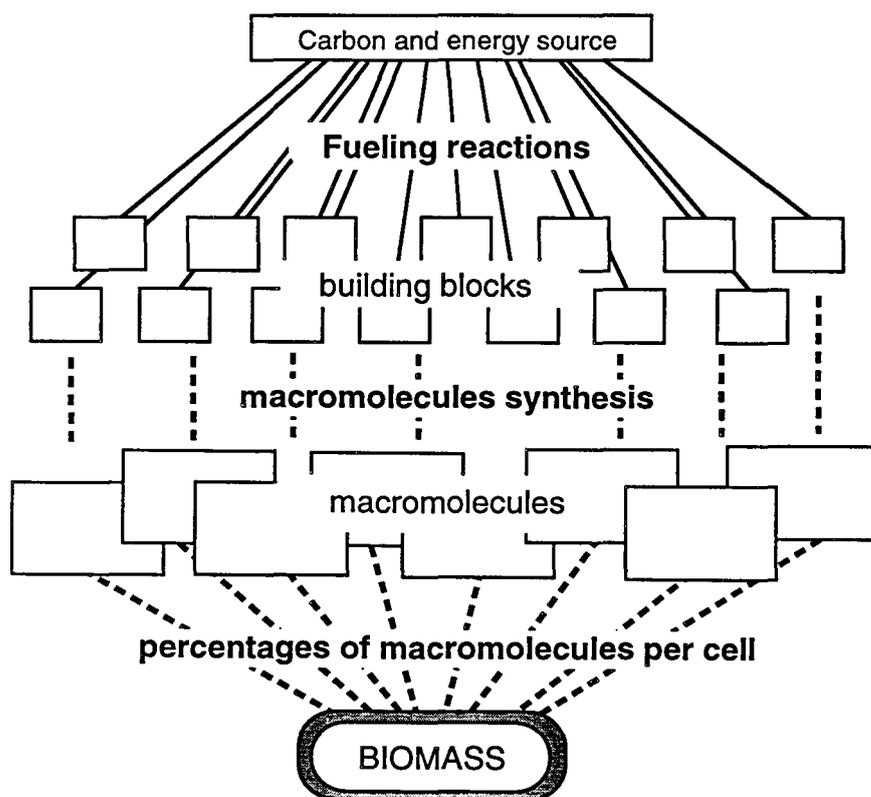


Figure 6 : Principle of biomass synthesis (from Ingraham and coll., 1983)

The individual map of the "TCA pathway" : Figure 4b represents the main pathway for the transformation of glucose into lysine via the TCA cycle, together with the consumed intermediates. Application of the regeneration reactions indicates a global consumption of 7/4 mole of glucose corresponding to 1/2 mole for the main pathway, 1/2 for the regeneration of oxaloacetate, 1/2 for the regeneration of pyruvate, and 1/4 for the regeneration of NADPH. The main pathway consumes less NADPH, since it is produced by the TCA cycle. The split ratio at the G6P node, α_{ppp} , is 1/7, and at the PEP node, α_{PK} , is 2/3. The pathway produces 9/2 mole of CO₂ and dissipates 9 moles of ATP per mole of lysine. Its thermodynamic efficiency is thus 0.67.

Comparing the efficiencies of the two PEPC and TCA pathways, the PEPC pathway is finally selected as the most efficient for the production of lysine.

The individual map for biomass production

The metabolic map for biomass synthesis is determined using the stoichiometric approach proposed by Ingraham *et al.*³ for the synthesis of *Escherichia coli*. One successively considers the initial transformation of glucose into precursors or building blocks, then the synthesis of macromolecules (proteins, DNA, RNA, polysaccharides...) from these precursors, and finally the assembly of the macromolecules into biomass (Figure 6).

Eleven precursors, intermediates of the central metabolism, are taken as building blocks for Corynebacteria synthesis : G6P, F6P, GAP, PGA, PEP, Pyr, AcCoA, KG, OA, E4P, PP. Each of these precursors is produced from glucose. Using the previously described procedure for the produced metabolites, an individual metabolic map is determined for each precursor, assuming the self-sufficiency of their synthesis pathway in regenerating all the involved metabolic intermediates. Table 2 indicates the resulting molar requirement of glucose per mole of produced precursor, the partition coefficient at the G6P and PEP nodes as well as the ATP dissipation. It can be noticed that the two precursors E4P and PP are intermediates of the PPP pathway. Thus their individual metabolic maps also include a net production of 2 moles of NADPH per mole of E4P or PP.

The second step to be taken into account when establishing the individual map for biomass production is the synthesis of the biomass components. Bacteria are assumed to be composed of 11 classes of constitutive biomolecules : proteins, DNA, RNA, lipids, lipopolysaccharides, peptidoglycans, glycogen, glutamate, serine, polyamines and others (teichoic and mycolic acids). All those biomolecules can be synthesized from the previous 11 precursors. The reactions involved also require ATP, NADH and NADPH as cofactors. The stoichiometric relationship between the 11 constitutive biomolecules and the 11 precursors and 3 cofactors is represented in a matrix form in Table 3 (matrix M, adapted from Ingraham).

Table 2 : Analysis of the building blocks biosynthesis pathway (glyc, glycolysis ; TCA, Kreb's cycle ; PC, anaplerotic PEPC pathway ; PPP, pentose phosphate pathway).

	pathway	$Y_{S/Pi}$ <i>mol glc/mol i</i>	α_{PPP}	α_{PK}	α_{PC}	$Y_{ATP/Pi}$ <i>mol ATP/mol i</i>
G6P	glyc	29/27	0	1	0	0
F6P	glyc	29/27	0	1	0	0
GAP	glyc	5/9	0	1	0	0
PGA	glyc	1/2	0	0	0	0.5
PEP	glyc	1/2	0	0	0	1.5
Pyr	glyc	1/2	0	1	0	2.5
AcCoA	glyc	1/2	0	1	0	0.5
KG	glyc+TCA+PC	1	0	0.5	0.5	8
OA	glyc+PC	1/2	0	0	1	1.5
E4P	PPP	1	1	0	0	2
PP	PPP	1	1	0	0	2

Table 3 : Biomass synthesis. Matrix M of the precursors content of each macromolecules (mmol precursor / g macromolecule)

	G6P	F6P	GAP	PGA	PEP	Pyr	AcCoA	KG	OA	PP	E4P	ATP	NADH	NADPH
Prot	0	0	0	1.59	1.21	4.27	0.78	1.80	2.63	0.26	0.66	5.14	-3.33	20.9
RNA	0	0	0	1.80	0	0	0	0	1.28	3.07	0	21.1	-5.37	2.13
DNA	0	0	0	1.61	0	0	0	0	1.61	3.23	0	25.5	-4.84	6.45
Lipids	0	0	1.42	1.42	0	0	23.3	0	0	0	0	17.6	-1.42	42.5
LPS	1.50	0.47	0	0.71	0.71	0	19.4	0	0	0.71	0	12.4	-0.71	13.8
PG	0	2.20	0	0	1.12	3.32	2.20	1.12	1.12	0	0	10.0	0	7.72
GI	6.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	246	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	6.90	0	0	0	0	0	6.90
Ser	0	0	0	9.80	0	0	0	0	0	0	0	-20.0	9.80	10.0
PA	0	0	0	0	0	0	0	1.76	0	0	0	3.53	0	5.30
Other	25.6	0	0	0	0	0	177	0	0	14.00	0	0	0	14.0

Table 4 : Biomass synthesis. Vector V_{CC}^T of the macromolecular composition of the cell (g macromolecule / g DW)

Prot	RNA	DNA	Lipids	LPS	PG	GI	Glu	Ser	PA	other
[0.48	0.135	0.035	0.11	0	0.05	0	0.055	0.005	0.034	0.015]

Table 5 : Biomass synthesis. Calculated vector V_{PR}^T of each precursor requirement for 1 g biomass synthesis. (mmol precursor / g DW)

G6P	F6P	GAP	PGA	PEP	Pyr	AcCoA	KG	OA	PP	E4P	ATP	NADH	NADPH
[0.38	0.11	0.16	1.27	0.64	2.22	5.70	1.36	1.55	0.86	0.32	8.67	-2.60	16.5]

Abbreviations : Prot, proteins ; LPS, lipopolysaccharids ; PG, peptidoglycan ; GI, glycogen ; Glu, glutamate ; Ser, serine ; PA, polyamines ; other, teichoic and mycolic acids.

Construction of the biomass metabolic map also requires the knowledge of the cellular composition of the different constitutive biomolecules. For *Corynebacteria* the composition was adapted from the data of Pequignot⁵ : 48% of proteins, 13.5% of RNA, 3.5% of DNA, 11% of lipids, 5% of peptidoglycan, 5.5 % of glutamate, 0.5% of serine, 3.4% of polyamines and 1.5 % of others (teichoic and mycolic acids). This cellular composition can be represented by a vector V_{CC}^T , as indicated in Table 4.

When combining the cellular composition to the previously defined relationship between constitutive biomolecules and precursors, the requirement for the biomass production of precursors and cofactors is obtained. An additional vector V_{PR}^T is thus calculated as the product of the cellular composition vector, V_{CC}^T , and the previously defined matrix M . It represents the molar requirement for precursors per gram of produced biomass (Table 5). As seen, in addition to the eleven precursors, there is also a requirement for 16.5 moles of NADPH and 8.7 moles of ATP.

Finally, the global metabolic map for biomass production is calculated by adding the flux contributions of the individual maps of the 11 precursors weighted by the molar requirement of each of them as indicated in the vector V_{PR}^T . But it must also take into account the additional demands for NADPH and ATP necessary for the assembly of macromolecules. The actual NADPH requirement is first determined as the difference between the 16.5 moles given by the stoichiometry of the biomass synthesis reaction and the excess 2.4 moles of NADPH generated by the production of PP and E4P. This demand of 14.1 moles of NADPH per gram of biomass is met by applying the NADPH regeneration reaction [R8] from glucose, and the requirement for 8.7 moles of ATP by the regeneration reaction [R5].

Addition of all the metabolic contributions for precursors and cofactors production yields the overall flux distribution per gram of formed biomass indicated in Figure 7. *Corynebacteria* formation is thus calculated to require the consumption of 0.01 mole glucose / g biomass and to produce 0.024 mole CO_2 / g biomass (0,62 mol/mol). It also results in an ATP dissipation of 0,03 mole / g biomass (0.7 mol/mol). The global flux distribution is characterized by an α_{PPP} value of 0.12 at the G6P node, and by 78 % of the PEP synthesis towards pyruvate at the PEP node.

The determination of the global flux distribution

In a final step of the Metaflux procedure, the individual maps for biomass and excreted metabolites are used to evaluate the global intracellular flux distribution at a given time of the fermentation process. This requires the additional knowledge of the kinetics of cell growth and metabolites excretion.

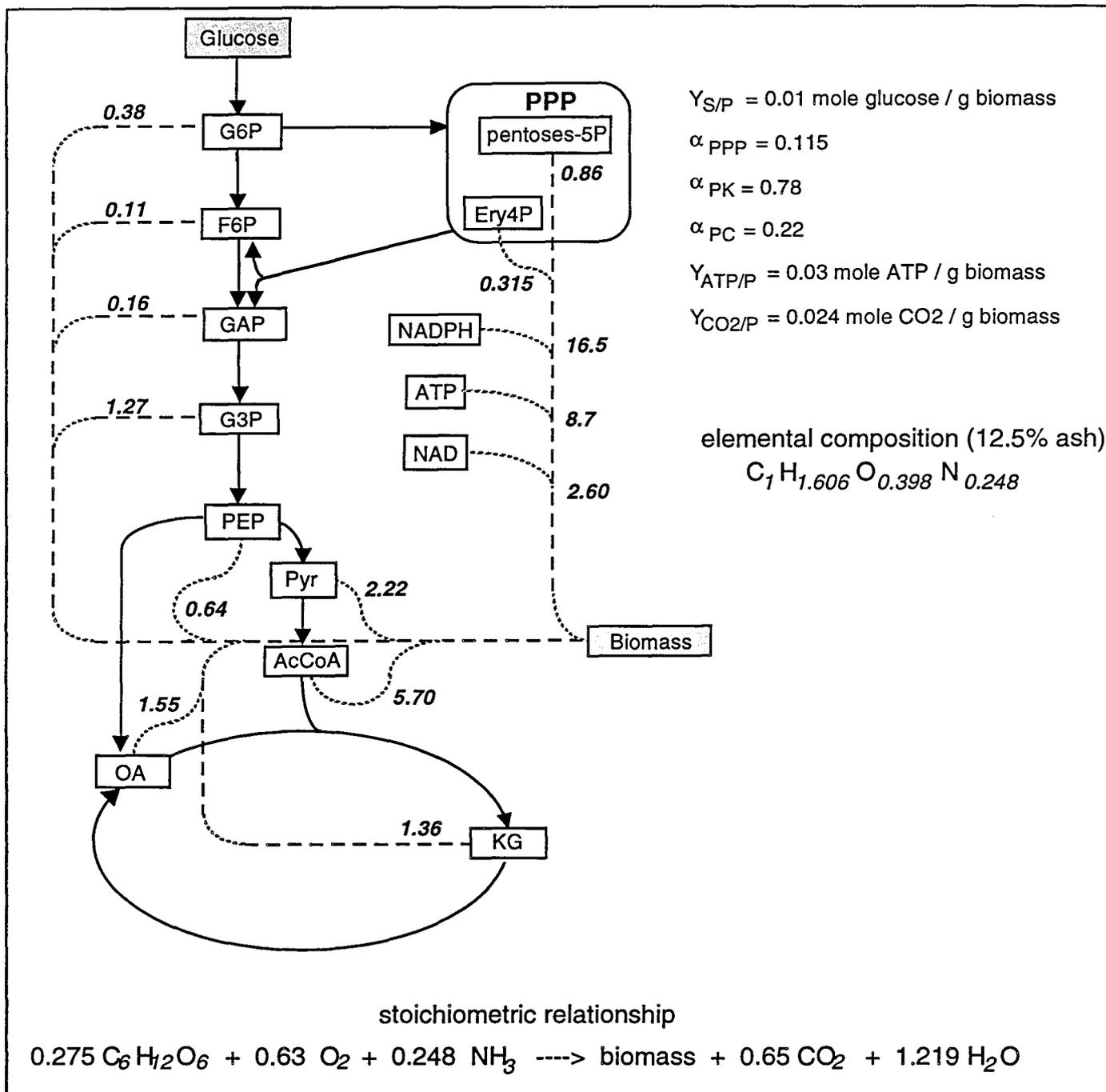


Figure 7 : Results of the biosynthetic pathway analysis of the biomass.
 (biomass requirements in mmol/g biomass)

First is calculated, for the production of biomass, the specific rates (in mole/g biomass/h) of glucose uptake and the fluxes of intermediates by multiplying the previously determined molar quantities per gram of biomass by the specific rate of cell growth. In a similar manner, for each of the excreted metabolite, the specific rate of glucose uptake and intermediary fluxes are calculated by multiplying the molar quantities obtained in the individual maps by the specific rate of product excreted. The associated requirement in regeneration reactions, for instance for the production of glutamate or succinyl coenzyme A, are also taken into account. The total flux at each reaction step is then simply determined by adding all the fluxes contributions from biomass and metabolites production.

In addition to the global flux distribution, the procedure yields the total specific consumption rate of glucose and the total specific rate of CO₂ production at a given time of fermentation. These theoretical values can be compared to experimentally measured rates of glucose uptake and CO₂ production in order to validate the flux analysis. From this global flux distribution one can also calculate the partitions at the critical nodes and the commonly used percentage of pentoses phosphates pathway assuming a partial recycling of F6P^{2,7} defined by

$$\%PPP = 100 \frac{\text{flux}(3)}{\text{flux}(1) + \text{flux}(8) + \text{flux}(9)}$$

EXPERIMENTAL RESULTS : METABOLIC FLUX EVALUATION DURING THE LYSINE FERMENTATION

Kinetics of lysine fermentation

The Metaflux procedure has been tested on the production of lysine by *Corynebacterium glutamicum* in batch culture⁸. Cells were grown on a defined medium containing initially 13 g/l glucose as the sole carbon source. The measured time variation of glucose, biomass, lysine and other excreted amino acids (proline, valine, alanine, aspartate and glutamate) concentrations are reported in Figure 8. After an initial lag phase, one observed a rapid growth phase lasting 10 hours, followed by a period of reduced growth rate. The production of lysine and other amino acids started after about 10 hours and lasted during the phases of fast and slow growth.

The flux distribution has been determined at two times during the fermentation process : at 11 hours (average between 10 h and 12 h), when the specific rates of glucose uptake and cell growth are the highest, and at 21 hours (average between 20 h and 22 h) when the glucose uptake and growth rates are much lower but amino acids excretion still proceeds at a high rate. The corresponding specific rates of cell growth and metabolism are given in Table 6.

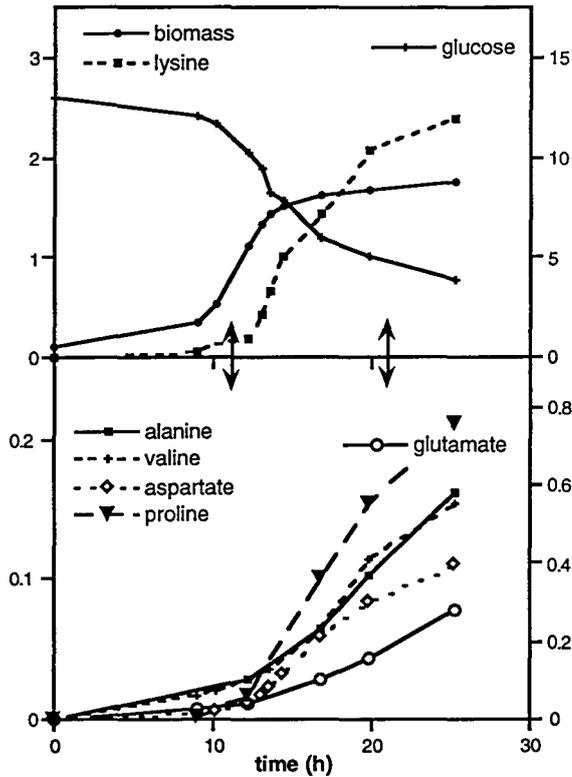


Figure 8 : Experimental kinetics of lysine production by *Corynebacterium glutamicum* in a batch culture on glucose (in g/l).
Double arrows indicate the sampling time for metabolic fluxes evaluation.

Metabolic flux distribution

Individual metabolic maps are established for all the fermentation products. In addition to the previously described maps for biomass and lysine production, the Metaflux procedure is applied to the determination of the individual maps for the other excreted metabolites, namely glutamate, alanine, valine, aspartate and proline. The major characteristic parameters of the resulting maps are summarized in Table 7. It can be noticed that the PPP cycle is not necessary for glutamate synthesis since its biosynthetic pathway is self-sufficient in terms of NADPH regeneration. Alanine and valine do not use the PEP carboxylase reaction as they are generated from pyruvate. On the contrary, aspartate exclusively uses the PEP carboxylase reaction.

Adding the individual contributions of biomass and amino acids production for the considered 43 intracellular fluxes provides the global flux distribution at 11 and 21 hours of the fermentation shown in Figures 9 and 10. The fluxes are indicated as normalized to the entering flux of glucose to yield a clearer indication of the evolution of the flux repartition during the fermentation. The shown molar flux distribution takes into account the requirements for glutamate, succinate and pyruvate as cosubstrates in the pathways of lysine, alanine and valine formation. The indicated flux from PEP to

Table 6 : Experimental specific production and consumption rates

production rate	10-12h	20-22h
biomass (C ₁ formula) (g.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	0.35	0.12
alanine (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	0.056	0.099
aspartate	0.038	0.22
glutamate	0.067	0.089
lysine	0.58	0.34
proline	0.044	0.064
valine	0.043	0.043
glucose uptake (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	4.8	0.92

Table 7 : Individual parameters of the different metabolites (glyc, glycolysis ; TCA, Kreb's cycle ; PC, anaplerotic PEPC pathway).

	pathway	Y _S /Pi mole glc/mol i	α _{PPP}	α _{PK}	α _{PC}	Y _{CO2} /Pi mole CO ₂ /mol i	Y _{ATP} /Pi mole ATP/mol i
alanine	glyc	7/12	1/7	1	0	0.5	7/3
aspartate	glyc	7/12	1/7	0	1	-0.5	4/3
glutamate	glyc+TCA	1	0	0.5	0.5	1	2
lysine	glyc+PC	4/3	1/4	0.5	0.5	2	4/3
proline	glyc+TCA+PC	7/6	1/7	0.5	0.5	2	14/3
valine	glyc	7/6	1/7	1	0	2	14/3
biomass	-	0.01 mole glc/g DW	0.115	0.78	0.22	0.024 mole CO ₂ /g DW	0.03 mole ATP/g DW

Table 8 : Calculated parameters for the fluxes evaluation at 11h and 21h in the lysine production process.

	10-12h	20-22h
specific growth rate (h ⁻¹)	0.35	0.12
calculated q _s (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	4.7	0.98
experimental q _s	4.8	0.92
%PPP	56.5	62.5
%PK	72	52
%PC	28	48
calculated CO ₂ production (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	10.2	1.2

pyruvate contains both contribution of the PTS and the pyruvate kinase activity. If the PTS is the sole mechanism for glucose uptake, the actual flux through pyruvate kinase corresponds to the difference between the indicated flux and the glucose entering flux.

The global characteristics of the two flux distributions are given in Table 8. A first important observation, essential for the validation of the Metaflux procedure, is the excellent agreement between the calculated and the experimentally measured glucose uptake rates for the two considered times of fermentation. This brings a strong support to the major hypothesis of the flux analysis procedure, namely the biochemical reaction network in *Corynebacteria* during lysine production on glucose, and the principle of self-sufficiency of the individual product forming pathway. Comparing the flux distribution at the G6P node to *E. coli*, Metaflux yields a high participation of the PPP during the initial phase of rapid growth (54%). This is in agreement with NMR experimental measurements near 50% in *Corynebacteria*¹². During the late phase of lysine production, the theoretical PPP participation is seen to further increase to 66%. Such a relative increase in the PPP participation resulting from an increased lysine production was also recently demonstrated by ¹³C-NMR studies⁹. The theoretical partition at the PEP node is also varying during the fermentation, with a value of 75% for glycolysis during the fast growth phase and is later reduced to 50% in the late production phase.

These results demonstrating the importance of both the pentoses phosphates pathway and the anaplerotic PEPC pathway during growth and lysine overproduction are in agreement with the flux analysis in *Corynebacterium glutamicum* by Vallino and Stephanopoulos using the Bionet procedure^{11, 13}. Both flux analysis methodologies, when applied to the same biochemical reactions network, yield comparable fluxes through the central metabolism, eventhough they are based on different theoretical approaches.

CONCLUSIONS

This study describes a new methodology, Metaflux, for the evaluation of intracellular fluxes from measured overall cell kinetics. The objective was to base the method more on the biochemical analysis of the metabolic network than on the mathematical analysis of the equations describing the network, in order to reach a more widespread use of flux analysis procedure specially among microbiologists. Metaflux presents many similarities with previously published procedure. It relies on an known or assumed biochemical reaction network for the conversion of a consumed carbon source into biomass and excreted metabolites. It also assumes a pseudo-steady state approximation for all the intracellular metabolites. It entails, however, a major difference in the application of the principles of intermediates regeneration in order to maintain an intracellular steady-state. In existing methods, intermediates regeneration is applied globally to the whole metabolic network. This results in an algebraic system which is not straightforward to solve as it often has more equations than

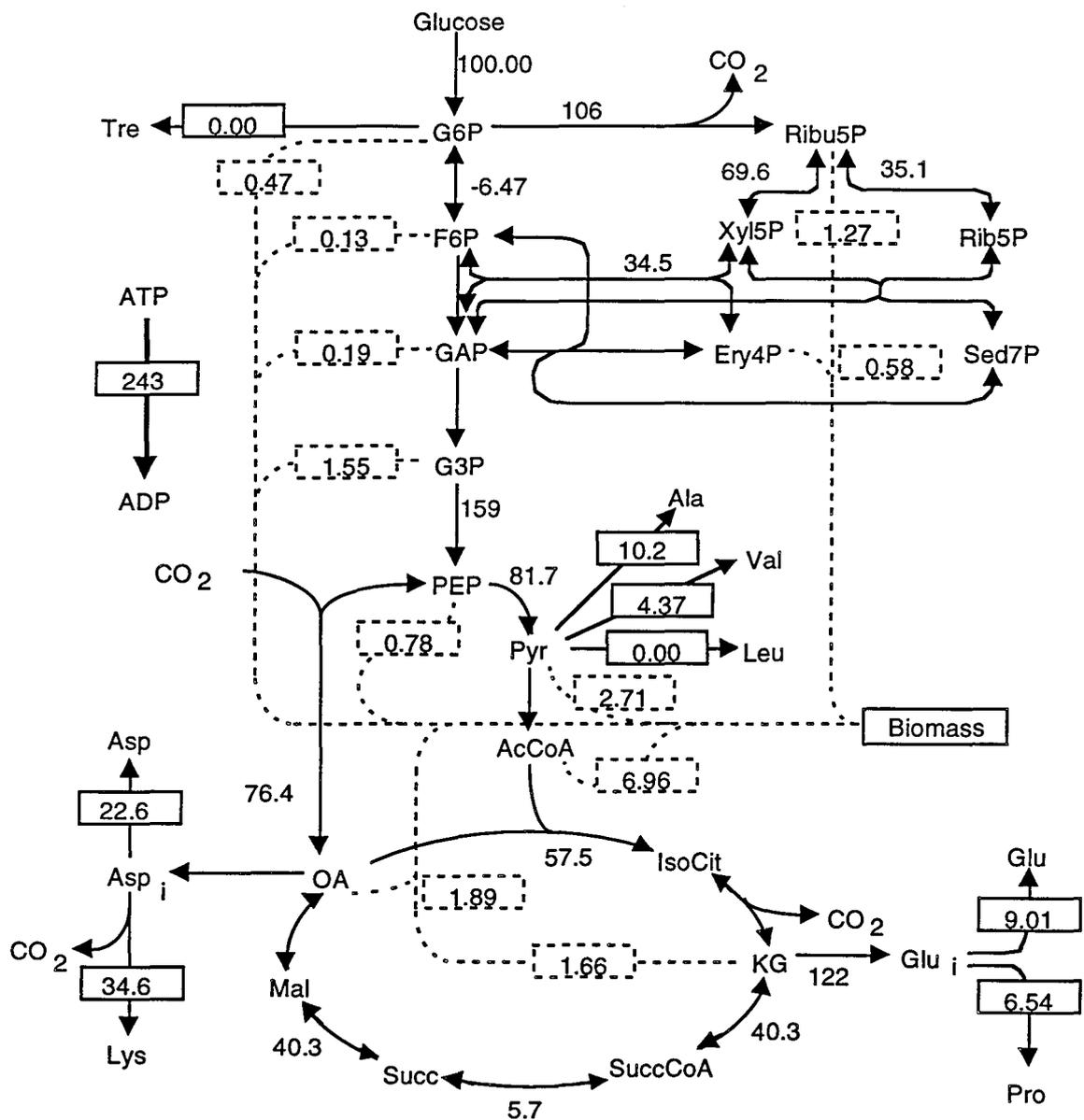


Figure 10 : Fluxes distribution at t=21 h (20-22h).

specific growth rate = 0.12 h^{-1} ; glucose uptake rate = $0,98 \text{ mmol/gDW.h}^{-1}$;
 calculated PPP participation = 62.5% ;
 repartition at the PEP node : 52 % "PK+PTS", 48% PEPC.

unknowns. In Metaflux, on the contrary, the regeneration principle is applied individually to each of the individual metabolite and biomass producing pathways, which greatly simplifies the mathematical resolution of the problem.

A first essential step in the Metaflux procedure is to establish the individual metabolic maps for the excreted metabolites and the produced biomass. It consists in identifying the main pathway leading from the consumed carbon source to a considered metabolite, and then applying a set of regeneration reactions for the intermediates or cofactors. The same approach can be applied to the production of biomass when it is considered to be formed from metabolic precursors according to a known stoichiometry. One thus obtains the most likely flux distribution in the metabolic network for the production of a single metabolite or for the biomass. Such individual metabolic maps present several interests. They yield the global amount of carbon source necessary for the production of one mole metabolite or one gram biomass, $Y_{S/X}$. They also provide the global associated CO_2 production, as well as the flux distribution at the nodes of the network.

A second step in Metaflux is to make use of the individual metabolic maps, which remain identical during the whole fermentation process, to evaluate the actual global flux distribution at a given time of the fermentation. This is simply done by multiplying the fluxes in an individual map by the corresponding specific rate of metabolite or biomass production, and finally adding the flux contributions of all the produced species.

Because of its mathematical simplicity Metaflux represents a convenient method for the quantitative analysis of biochemical reaction networks. It is thus expected to bring additional contributions to the understanding of the control of intracellular flux distributions in fermentation processes.

REFERENCES

1. Cocaign, M. 1992, Croissance de *Corynebacterium glutamicum* sur divers substrats et répartition des flux dans le métabolisme central. PhD Thesis. INSA Toulouse. France.
2. Dawes, E.A., Holms, W.H. 1958, Metabolism of *Sarcina lutea*. II. Isotopic evaluation of the routes of glucose utilization. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**:82.
3. Ingraham, J.L., Maaloe, O., Neidhart, F.C. 1983, Growth of the bacterial cell. Sinauer Associates Inc. Sunderland. USA.
4. Kacser, H., Burns, J.A. 1973, Control of metabolism. In Control of Biological Processes. Davies, D.D. Cambridge University Press, Cambridge.
5. Péquignot, C. 1995, Caractérisation de la croissance de *Corynebacterium glutamicum melassecola* ATCC 17965 en cuve agitée aérée sur différents milieux de culture - Détermination des flux métaboliques. PhD thesis of the University Blaise Pascal, Clermond-Ferrand, France.

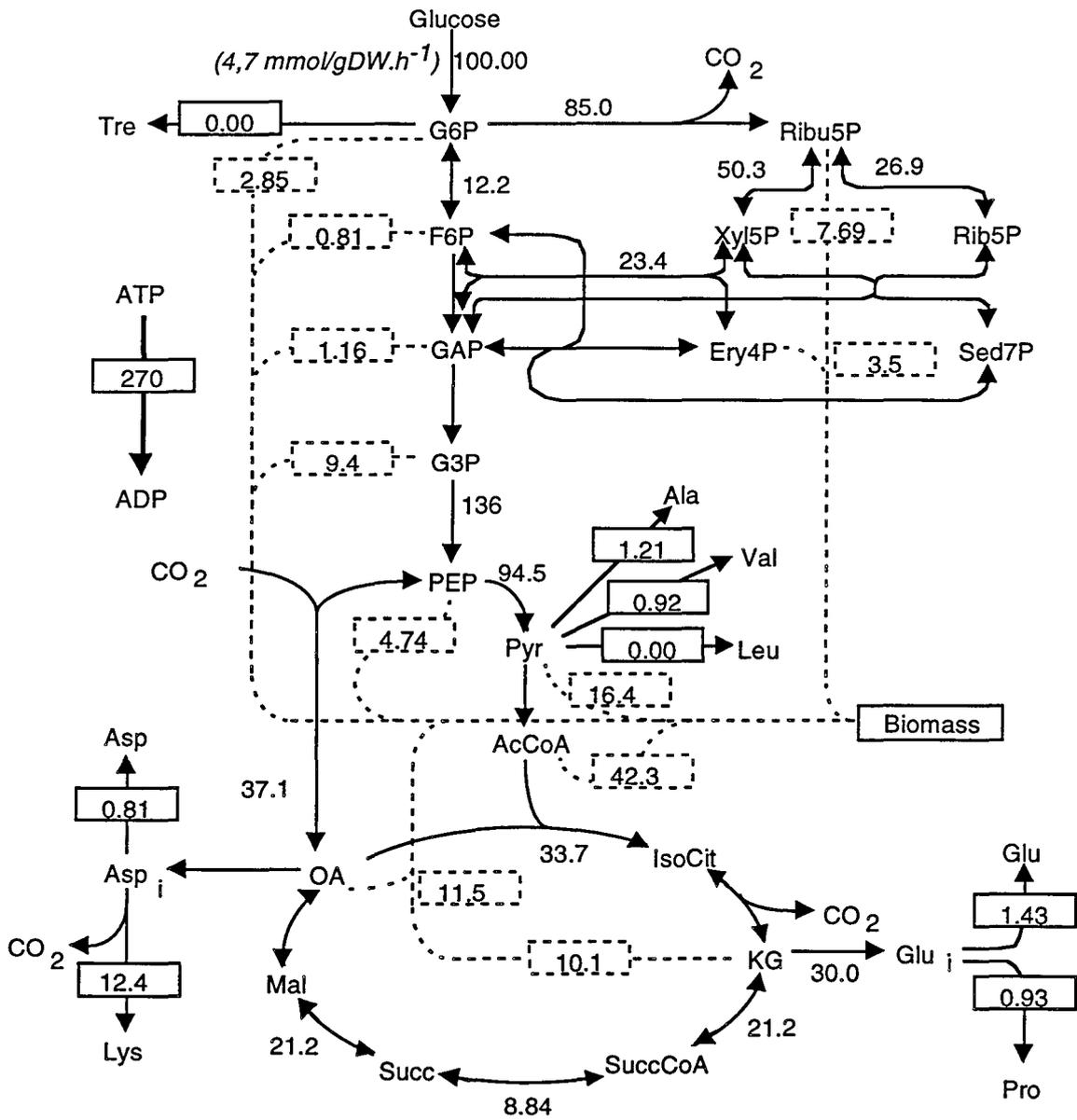


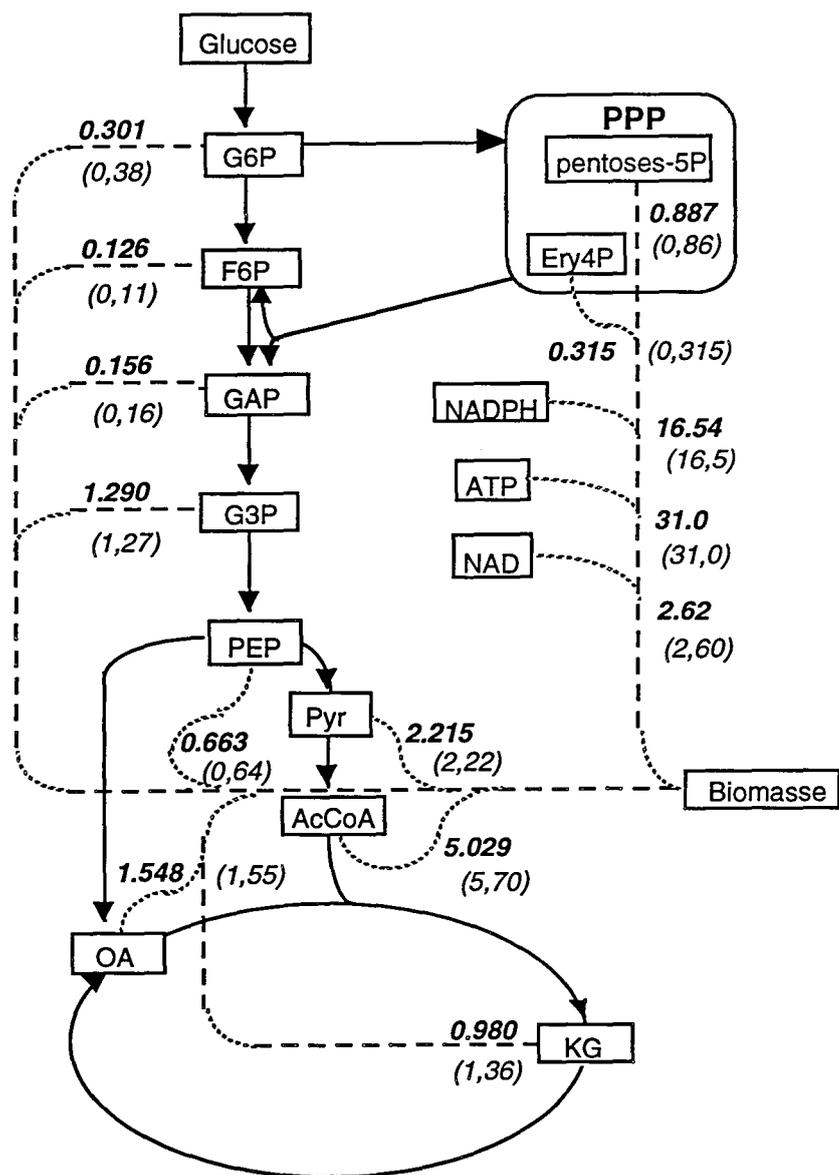
Figure 9 : Fluxes distribution at t=11 h (10-12h).

specific growth rate = 0.35 h^{-1} ; glucose uptake rate = $4.8 \text{ mmol/gDW.h}^{-1}$;
 calculated PPP participation = 56% ;
 repartition at the PEP node : 72 % "PK+PTS", 28% PEPC.

6. Roels, J.A. 1983, *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.
7. Shio, I., Otsuka, S. and Tsunoda, T. 1960, Glutamic acid from glucose by bacteria. III. On the pathway of pyruvate formation in *Brevibacterium flavum* No 2247. *J. Biochem. (Tokyo)*. **47** : 414.
8. Simon, J.L. 1985, *Etudes physiologiques et cinétiques de la production de lysine par deux Corynébactéries*. PhD Thesis, I.N.P.L., Nancy, France.
9. Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A. A., Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., Sahm, H. 1995, ¹³C-NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44** : 489-495.
10. Stephanopoulos, G., Sinskey, A.J. 1993, *Metabolic engineering - Methodologies and future prospects*. *Tibtech.*, **11**: 392-396.
11. Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G. 1990, Flux determination in cellular bioreaction networks : applications to lysine fermentations. In *Frontiers in Bioprocessing*. SK Sikdar, M. Bier, P. Todd Eds. CRC Press. Boca Raton; FL. 205-219.
12. Yamaguchi, K., Ishino, S., Araki, K., Shiharata, K. 1986, ¹³C-NMR studies of lysine fermentation with a *Corynebacterium glutamicum* mutant. *Agric. Biol. Chem.* **50** : 2453-2459.
13. Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G. 1993, Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* **41** : 633-646.

Remarques :

- les réactions biochimiques utilisées dans le réseau métabolique de Métaflux sont décrites en annexe 2
- l'ensemble des analyses des voies de biosynthèse individuelles intégrées dans Métaflux sont présentées en annexe 3. Elles concernent certains acides aminés (alanine, aspartate, glutamate, leucine, lysine, proline, valine), la biomasse et chacun de ses précurseurs.



$$\begin{array}{ll}
 Y_{S/P} = 0,01 \text{ mol Glc.g MS}^{-1} (0,01) & \alpha_{PPP} = 0,11 (0,115) \\
 Y_{CO_2/P} = 0,023 \text{ mol CO}_2\text{.g MS}^{-1} (0,024) & \alpha_{PK} = 0,82 (0,78) \\
 Y_{ATP/P} = 0,026 \text{ mol ATP.g MS}^{-1} (0,03) & \alpha_{PC} = 0,18 (0,22)
 \end{array}$$

Figure V.1 : Carte individuelle de synthèse de la biomasse modifiée d'après Guyonvarch. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux anciennes données adaptées de Péquignot (1995) et utilisées dans la publication.

V.1.2. Discussion générale sur Métaflux

V.1.2.1. Concept général

Nous avons introduit dans la méthodologie Métaflux le concept de voie individuelle de biosynthèse initialement développé par Simon (1986). C'est sur cette notion que repose l'algorithme d'évaluation des flux par notre méthode. L'entité indépendante est donc une voie entière, alors que les méthodes matricielles manipulent des réactions. Notre approche peut sembler en contradiction avec l'esprit de l'ingénierie métabolique qui vise à considérer un réseau biochimique dans son ensemble et avec ses relations. Mais la voie individuelle constitue un intermédiaire de calcul au même titre que la réaction enzymatique d'autres méthodes. On peut par ailleurs considérer qu'elles interagissent avec le reste du métabolisme grâce aux réactions de régénération.

V.1.2.2. Intégration de nouvelles données spécifiques aux Corynébactéries

Comme nous l'avons déjà exposé précédemment, la méthode simplifiée de synthèse de la biomasse selon Ingraham concerne *Escherichia coli*. Nous avons réalisé une première modification des besoins en précurseurs grâce aux données de Péquignot (1995) sur la composition macromoléculaire de *Corynebacterium glutamicum* (voir la publication, paragraphe V.1.1).

Cependant, la démarche d'Ingraham a été reprise par Guyonvarch pour *Corynebacterium glutamicum*. Les données calculées d'après les travaux de Péquignot ne nous ont permis de prendre en compte que la composition macromoléculaire des Corynébactéries, alors que les données de Guyonvarch intègrent non seulement une composition macromoléculaire adaptée, mais surtout les voies de biosynthèse spécifiques aux Corynébactéries, en particulier pour les acides teichoïques et mycoliques. Ceci conduit à la détermination d'une nouvelle série de besoins en précurseurs (Guyonvarch, communication personnelle) qui est présentée sur la nouvelle carte individuelle de biosynthèse de la biomasse (figure V.1). Les différences avec les valeurs de Péquignot sont peu importantes et portent surtout sur le besoin en G6P (0,30 pour Guyonvarch contre 0,38 pour Péquignot) et sur l' α -KG (0,98 contre 1,36).

Remarques :

- Dans la version de "Métaflux" utilisée dans le chapitre VI pour l'analyse métabolique des cultures microbiennes, nous avons retenu les valeurs des besoins en précurseurs de la biomasse proposées par Guyonvarch.
- Les données de Guyonvarch ont encore été affinées très récemment (Cocaign-Bousquet et coll., 1995), mais nous n'avons pas intégré ces nouvelles valeurs à Métaflux.

V.2. Influence de la biomasse

Les paragraphes précédents permettent de souligner le rôle crucial de la biomasse. C'est tout d'abord le métabolite majoritairement produit, voire le seul. D'autre part, la méthode utilisée pour sa biosynthèse est simplifiée, approximative et constitue une des principales hypothèses de notre méthode d'évaluation de flux métaboliques. Cela en fait également une des sources d'erreur les plus probables. Comme nous l'avons décrit dans la méthode Métaflux, la composition macromoléculaire de la biomasse est nécessaire pour calculer le besoin en chacun de ses précurseurs. En revanche, la composition élémentaire de la biomasse (CHON) n'intervient pas directement, mais elle est plus facilement mesurable et pourrait représenter une méthode pour intégrer les variations de la composition de la biomasse dans le calcul des flux. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à ces deux paramètres, ainsi qu'à l'influence du principe d'indépendance sur la construction de la carte individuelle de la biomasse.

V.2.1. Influence de la composition macromoléculaire

Comme nous l'avons montré dans le chapitre I (paragraphe I.4.), les bactéries possèdent des différences biochimiques et structurales susceptibles de faire varier leur composition intracellulaire en macromolécules (ce que nous avons appelé composition macromoléculaire). Grâce à ces mesures, il est possible de recalculer les besoins en chaque précurseur de synthèse de la biomasse, grâce à la procédure matricielle que nous avons développée dans le projet de publication.

Ainsi la conséquence d'une variation de la composition macromoléculaire sera donc une modification des besoins en chacun des précurseurs. Ceci implique deux conséquences pour la carte individuelle de synthèse de la biomasse :

- une répartition différente des "fuites" de précurseurs vers la biomasse, qui se répercute sur le calcul des paramètres individuels de synthèse de la biomasse ($\%PPP$, α_{PK} , α_{PC} ; $Y_{ATP/X}$),
- une modification du rendement $Y_{X/S}$ puisqu'il est calculé à partir des besoins en précurseurs, et donc du $Y_{CO_2/X}$ puisqu'il est déduit de l'équation stœchiométrique de la synthèse de la biomasse. Ces modifications sont très importantes car elles vont permettre de mieux corrélérer les calculs du q_s et q_{CO_2} par le modèle aux données expérimentales.

Remarque :

En toute rigueur, un changement de composition macromoléculaire entraîne un changement de la formule élémentaire CHON. Cependant la corrélation entre ces deux grandeurs est très complexe. Il faudrait disposer d'une formule élémentaire moyenne de chaque macromolécule et la pondérer par l'importance de celle-ci dans la cellule. Or ceci introduirait un certain nombre d'hypothèses et

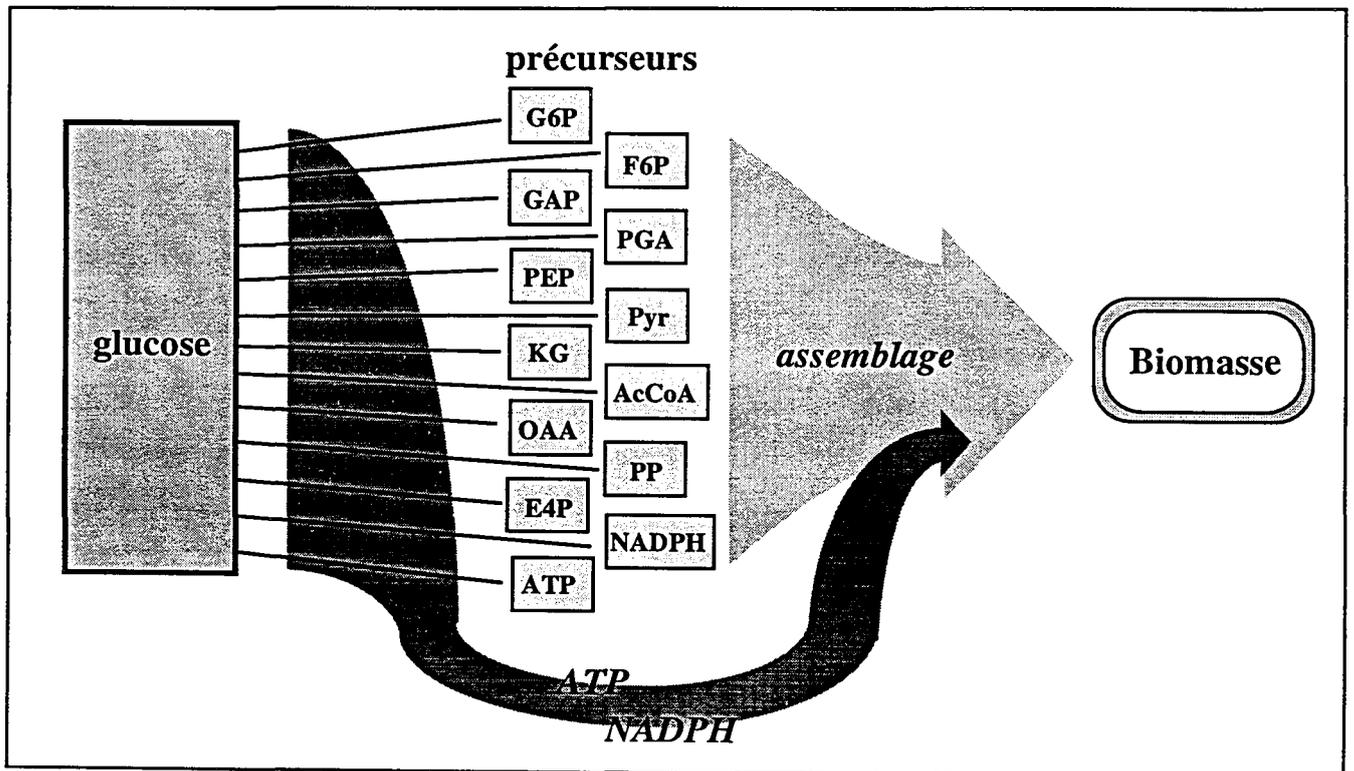
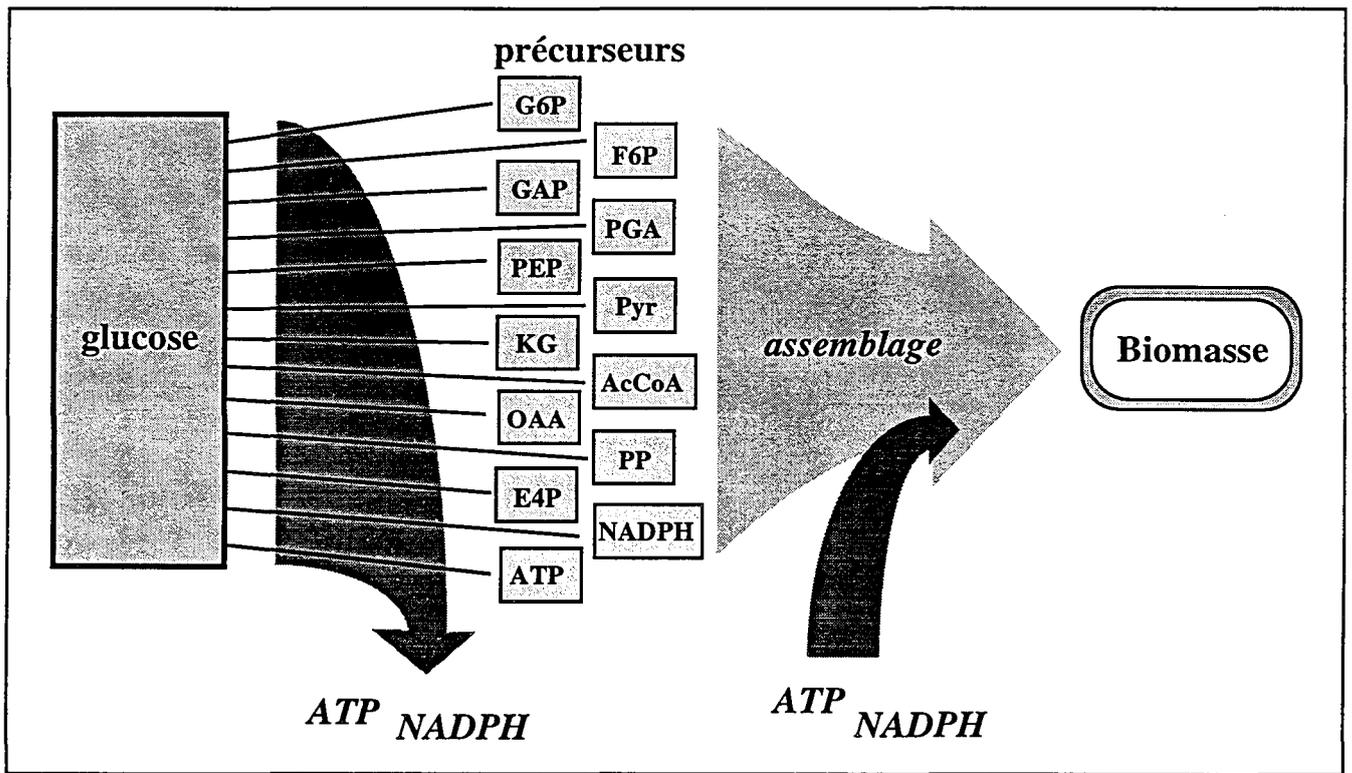


Figure V.2 : Méthode de synthèse de la biomasse : schématisation du principe d'autosuffisance totale (schéma du haut) et d'autosuffisance globale (schéma du bas).

de sources d'erreurs supplémentaires, sans pour autant apporter plus de précision ou de réalité par rapport à l'emploi d'une formule élémentaire globale moyenne et invariable.

V.2.2. Influence de la composition élémentaire

Les études expérimentales présentées au chapitre III nous ont permis d'apprécier la variation de la formule élémentaire de la biomasse au cours d'une culture semi-continue de *Corynebacterium glutamicum*. La formule élémentaire est une grandeur globale qui reflète la composition cellulaire. La variation de la composition CHON est facilement mesurable, mais il est très difficile de la corrélérer à celle de la composition macromoléculaire. Elle interviendra donc uniquement au niveau de l'équation stœchiométrique de la synthèse de la biomasse en modifiant le calcul du coefficient $Y_{CO_2/X}$. Tous les autres paramètres, qui devraient en théorie subir une variation, ne peuvent pas être recalculés à partir de la formule élémentaire et seront donc inchangés. La prise en compte de la variation de la composition CHON au cours d'une culture ne présente donc que l'intérêt de mieux simuler la production de gaz carbonique.

Conclusions

La variation de la composition de la biomasse peut s'exprimer à deux niveaux : intracellulaire avec la variation de la composition macromoléculaire et globale avec la variation de la composition élémentaire. Le dosage des éléments CHON est une opération simple, alors que celui des macromolécules est complexe et fastidieux. Des variations significatives de ces deux grandeurs ont été observées en fonction de la souche utilisée ou de la phase de culture considérée. Il est possible de prendre en compte ces variations au niveau de Métaflux, afin d'ajuster les calculs à la réalité physiologique et aux données expérimentales.

V.2.3. Influence de la construction de la carte biomasse

La carte individuelle de la biomasse a été construite en considérant deux étapes : premièrement, la synthèse des précurseurs à partir du glucose, puis l'assemblage de ces précurseurs pour conduire aux macromolécules et à la biomasse (figure V.2). Le principe d'**indépendance totale**, c'est à dire d'**autosuffisance**, des voies de synthèse de la biomasse a été appliqué tout au long de cette procédure, depuis la synthèse des précurseurs jusqu'à leur assemblage. Une exception a cependant été tolérée en ce qui concerne le NADPH : ce composé est presque exclusivement produit par la voie des pentoses phosphates, et la dissipation du surplus de NADPH obtenu lors de la synthèse des précurseurs entraînerait une surestimation de la participation de la voie des pentoses.

Nous avons donc autorisé le PP et l'E4P à céder leur NADPH à la phase d'assemblage des macromolécules.

En tous cas, le bilan de la première phase, tous précurseurs confondus, est une production nette d'ATP et de NADPH (qui sera dissipée pour l'ATP). En revanche, la deuxième phase requiert ces deux composés, qui seront fournis par une consommation supplémentaire de glucose (figure V.2, schéma du haut).

Une autre façon d'envisager la synthèse de la biomasse serait de considérer une **autosuffisance globale** des voies de biosynthèse de la biomasse, au moins pour l'ATP et le NADPH (figure V.2, schéma du bas). Il s'agit de permettre à la phase d'assemblage d'utiliser l'excédent de ces composés produit par la phase de biosynthèse des précurseurs. Ceci aura donc pour conséquence de diminuer le besoin global en ATP et en NADPH (tableau V.1). Cette nouvelle procédure entraîne une modification des paramètres de la carte individuelle de la biomasse (tableau V.2), mais pas des besoins en chacun des autres précurseurs.

Tableau V.1 : Comparaison des bilans en ATP et NADPH lors de la synthèse de biomasse, entre autosuffisance totale et autosuffisance globale pour l'ATP et le NADPH.

Besoins (mmol.g ⁻¹)	biosynthèse des précurseurs	assemblage	autosuffisance totale	autosuffisance globale
ATP	-27,3	29,2	29,2	1,9
NADPH	-1,5	11,5	11,5	10,0

Tableau V.2 : Comparaison des paramètres de la carte individuelle de synthèse de la biomasse entre autosuffisance totale et autosuffisance globale pour l'ATP et le NADPH.

	autosuffisance totale	autosuffisance globale
Y _{S/X}	0,23 mol.mol ⁻¹	0,21 mol.mol ⁻¹
Y _{ATP/X}	0,7	0
Y _{CO2/X}	0,38	0,24
%PPP	49 %	61 %
αPK	79 %	74 %
αPC	21 %	26 %

Toutes les variations observées proviennent de la diminution du besoin en ATP, qui passe de 29,2 mmol.g MS⁻¹ à 1,9. Elle entraîne en particulier une baisse de la quantité de glucose requise pour les besoins en ATP de la biomasse (0,2 mmol Glc.g MS⁻¹ au lieu de 1,3). Cette baisse peut sembler relativement faible au regard de l'économie d'ATP, mais elle est en rapport avec le faible coefficient

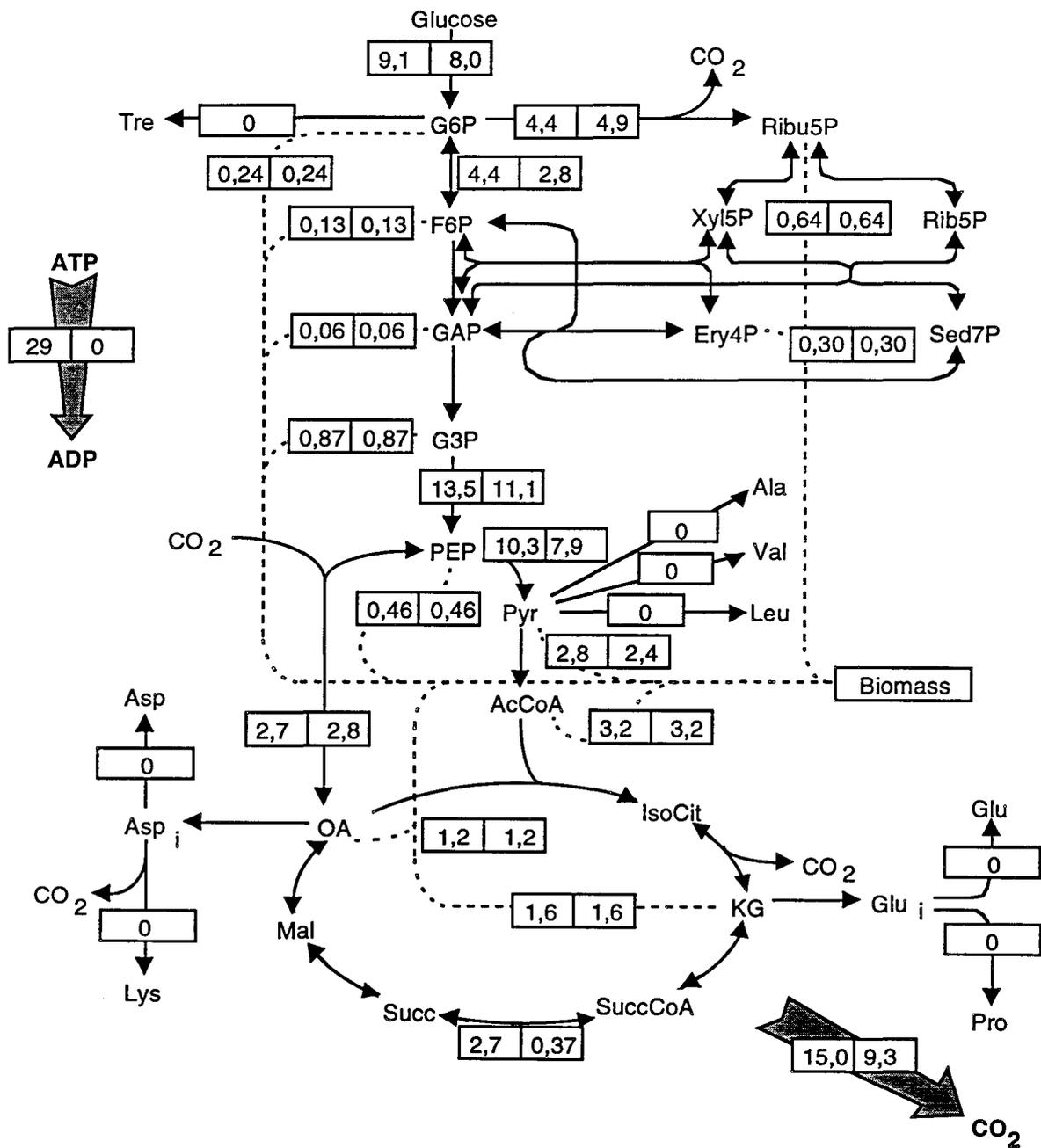


Figure V.3 : Influence de la méthode de construction de la carte individuelle de la biomasse :
 - autosuffisance totale (chiffre de gauche)
 - autosuffisance globale (chiffre de droite)

stœchiométrique du glucose pour l'ATP ($1/27 \text{ mol Glc.mol ATP}^{-1}$). D'autre part, la diminution du besoin en ATP se traduit indirectement par une augmentation du glucose consommé pour synthétiser du NADPH via la voie des pentoses ($0,74 \text{ à } 0,82 \text{ mmol Glc.g MS}^{-1}$), et donc par une augmentation de la participation de la voie des pentoses (%PPP passe de 49 à 61%). En effet, la diminution de la consommation de glucose pour la synthèse d'ATP constitue autant de NADPH qui ne seront pas formés au niveau du cycle de Krebs et qui devront être fournis par une augmentation du glucose dans la voie des pentoses. Ces deux actions combinées se répercutent sur le $Y_{S/X}$, qui diminue de 0,23 à 0,21 mole.mole⁻¹, reflétant bien l'économie de substrat réalisée en minimisant la dissipation d'ATP. Le $Y_{CO_2/X}$ suit cette tendance en passant de 0,38 à 0,24 mole.mole⁻¹. La répartition au nœud PEP subit également l'effet de la baisse en ATP car le catabolisme du glucose pour la synthèse d'ATP emprunte exclusivement la glycolyse via la Pyruvate Kinase. Cette dernière voit donc sa participation diminuer de 79 à 74 % au profit des voies anapérotyques (21 à 26%) lorsqu'on passe d'une indépendance totale à une indépendance globale.

Pour visualiser concrètement ces observations, nous avons réalisé une évaluation des flux en utilisant un même fichier de données pour les deux méthodes (production théorique de $1 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de biomasse uniquement). Les résultats sont présentés sur la figure V.3. On remarque bien que les besoins en précurseurs n'ont pas varié, mais que le flux global de matière carbonée a diminué en passant de l'autosuffisance totale à l'autosuffisance globale. On passe par exemple de 9,1 à 8 mmol de glucose.g MS⁻¹.h⁻¹ au niveau du PTS, de 10,3 à 7,9 mmol de PEP.g MS⁻¹.h⁻¹ au niveau de la Pyruvate Kinase, et de 2,7 à 0,37 mmol de glucose.g MS⁻¹.h⁻¹ au niveau du cycle de Krebs. De même, la production de gaz carbonique diminue de 15 à 9,3 mmol de glucose.g MS⁻¹.h⁻¹. En revanche, le flux dans la Phosphoénol-pyruvate Carboxylase reste stable. Bien entendu, la dissipation d'ATP passe de 29 à 0 mmol.g MS⁻¹.h⁻¹ puisque c'est l'hypothèse recherchée.

Conclusion - perspective :

Le passage d'un principe d'une autosuffisance totale à celui d'une autosuffisance globale (pour l'ATP et le NADPH) dans la synthèse de la biomasse entraîne une baisse de la consommation du glucose et une modification de la répartition du flux carboné.

A terme, on pourrait envisager une interaction entre toutes les cartes individuelles, au moins au niveau de l'ATP. D'une manière générale, la synthèse des métabolites est productrice d'ATP. Seule la biomasse est consommatrice. Cela reviendrait à construire une carte individuelle de biomasse adaptative en fonction des productions des autres métabolites, de manière à obtenir une dissipation minimale d'ATP.

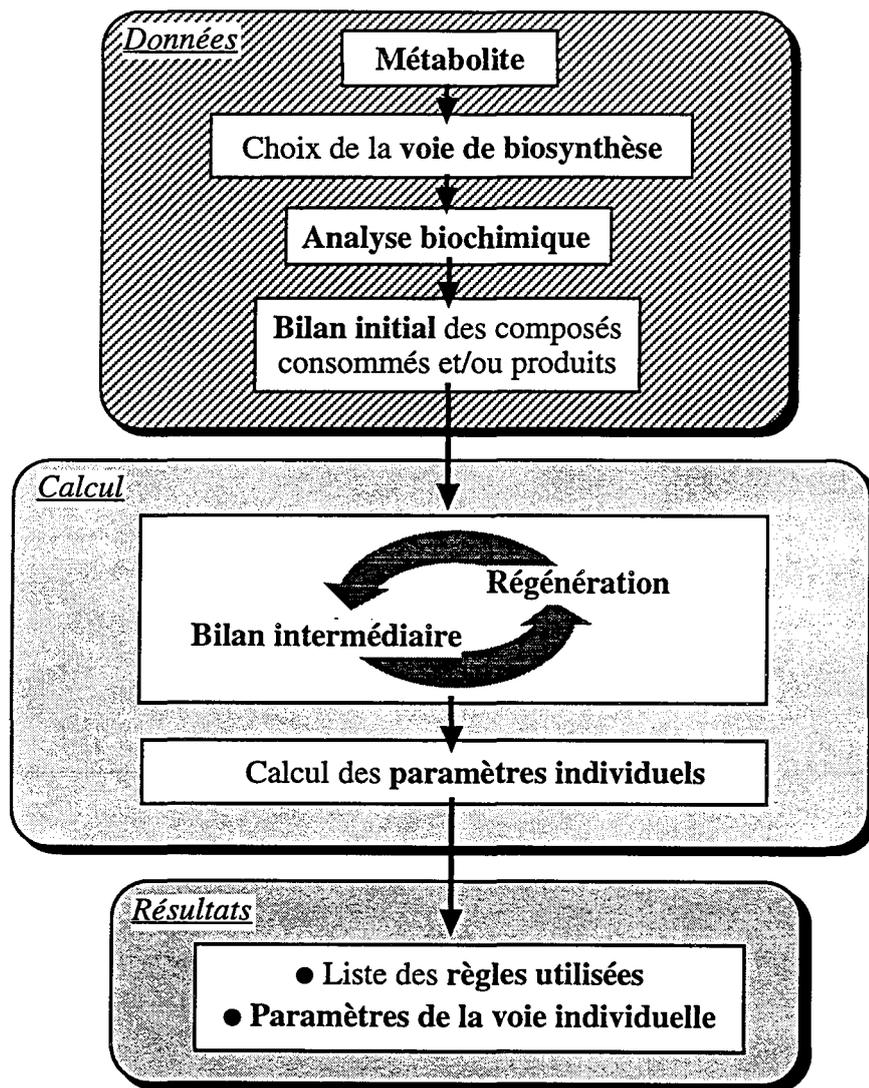


Figure V.4 : Schématisation de la procédure de construction automatique des cartes individuelles de biosynthèse.

V.3. Procédures annexes

V.3.1. Construction automatique des cartes individuelles de biosynthèse

L'évaluation des flux par Métaflux requiert un prétraitement du réseau biochimique afin de définir les cartes individuelles de biosynthèse. Ce prétraitement consiste donc à sélectionner une voie de biosynthèse, recenser les métabolites consommés et produits au cours de cette voie, procéder aux régénérations et enfin calculer les paramètres individuels de cette voie de biosynthèse. Cette procédure est relativement lourde et fastidieuse, et doit être accomplie dans un ordre précis, en particulier dans l'utilisation des réactions de régénération. Nous avons donc imaginé une procédure automatisée, développée en langage C sur station de travail, qui a pour objectifs :

- de faciliter le travail de l'utilisateur qui souhaiterait ajouter un métabolite au réseau biochimique,
- de standardiser la construction des cartes individuelles,
- de faire le lien entre les bases de données métaboliques (type Métalgen.db), qui analysent qualitativement le métabolisme, et Métaflux.

V.3.1.1. Principe

L'algorithme utilisé par cette procédure est présenté sur la figure V.4. Toute la partie heuristique d'analyse qualitative du métabolisme reste à la charge de l'utilisateur (partie hachurée de la figure V.4). Il doit sélectionner une voie de synthèse pour le métabolite choisi et en faire l'analyse biochimique afin de déterminer le bilan des intermédiaires consommés et/ou produits. Cette analyse qualitative pourra par la suite être effectuée par une base de données métaboliques. Le bilan ainsi obtenu sert ensuite de fichier de base à la procédure automatique. Elle va effectuer la régénération des intermédiaires en progressant par des cycles "régénération-bilan" : elle applique la première règle, dresse le nouveau bilan intermédiaire, applique la seconde règle, dresse le bilan... ainsi de suite jusqu'à la dernière règle. L'ordre des règles de régénération est le suivant : OA, PEP, Pyr, AcCoA, Glu, SuccCoA, NAD, FAD, NADPH et ATP. En fin de procédure, l'utilisateur obtient le nombre d'utilisation de chacune des réactions de régénération et la valeur des paramètres de la voie individuelle ($Y_{s/p}$; $Y_{CO2/p}$; $Y_{ATP/p}$; α_{ppp} ; α_{PK} et α_{PC}).

Cette procédure est entièrement compatible avec **Métalgen.db**, la base de données métabolique développée par Rouxel (1992). Cette base permet en particulier de répertorier tous les chemins métaboliques existant pour synthétiser un composé B à partir d'un composé A. Pour chaque voie identifiée, Métalgen.db dresse un bilan métabolique identique à celui que nous utilisons en fichier de données dans la procédure de construction automatique de cartes individuelles.

V.3.1.2. Procédure de calcul

Nous avons utilisé un formalisme matriciel pour décrire les réactions de régénération, regroupées dans la matrice **RR**. Le fichier bilan de la voie de biosynthèse analysée est codé sous la forme d'un vecteur (vecteur **VB**), et les résultats (nombre d'utilisation de chaque réaction de régénération) sont obtenus sous une forme vectorielle (vecteur **VC**). Les paramètres de la voie individuelle sont également calculés par cette procédure matricielle. Tous les détails du calcul sont fournis en annexe 4.

V.3.1.3. Validation : carte individuelle de la synthèse de lysine par la voie anaplérotique

Cette voie a été décrite en détail dans la figure 4a du projet de publication. Le bilan en est rappelé tableau V.3.

Tableau V.3 : Bilan de la voie "anaplérotique" de biosynthèse de la lysine.

<i>consommés</i>	<i>produits</i>
0,5 glucose	1 lysine
0,5 PEP	0,5 pyruvate
1 pyruvate	2 α -KG
2 glutamates	1 succinate
1 SuccCoA	1 CoA
1 NAD	1 NADH
2 NADPH	2 NADP
0,5 ATP	0,5 ATP

Le fichier de données **VB** est donc le suivant :

$$[0 \ 0,5 \ 0,5 \ 0 \ 2 \ 1 \ 1 \ 0 \ 2 \ 0,5 \ -0,5]$$

et les résultats obtenus, qui correspondent bien à ceux calculés "manuellement", sont :

- règles utilisées : 0,5 fois r2 ; 1 fois r3 ; 2 fois r5 ; 1 fois r6 ; 2 fois r7 ; et 4 fois r9.

- paramètres individuels de cette voie anaplérotique : $Y_{s/p} = 4/3$; $Y_{CO2/p} = 2$; $Y_{ATP/p} = 4/3$; $\alpha_{ppp} = 1/4$; $\alpha_{pk} = 1/2$ et $\alpha_{pc} = 1/2$.

NB : pour les numérotations des règles, se reporter à l'annexe 4.

V.3.1.4. Limites d'application

Cette procédure automatique est valable pour tout métabolite synthétisé à partir du glucose et dont le bilan des intermédiaires consommés et produits ne fait apparaître aucun composé non répertorié. Si un composé intermédiaire nouveau apparaissait, il faudrait en étudier les régénérations possibles, sélectionner une unique règle de régénération et l'intégrer dans la matrice **RR**.

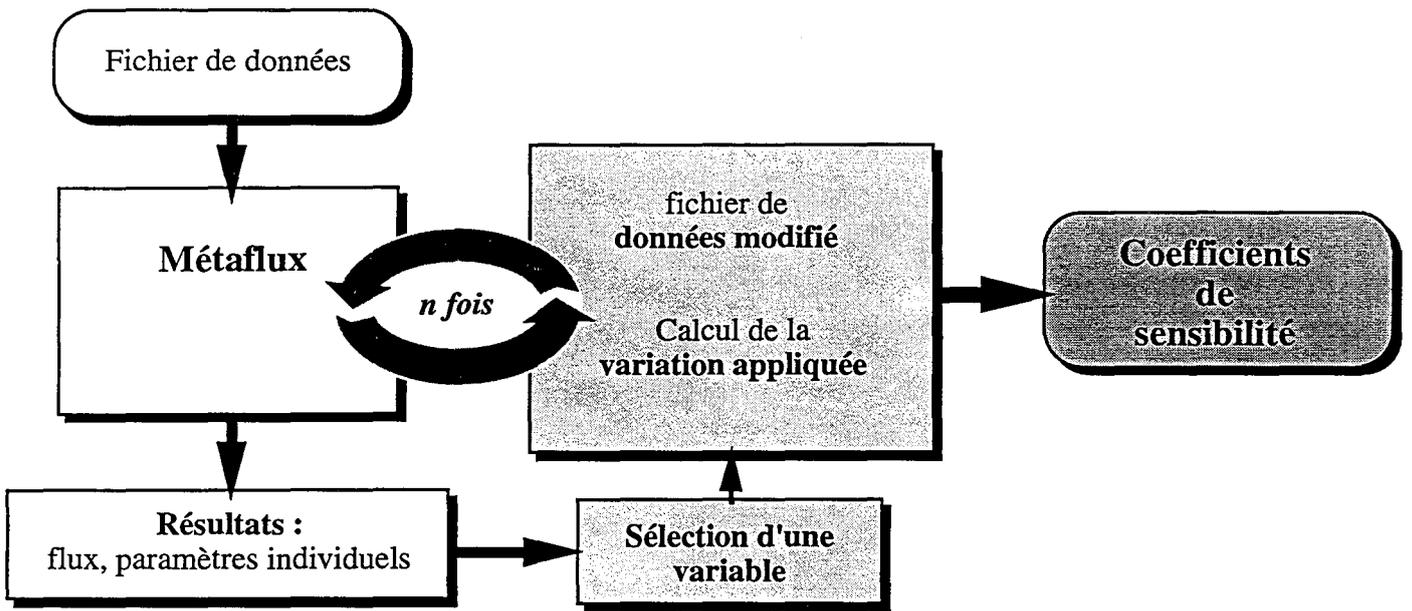


Figure V.5 : Schématisation de la procédure d'analyse de sensibilité.

De même, seuls les métabolites "simples" sont concernés, c'est-à-dire ceux pour lesquels il existe une voie de biosynthèse réelle. En particulier, la biomasse ne peut pas être traitée directement par cette procédure automatique. Mais son application peut être envisagée pour de nombreux métabolites tels que les acides aminés (Ala, Asp, Glu, Leu, Pro, Val, Thr, Ile...), les acides organiques (acétate, lactate, butyrate...) et bien entendu les intermédiaires des voies principales (et via lesquels on pourra reconstituer la biomasse).

Conclusion :

La procédure proposée permet de faciliter la manipulation de Métaflux et de normaliser la construction des cartes individuelles. L'exemple présenté conduit à des résultats identiques à ceux obtenus "manuellement" et démontrent l'efficacité de cette procédure automatique. Enfin, la démarche adoptée permet une compatibilité totale avec d'autres programmes informatiques, laissant la possibilité à de futurs développements.

V.3.2. Analyse de sensibilité de la vitesse de consommation du glucose et de la participation de la voie des pentoses par rapport à la production en métabolite

L'analyse de sensibilité a pour but la détermination de l'influence d'un métabolite donné sur le calcul des flux, en l'occurrence l'influence de la variation de la vitesse de production d'un métabolite donné M (q_M) sur le calcul de la vitesse spécifique globale de consommation du glucose (q_s) et de la participation globale de la voie des pentoses (%PPP).

Plusieurs applications sont envisagées, que nous développerons ci-après :

- évaluation de l'effet d'une erreur de mesure sur la vitesse de production d'un métabolite,
- classement des métabolites dans leur ordre d'influence décroissante. Ce classement peut permettre de cibler les sources d'erreurs les plus probables en cas de désaccord entre q_s calculé et q_s expérimental,
- suivi de l'influence d'un métabolite sur le calcul des flux au cours du temps,
- exploitation des possibilités de simulation,

V.3.2.1. Principe et interprétations de l'analyse de sensibilité

Nous faisons varier la vitesse spécifique de production d'un métabolite M (q_M) de -50 % à +50 % de sa valeur initiale q_{M0} , avec un pas d'incrément de 5 %. Métaflux est utilisé pour le calcul des flux à chaque nouvelle valeur de q_M (figure V.5). Nous avons choisi de fixer notre attention sur le q_s et le %PPP, qui sont des paramètres clés du réseau, et qui sont accessibles par

l'expérience. Nous calculons ainsi deux coefficients de sensibilité, s_{qs/q_M} et s_{PPP/q_M} , dont les expressions sont les suivantes :

$$s_{qs/q_M} = \frac{\Delta qs/q_s}{\Delta q_M/q_M} \quad \text{et} \quad s_{PPP/q_M} = \frac{\Delta PPP/PPP}{\Delta q_M/q_M}$$

avec $\Delta qs = qs_i - qs_0$, $\Delta q_M = q_{Mi} - q_{M0}$, $\Delta PPP = \%PPP_i - \%PPP_0$.

L'indice i représente le calcul pour la variation considérée du q_M , l'indice 0 représente le calcul de référence (pour le q_M initial).

L'interprétation du s_{qs/q_M} est simple car il reflète directement l'importance du métabolite considéré au niveau de la vitesse spécifique de consommation du glucose. Plus s_{qs/q_M} est élevé, plus sa participation dans le qs est importante, et donc plus le métabolite est influent.

En revanche, s_{PPP/q_M} ne reflète pas un flux net, mais une répartition et son interprétation n'est pas aussi directe que celle du s_{qs/q_M} . Une valeur élevée de s_{PPP/q_M} indique que le métabolite en question influence fortement le calcul du $\%PPP$. Ceci n'est possible que pour un **métabolite d'importance intermédiaire** (ni minoritaire, ni majoritaire), c'est à dire ayant une valeur du s_{qs/q_M} moyenne. Une valeur faible de s_{PPP/q_M} peut s'interpréter de deux manières suivant l'importance de ce métabolite, c'est à dire suivant la valeur de s_{qs/q_M} :

- s_{qs/q_M} et s_{PPP/q_M} sont faibles tous les deux : le **métabolite est minoritaire** et n'influence ni la vitesse spécifique de consommation du glucose, ni la participation de la voie des pentoses.

- s_{qs/q_M} est élevé et s_{PPP/q_M} est (très) faible : le **métabolite est majoritaire**, c'est lui qui impose la valeur du s_{PPP/q_M} . Une variation de la production de ce métabolite ne modifie pas la valeur du paramètre individuel (il s'agit d'une constante pour un métabolite donné), et ne modifiera que très peu la valeur globale de la participation de la voie des pentoses puisque les autres métabolites sont minoritaires.

Remarque : Une étude de sensibilité réalisée pour un métabolite qui est le seul produit d'une culture montrera les caractéristiques suivantes : $s_{qs/q_M} = 1$ et $s_{PPP/q_M} = 0$. On considérera par ailleurs que des valeurs de ces coefficients inférieures à 0,1 ne sont pas significatives.

V.3.2.2. Applications

a. Quantification et évolution du rôle d'un métabolite dans le calcul des flux au cours d'une culture

Nous allons effectuer les analyses de sensibilité sur les données cinétiques de production de lysine par *Brevibacterium flavum* en culture discontinue sur glucose (Simon, 1983 ; données

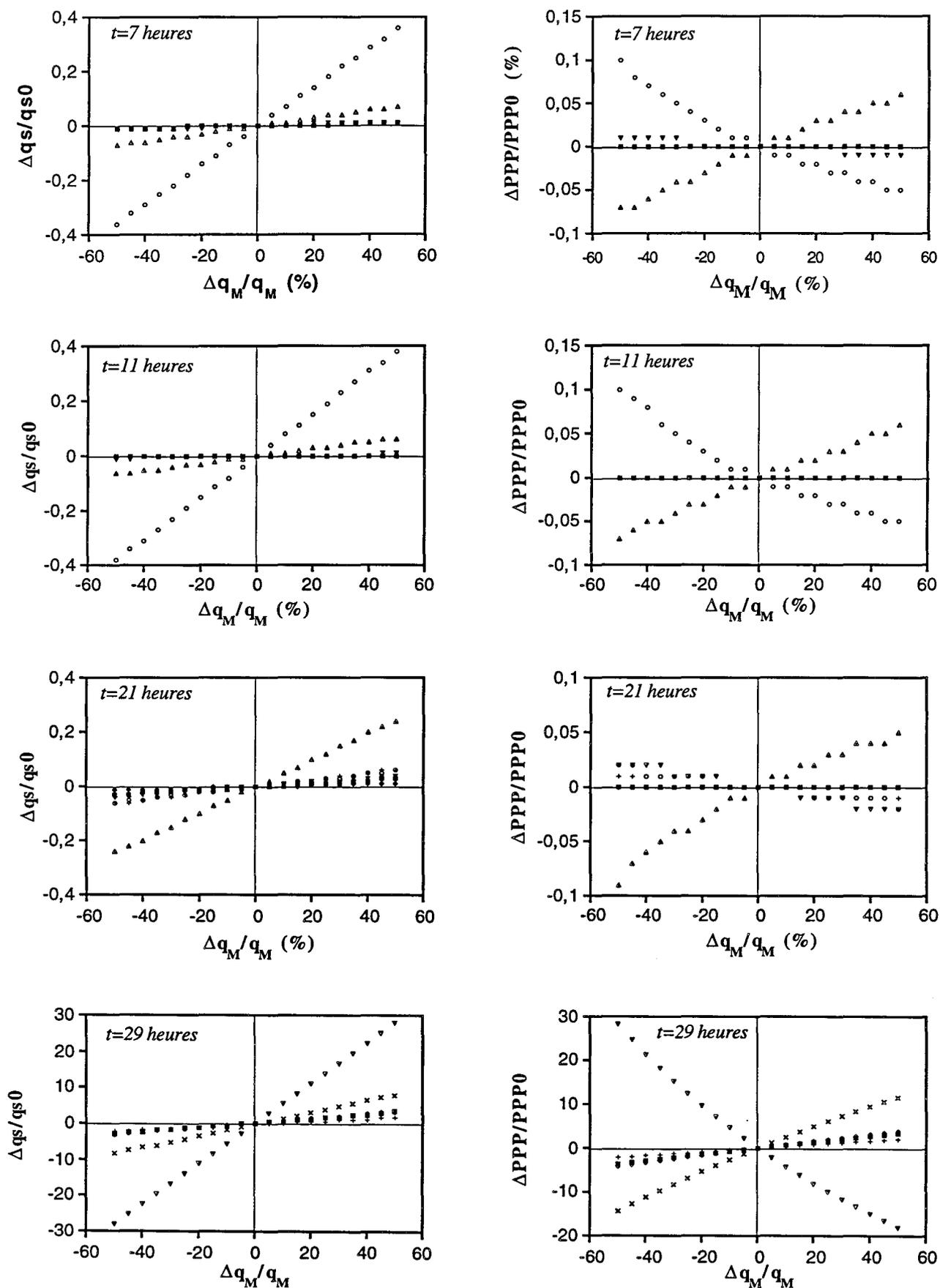


Figure V.6 : Evolution des $\Delta qs/qs$ et $\Delta PPP/PPP$ en fonction de la variation relative $\Delta q_M/q_M$ aux différents temps d'échantillonnage choisis pour le calcul des coefficients de sensibilité.

présentées dans le projet de publication). Nous avons choisi quatre instants de la culture pour lesquels nous déterminons les coefficients de sensibilité. Le tableau V.4 rassemble les données cinétiques pour chaque métabolite à chaque instant, et la variation maximale que nous appliquerons pour le calcul des coefficients de sensibilité.

Tableau V.4 : Vitesses spécifiques de production des métabolites détectés dans l'expérience pour les quatre temps d'échantillonnage choisis. Le chiffre indiqué en "±" correspond à la variation appliquée pour le calcul des sensibilités (± 50% de la valeur initiale).

<i>vitesse spécifique de production et variation appliquée</i> (en mmol/gMS.h ⁻¹)				
	<i>7h</i>	<i>11h</i>	<i>21h</i>	<i>29h</i>
<i>Biomasse</i>	8,1 ± 4,05	14,0 ± 7,0	0,48 ± 0,24	0
<i>Lysine</i>	0,40 ± 0,20	0,6 ± 0,3	0,50 ± 0,25	0
<i>Glutamate</i>	0,10 ± 0,05	0,07 ± 0,035	0,09 ± 0,045	0,10 ± 0,05
<i>Alanine</i>	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,02 ± 0,01
<i>Aspartate</i>	0	0,04 ± 0,02	0,22 ± 0,11	0,012 ± 0,006
<i>Proline</i>	0	0,044 ± 0,022	0,064 ± 0,032	0,032 ± 0,016
<i>Valine</i>	0,06 ± 0,03	0,043 ± 0,022	0,043 ± 0,022	0,014 ± 0,007

Les résultats de ces calculs sont représentés sous forme de graphes montrant $\frac{\Delta q_s}{q_s}$ ou $\frac{\Delta PPP}{PPP}$ en fonction de $\frac{\Delta q_M}{q_M}$ (figure V.6). Ils montrent plusieurs types de comportement :

- les représentations $\frac{\Delta q_s}{q_s}$ en fonction de $\frac{\Delta q_M}{q_M}$ sont des **droites croissantes** de pente s_{q_s/q_M} . s_{q_s/q_M} est donc constant et positif. Ces corrélations linéaires sont dues au fait que la vitesse spécifique de consommation du glucose est directement proportionnelle à la vitesse spécifique de production d'un métabolite donné.

- les relations $\frac{\Delta PPP}{PPP}$ en fonction de $\frac{\Delta q_M}{q_M}$ se traduisent par des **branches paraboliques** croissantes ou décroissantes. s_{PPP/q_M} instantané n'est pas constant et peut être positif ou négatif. Compte tenu de l'expression mathématique du % PPP, il apparaît que l'allure de ces courbes est le résultat d'un calcul sans aucune signification physiologique particulière. En effet, $\%PPP = \frac{(3)}{(1) + (9) + (10)}$. Or (3) = $\phi_1(1)$; (9) = $\phi_2(1)$ et (10) = $\phi_3(1)$ (ϕ_1 , ϕ_2 et ϕ_3 étant des fonctions linéaires), (1) étant lui-même une fonction linéaire de la production du métabolite M. Donc $\%PPP = \phi(M) / \phi'(M)$, avec $\phi(M)$ et $\phi'(M)$ relations linéaires, ce qui se traduit graphiquement par une courbe de type parabole. Cependant, la variation du s_{PPP/q_M} est faible et les courbes peuvent être assimilées à des droites de pente un s_{PPP/q_M} moyen.

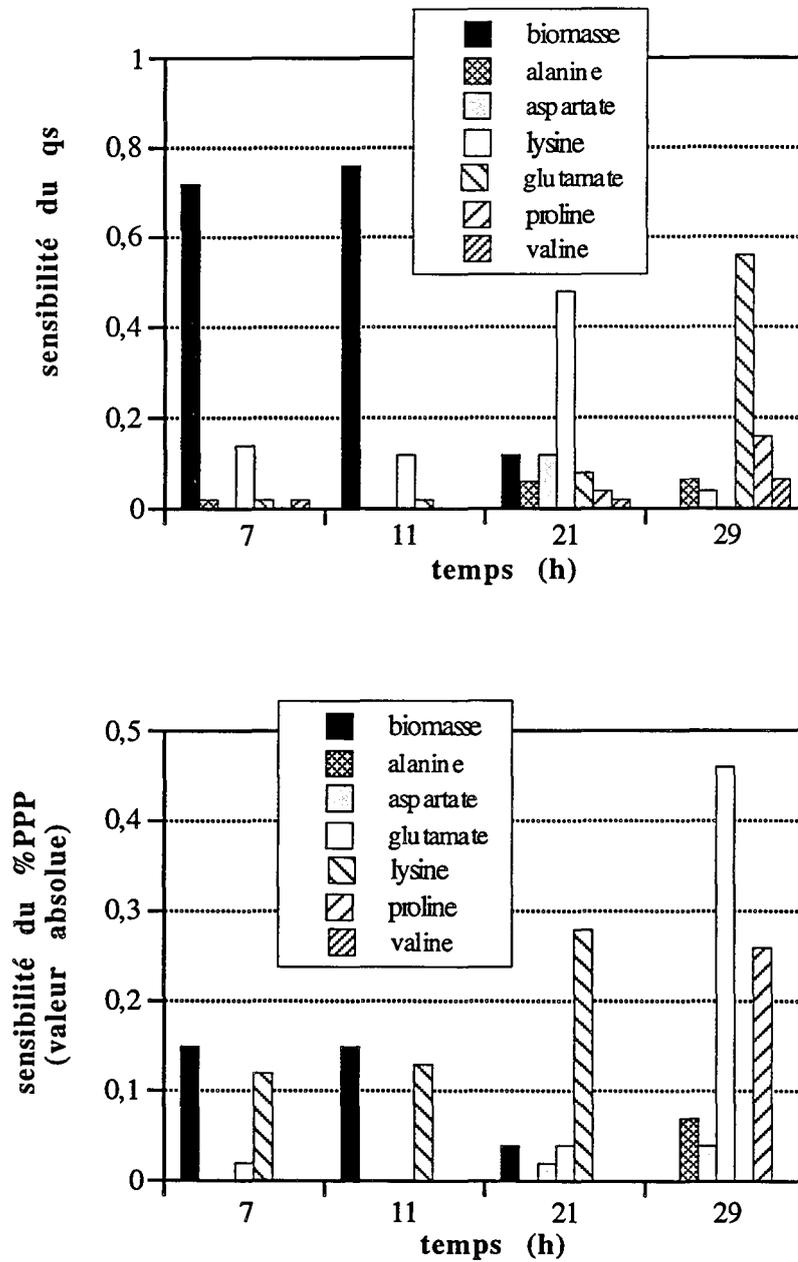


Figure V.7 : Coefficients de sensibilité du q_s et du %PPP par rapport à la vitesse de production de chaque métabolite identifié dans la culture, aux différents temps d'échantillonnage.

Ceci permettra un classement et une comparaison plus faciles des métabolites quant à leur influence sur le %PPP. Le sens de la variation (croissante ou décroissante) trouve une explication physiologique. Tout provient du fait que le %PPP est un rapport. Considérons tout d'abord les deux situations extrêmes où le métabolite M possède un %PPP nul ou égal à 100%. Si $\%PPP_M = 0$, alors le %PPP total diminue quand la production du métabolite augmente : il y a un **effet de dilution**. Au contraire, si $\%PPP_M = 100$, alors le %PPP total augmente quand la production du métabolite augmente. Donc dans le premier cas, s_{PPP/q_M} sera négatif, et positif dans le deuxième cas. Pour tous les cas intermédiaires, le signe de s_{PPP/q_M} dépendra de "l'effet dilution". Si le métabolite M possède un $\%PPP_M$ inférieur à celui du métabolite majoritairement produit, alors s_{PPP/q_M} sera négatif, et positif dans la situation inverse. Le signe de s_{PPP/q_M} pour un même métabolite M pourra donc changer si celui passe d'une situation de métabolite minoritaire à majoritaire ou inversement.

Considérons maintenant les résultats de l'exemple proposé. Le tableau V.5 rassemble les valeurs s_{qs/q_M} et s_{PPP/q_M} de chaque métabolite pour les 4 instants choisis, qui sont représentées en fonction du temps sur la figure V.7. L'exploitation de cette figure peut se faire de deux manières :

- classement de l'importance des métabolites à un instant donné,
- évolution de l'influence d'un métabolite au cours du temps.

Tableau V.5 : Calcul des coefficients de sensibilité des paramètres q_s et %PPP à la production des différents métabolites pour les échantillons choisis.

	s_{qs/q_M}				s_{PPP/q_M}			
	7h	11h	21h	29h	7h	11h	21h	29h
<i>Biomasse</i>	0,72	0,76	0,12	0	-0,15	-0,15	-0,04	0
<i>Lysine</i>	0,14	0,12	0,48	0	0,12	0,13	0,28	0
<i>Glutamate</i>	0,02	0,02	0,08	0,56	-0,02	0	-0,04	-0,46
<i>Alanine</i>	0,02	0	0,06	0,065	0	0	0	0,07
<i>Aspartate</i>	0	0	0,12	0,04	0	0	-0,02	0,04
<i>Proline</i>	0	0	0,04	0,16	0	0	0	0,26
<i>Valine</i>	0,02	0	0,02	0,065	0	0	0	0

A 7 heures, de même qu'à 11 heures, c'est la biomasse qui influence le plus fortement le q_s , suivie par la lysine, les autres métabolites n'ayant aucune influence significative. A 21 heures, c'est la lysine qui devient prépondérante, la biomasse, l'aspartate et le glutamate ayant des contributions équivalentes. Enfin, à 29 heures, ce sont le glutamate et la proline qui influencent le q_s (figure V.7).

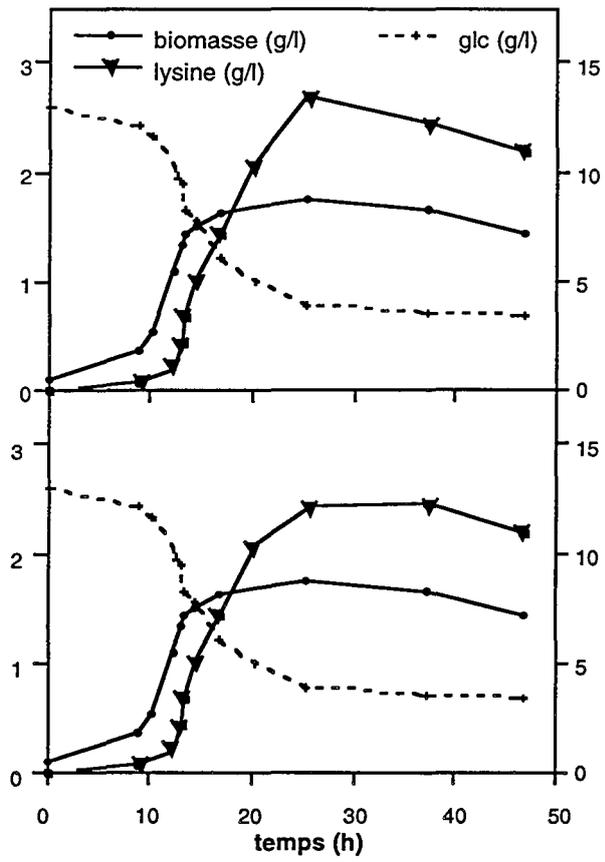


Figure V.8 : Modification de la cinétique de la production de lysine.

Concernant le %PPP, biomasse et lysine présentent des influences comparables aussi bien à 7 heures qu'à 11 heures. A 21 heures, seule la lysine a une influence significative, et à 29 heures, on retrouve glutamate et proline (figure V.7).

Comme le montre les résultats présentés ci-dessus, le premier intérêt de ces études est de quantifier l'influence d'un métabolite sur le calcul des flux. Mais il n'y a aucune corrélation évidente entre les deux coefficients. Par exemple, à 7 et 11 heures, biomasse et lysine exercent la même influence sur le %PPP, alors que la production de biomasse est très supérieure à celle de lysine. De même, à 29 heures, c'est le glutamate, qui n'utilise pas la voie des pentoses, qui exerce la plus forte influence par "effet de dilution" du %PPP. Le deuxième intérêt est donc de bien déterminer le rôle de chaque métabolite à chaque instant.

b. effet de l'erreur de mesure et détection d'erreur

Une application beaucoup plus intéressante consiste à essayer de localiser les causes d'un désaccord entre les résultats du calcul des flux et les données expérimentales. Ce désaccord peut se manifester au niveau de la comparaison entre q_s calculé et q_s expérimental, au niveau de la production de CO_2 , ou par des valeurs aberrantes des flux (par exemple, un flux négatif pour une réaction irréversible).

Nous avons modifié la cinétique de la lysine en déplaçant le point de $t = 25$ heures, de 2,5 g/l à 2,8 g/l (figure V.8). Dans ces conditions, le fichier de données pour l'évaluation des flux à 21 heures montre une augmentation de la vitesse spécifique de production de lysine (tableau V.6).

Tableau V.6 : Comparaison des vitesses spécifiques de production des métabolites à 21 heures, avant et après modification de la cinétique de production de lysine.

	<i>t = 21 heures</i>	<i>t = 21 heures modifié</i>
<i>Biomasse</i>	0,12 g/gMS.h ⁻¹	0,12 g/gMS. h ⁻¹
<i>Glutamate</i>	0,089 mmol/gMS.h-1	0,089
<i>Lysine</i>	0,34	0,52
<i>Alanine</i>	0,099	0,99
<i>Aspartate</i>	0,22	0,22
<i>Proline</i>	0,064	0,064
<i>Valine</i>	0,043	0,043

Tableau V.7 : fichier de l'analyse de sensibilité du qs et du %PPP par rapport à la vitesse spécifique de production de lysine (les flux sont donnés en mmol.gMS⁻¹.h⁻¹).

La ligne en gras représente la référence, c'est à dire la valeur observée expérimentalement. La ligne grisée indique la valeur de la production de lysine qui permet de se rapprocher de la valeur expérimentale du qs.

Exemple de calcul des coefficients de sensibilité (calcul de la pente en prenant les valeurs extrêmes) :

$$s_{qs/q_M} = \frac{0,29 - (-0,29)}{0,5 - (-0,5)} = 0,58 \quad \text{et} \quad s_{PPP/q_M} = \frac{0,04 - (-0,08)}{0,5 - (-0,5)} = 0,12$$

production de M (q _M)	Δq _M /q _M	Δq _s	qs tot	Δq _s /q _s	%PPP	Δhmp/hmp
0,26	-50%	-0,35	0,86	-0,29	59,6%	-0,08
0,29	-45%	-0,31	0,90	-0,26	60,4%	-0,07
0,31	-40%	-0,28	0,93	-0,23	61,0%	-0,06
0,34	-35%	-0,24	0,97	-0,20	61,6%	-0,05
0,37	-30%	-0,21	1,00	-0,17	62,2%	-0,04
0,39	-25%	-0,18	1,04	-0,14	62,7%	-0,03
0,42	-20%	-0,14	1,07	-0,12	63,2%	-0,02
0,45	-15%	-0,11	1,11	-0,09	63,6%	-0,02
0,47	-10%	-0,07	1,14	-0,06	64,0%	-0,01
0,50	-5%	-0,035	1,18	-0,03	64,4%	-0,01
0,52	0%	0,00	1,21	0,00	64,7%	0,00
0,55	5%	0,035	1,24	0,03	65,0%	0,01
0,57	10%	0,070	1,28	0,06	65,4%	0,01
0,60	15%	0,11	1,31	0,09	65,6%	0,01
0,63	20%	0,14	1,35	0,12	65,9%	0,02
0,66	25%	0,18	1,38	0,14	66,2%	0,02
0,68	30%	0,21	1,42	0,17	66,4%	0,03
0,71	35%	0,24	1,45	0,20	66,6%	0,03
0,73	40%	0,28	1,49	0,23	66,9%	0,03
0,76	45%	0,31	1,52	0,26	67,1%	0,04
0,79	50%	0,35	1,56	0,29	67,3%	0,04

L'évaluation des flux à l'aide de Métaflux conduit à la valeur calculée du q_s de $0,92 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans le cas initial et de $1,2 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans le cas modifié (la valeur expérimentale étant de $0,96 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Dans le cas modifié, on observe donc une différence de 25 % sur la valeur du q_s . L'analyse de sensibilité permet de rechercher une anomalie au niveau des données expérimentales (erreur grossière de mesure). Cette procédure effectuée à $t = 21$ heures avec les données modifiées conduit à classer les métabolites suivant leur influence décroissante sur le q_s : lysine, biomasse, aspartate. Les cinétiques de ces métabolites seront donc examinées dans l'ordre indiqué. De ces trois courbes, seule la lysine présente une allure atypique avec une valeur anormalement élevée à $t = 25$ heures. Il apparaît en effet peu probable qu'il y ait une consommation de la lysine après 25 heures, alors qu'il reste du glucose et que les cellules sont en phase de déclin. Il paraîtrait plus logique d'observer un plateau. Pour tester cette hypothèse, il est possible de lisser la courbe des concentrations de lysine, ou d'utiliser le fichier résultat de l'analyse de sensibilité en cherchant quelle(s) valeur(s) de la production de lysine permettent de se rapprocher du q_s calculé. Ces valeurs peuvent ensuite être reportées sur le graphe pour apprécier l'effet sur la cinétique de la lysine. Par cette dernière méthode, on constate que la valeur qui permet de retrouver le q_s calculé est proche de la valeur initiale de la concentration de lysine à $t = 21$ heures (tableau V.7).

La recherche d'une valeur probable de la concentration en lysine grâce au fichier résultat de l'analyse de sensibilité permet de mettre en évidence une dernière application. C'est une application de simulation pure qui consiste à chercher, par exemple, quelle production de lysine conduit à une valeur donnée du %PPP. On peut par exemple désirer savoir quelle est la production de lysine qui conduirait à un %PPP de 66%. Le tableau V.7 indique alors une valeur du q_M d'environ $0,64 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Conclusion - Perspectives :

L'analyse de sensibilité du q_s et du %PPP par rapport à une variation de la vitesse spécifique de production d'un métabolite permet de classer les métabolites par ordre d'influence, de suivre leur influence dans le temps, et d'aider à la recherche d'éventuelles erreurs ou encore d'exploiter la partie simulation du calcul des flux.

Nous avons limité l'analyse de sensibilité aux paramètres " q_s " et "%PPP", mais elle peut être facilement étendue aux autres paramètres (%PK, %PC, production de CO_2 , d'ATP...) ou à une (ou plusieurs) étape réactionnelle du réseau biochimique pour une analyse métabolique plus fine.

V.4. Comparaison Métaflux - Bionet

Cette étude a pour but de comparer les résultats obtenus avec chacune des deux méthodes et d'essayer d'expliquer les différences observées. Nous avons choisi Bionet comme élément de comparaison avec Métaflux pour plusieurs raisons :

- Bionet est un des premiers algorithmes de détermination de flux métaboliques qui a été mis au point, et qui fait maintenant figure de référence,
- Bionet est un logiciel fonctionnel, complet, mis à disposition par ses concepteurs et utilisable par tous,
- Bionet utilise le calcul matriciel, une approche différente de celle de Métaflux, ce qui apporte un intérêt supplémentaire à la comparaison.

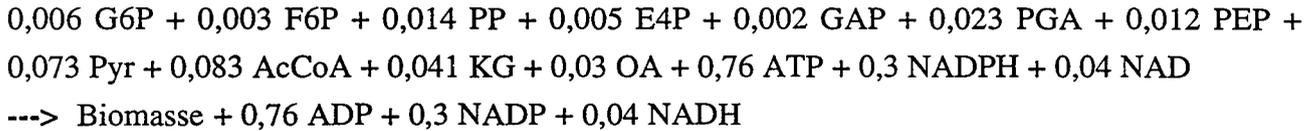
Pour une comparaison significative, il est impératif de travailler sur des réseaux biochimiques équivalents, et surtout à partir de fichiers de données identiques. Les différentes étapes de la comparaison seront donc

- l'harmonisation des réseaux biochimiques, en particulier au niveau de la synthèse de la biomasse,
- la définition des fichiers de données expérimentales,
- le calcul des flux et leur comparaison.

V.4.1 Les réseaux métaboliques

Bionet, initialement développé pour l'étude de la production de lysine, inclue également la synthèse d'acétate, de lactate, de glutamine mais ne prend pas en compte la leucine, l'aspartate et la proline. A l'inverse, Métaflux ne traite pas la synthèse des premiers, mais inclue les seconds. Les autres réactions du réseau biochimique sont tout à fait comparables, excepté au niveau de la synthèse de biomasse.

Le principe de base de la synthèse de biomasse, emprunté à Ingraham, est le même pour les deux algorithmes, mais la mise en œuvre est différente et requiert une harmonisation. Bionet utilise les données d'Ingraham pour *Escherichia coli* auxquelles ont été rajoutées d'autres précurseurs tels que le glutamate, la glutamine, l'alanine... Métaflux, en revanche, respecte strictement les précurseurs d'Ingraham, mais adaptés quantitativement aux Corynébactéries grâce aux données proposées par Péquignot puis Guyonvarch. Nous réaliserons la comparaison sur la base d'une biomasse de type "Corynébactéries" en mettant la même réaction de synthèse de biomasse dans Bionet et Métaflux. L'équation stœchiométrique de la synthèse de biomasse sur glucose sera donc la suivante :



(formule élémentaire de la biomasse : $\text{C}_1\text{H}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$, cendres 5% ; $\text{PM}=26 \text{ g.mol}^{-1}$)

Finalement, le réseau biochimique complet de Bionet regroupe 34 composés et 37 réactions, celui de Métaflux 38 composés et 41 réactions (en réalité, 52 réactions car la synthèse de biomasse est décomposée en 11 réactions du type "précurseur \rightarrow biomasse").

V.4.2. Les fichiers de données

Le fichier de données contenant les vitesses de production des métabolites est celui proposé en exemple dans Bionet et que nous reporterons dans Métaflux. Les métabolites pris en compte sont la biomasse, la lysine et le tréhalose.

Le fichier utilisé par Bionet contient autant de données que de métabolites présents dans le réseau biochimique (soit 34), même si la plupart sont nulles par hypothèse puisqu'il s'agit de la production des métabolites intracellulaires. En plus des métabolites principaux, certaines données supplémentaires sont nécessaires - ou complémentaires - au système de calcul de Bionet telles que les consommations d'ammoniac, d'oxygène, de glucose et la production de dioxyde de carbone. Ces données sont exprimées en $\text{mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, de même que les flux résultant du calcul.

En ce qui concerne Métaflux, seules les vitesses de production des métabolites carbonés extracellulaires ainsi que la concentration en biomasse sont nécessaires, soit 14 données dans le fichier expérimental. Les vitesses sont exprimées en $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et converties en $\text{mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le calcul des flux. En choisissant arbitrairement une concentration en biomasse égale à 1 g.l^{-1} , les flux exprimés en $\text{mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ou en $\text{mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sont équivalents, ce qui permet une comparaison immédiate. Les données sont présentés sur le tableau V.8.

Tableau V.8 : Fichier de données pour la comparaison de l'évaluation des flux par Bionet et Métaflux.

composé	Vitesse de production ($\text{mmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Biomass	19,1
CO ₂	75,1
Glc	-31,1
Lys	10,7
NH ₃	-35,3
O ₂	-64,6
Tre	0,98

Tableau V.9 : Résultats comparés des évaluations de flux métaboliques par Bionet et Métaflux.
 Les flux sont exprimés en mmol.l⁻¹.h⁻¹. La colonne (a) indique le numéro de la réaction biochimique du réseau Bionet, la colonne (b) celui du réseau Métaflux.

réaction biochimique		flux (mmol.l ⁻¹ .h ⁻¹)			
(a)	(b)	expérience	Bionet	Métaflux	
1)	Glc > G6P	[1]	31,1	31,5	33,6
2)	Glc > Tre	[2]	0,98	-0,6	0,98
3)	G6P > F6P	[5]		8,15	2,36
4)	F6P > 2 GAP	[14]		24,7	21
5)	GAP > PGA	[18]		57,3	51,1
6)	PGA > PEP	[18]		56,8	49,4
7)	PEP > Pyr	[19]		6,3	32,6
8)	Pyr > Lac	ni	0	-0,17	0
9)	PEP > OA	[20]		18,9	15,9
10)	Pyr > AcCoA	[26]		21,2	27,2
11)	AcCoA + OA > Isocit	[28]		19,8	21,2
12)	Isocit > KG	[29]		19,8	21,2
13)	KG > SuccCoA	[34]		16,2	18,2
14)	SuccCoA > Succ	[35]		2,73	7,5
15)	Succ > Mal	[36]		16,4	18,2
16)	Mal > OA	[37]		16,4	18,2
17)	AcCoA > Acétate	ni	0	-0,11	0
18)	KG > Glu _i	[32]	0	32,4	21,4
ni	Glu _i > Glu _e	[30]	0	nc	0
ni	Glu _i > Pro	[31]	0	nc	0
19)	Glu > Gln	ni	0	1,9	0
20)	Pyr > Ala	[22]	0	0,86	0
21)	Pyr > Val	[23]	0	0,48	0
ni	Pyr > Leu	[24]	0	nc	0
22)	G6P > Rib5P	[3]		22,9	29,8
23)	Ribu5P > Rib5P	[6]		7,6	9,7
24)	Ribu5P > Xyl5P	[7]		15,6	18,9
25)	Xyl5P + Rib5P > GAP + Sed7P	[9]		7,6	9,7
26)	GAP + Sed7P > F6P + E4P	[10]		8,1	9,7
27)	Xyl5P + E4P > F6P + GAP	[12]		8,2	9,2
28)	NADH > NAD	ni		56,1	nc
29)	FADH > FAD	ni		8,3	nc
30)	OA > Asp _i	[40]		14,7	10,7
ni	Asp _i > Asp _e	[38]	0	nc	0
31)	Asp _i > Lys _i	[39]		13,6	10,7
32)	Lys _i > Lys _e	[39]	10,7	12,2	10,7
33)	G6P > biomasse	*		19,1	nc
34)	ATP > ADP	[43]		252	69
---> CO2			75	nc	60
%PPP				48	57
%PK / %PC				67 / 33	67 / 33

* flux [4], [8], [11], [13], [15], [17], [21], [25], [27], [33] et [41]

ni : non inclus dans le réseau biochimique.

nc : non calculé.

V.4.3. Calcul des flux et comparaison des résultats

Les deux programmes sont mis en œuvre avec les données décrites ci-dessus. Les résultats du calcul des flux sont rassemblés dans le tableau V.9, et les flux sont reportés sur la figure V.9. Le nombre le plus à gauche, entouré en trait gras, représente la valeur expérimentale lorsqu'elle existe. Le nombre du milieu (ou celui de gauche s'il n'y a pas de valeur expérimentale) provient de l'évaluation Bionet, celui de droite de l'évaluation Métaflux.

Deux aspects sont à envisager pour la comparaison : un aspect général et un aspect détaillé. Du point de vue général les ordres de grandeurs des résultats sont tout à fait comparables. En particulier :
- la vitesse de consommation du glucose montre une variation d'à peine 5% entre la valeur expérimentale, Bionet et Métaflux,
- la répartition "2/3 ; 1/3" du flux carboné au nœud PEP entre la PK et la PC est une constante pour les deux méthodes.

Une première différence apparaît pour le pourcentage de voie des pentoses. Même si les chiffres avancés sont assez proches, on notera que la valeur proposée par Métaflux est supérieure à celle de Bionet. Ceci peut provenir du fait que Métaflux surévalue les besoins en NADPH puisque les échanges de métabolites intermédiaires ou de cofacteurs entre les différentes voies de biosynthèse ne sont pas autorisés (principe des cartes individuelles indépendantes).

Toujours d'un point de vue général, on observe que Bionet ne respecte pas les données expérimentales alors que Métaflux conserve strictement ces valeurs (excepté pour la consommation du glucose, voir ci-après). Par exemple, on trouve une consommation d'acétate, de lactate et même de tréhalose et une production de valine, d'alanine et de glutamine (réactions 2, 8, 17, 19, 20 et 21 du tableau V.9, colonne "(a)"). Ceci est directement lié au mode de calcul des flux. Le système matriciel de Bionet est ici surdéterminé c'est à dire qu'il présente trop de réactions pour le nombre de flux à évaluer. La résolution passe alors par une pseudo-inverse qui constitue une solution approchée minimisant les erreurs commises et dont la conséquence est le non respect des valeurs expérimentales. Les valeurs proposées restent cependant dans la limite des erreurs de dosages et ne portent donc pas à conséquence pour l'interprétation des valeurs des autres flux carbonés. Ceci n'est pas observé avec Métaflux dont la procédure de calcul respecte strictement les valeurs expérimentales des vitesses de production des métabolites utilisés comme entrées du système.

L'étude plus fine des évaluations de flux montrent quelques différences importantes entre Bionet et Métaflux qu'il convient d'expliquer (pour la numérotation de flux, se reporter au tableau V.9, colonne "(a)").

Le flux (1) (Glc ---> G6P) est plus élevé dans Métaflux que dans Bionet et par rapport à la valeur expérimentale (33,7 contre 31,5 et 31,1 respectivement). Ceci s'explique par le fait que Métaflux calcule ce résultat à partir des données expérimentales. Dans Bionet, ce chiffre entre dans la

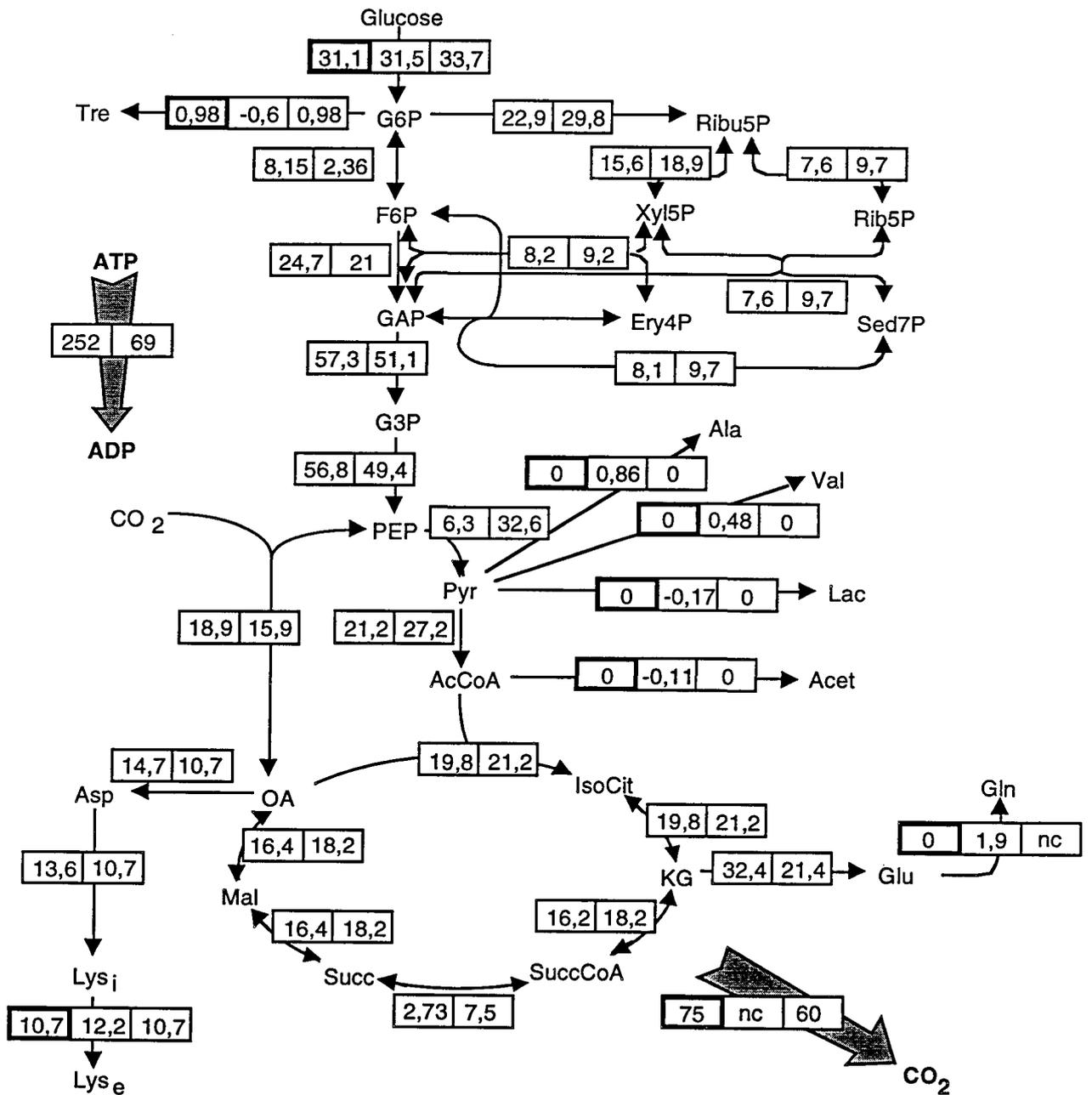


Figure V.9: Comparaison Bionet - Métaflux : carte des flux pour la synthèse de lysine chez *Corynebacterium glutamicum*. Les flux pour la synthèse de biomasse ne sont pas représentés. Les flux sont indiqués en mmol.l⁻¹.h⁻¹.

expérience	Bionet	Métaflux
------------	--------	----------

procédure de calcul et de réconciliation des données, ce qui conduit à une valeur plus proche de celle observée expérimentalement. Mais comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, la valeur de 33,7 donnée par Métaflux reste tout à fait acceptable.

Le flux (7) (PEP ---> Pyr) est très inférieur dans Bionet. Ce flux représente strictement la part de Pyruvate Kinase. Pour comparer à Métaflux, il faut rajouter tout ou partie du flux PEP ---> Pyr occasionné par le système de transport du glucose (système PTS, flux (1)). On retrouve ainsi des valeurs comparables. On notera que l'entrée du glucose est exclusivement réalisée par le PTS dans Bionet, alors qu'un transport par perméases est possible dans Métaflux. Ceci explique que le flux total PEP ---> Pyr puisse être inférieur à celui de l'entrée du glucose dans Métaflux, alors que c'est impossible dans Bionet.

Les réactions (28) et (29) ne sont pas explicitées dans Métaflux, de même que la réaction global de synthèse de biomasse (33), alors qu'elles le sont dans Bionet. Inversement, une réaction de production globale de CO₂ n'existe pas dans Bionet alors qu'elle est présente dans Métaflux.

Le flux (34), qui représente la dissipation de l'ATP suite au principe d'état pseudo-stationnaire, montre quant à lui un désaccord très net entre les deux méthodes. Bionet dissipe 3 à 4 fois plus d'ATP que Métaflux. La cause exacte de ce phénomène n'a pas été élucidée, mais on peut invoquer l'approche de minimisation énergétique de Métaflux qui conduit peut être à limiter la dissipation de l'ATP.

Enfin, la production de CO₂ évaluée par Métaflux est inférieure à la valeur expérimentale, mais reste dans l'ordre de grandeur, ce qui montre une fois encore la cohérence du calcul des flux par notre méthode.

Conclusion

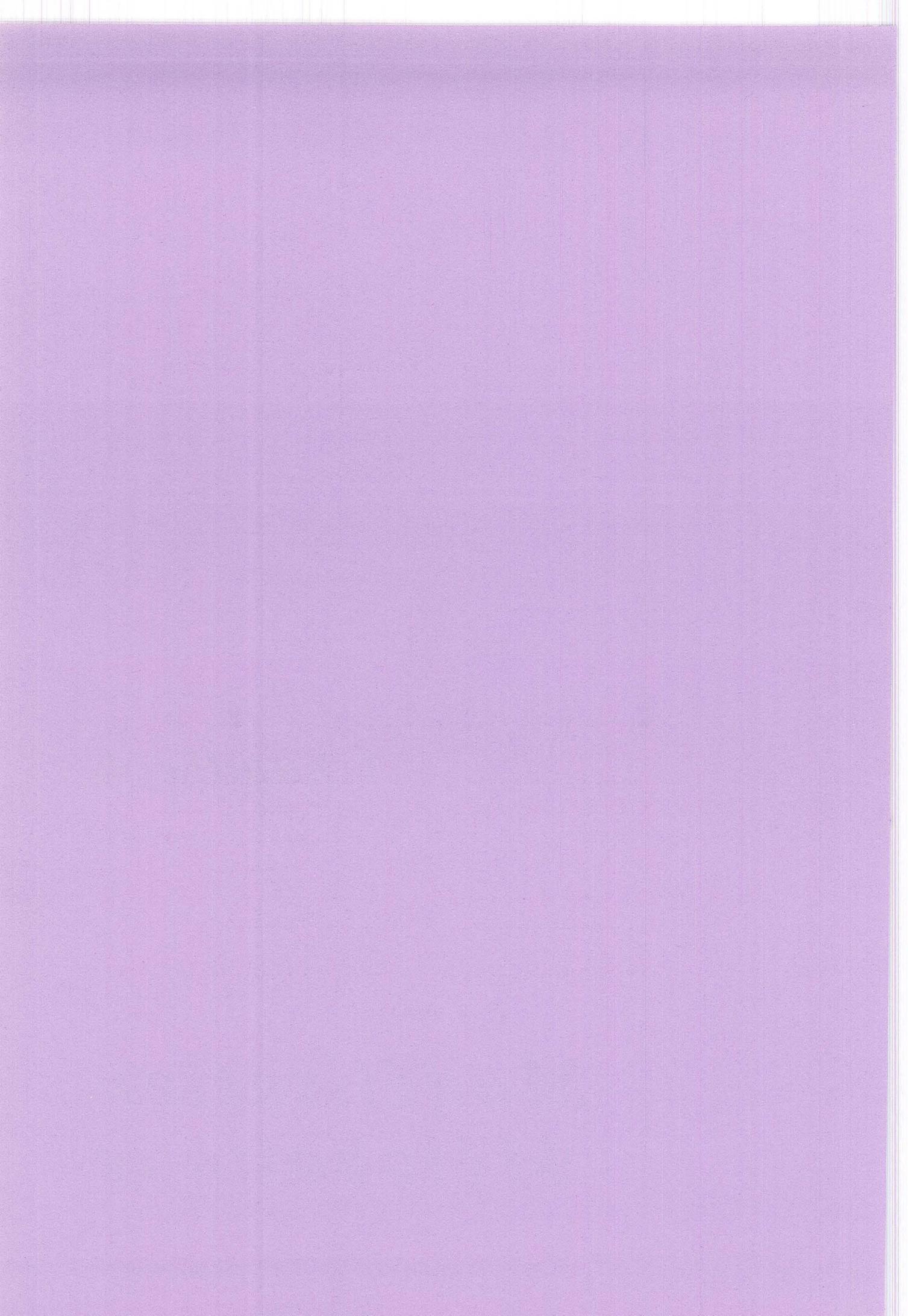
Malgré des algorithmes différents, Bionet et Métaflux conduisent à des résultats proches pour les deux exemples présentés. Si une seule des deux méthodes devait être retenue, le choix devrait donc s'effectuer en fonctions d'autres critères que celui de l'évaluation des flux, tels que l'approche prédictive ou de réconciliation de données, la compréhension et la maîtrise de la méthode par l'utilisateur, la facilité de construction ou de modification d'un réseau biochimique, les capacités de simulation... Nous avons rassemblé dans le tableau V.10 un certain nombre d'éléments caractéristiques qui reflètent les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes.

Tableau V.10 : Comparaison des caractéristiques générales de Bionet et Métaflux.

	<i>Bionet</i>	<i>Métaflux</i>
<u>Algorithme de calcul :</u>		
- méthode	Bilans matière + Etat pseudo stationnaire	Bilans matière + Etat pseudo stationnaire + réactions de régénération
- résolution	Matricielle, à partir de toutes les données disponibles. Réconciliation de données.	Non matricielle, à partir de certains métabolites extracellulaires. Prédiction de données.
- élément de base	la réaction biochimique	la voie individuelle
<u>Compréhension de la méthode de calcul :</u>		
	Complexe Environnement mathématique qui prime sur l'aspect physiologique.	Aisée Mathématique simple. Contexte physiologique dominant.
<u>Utilisation du logiciel</u>		
	Simple et convivial. Nécessite de connaître la méthode. Un unique fichier de données, contenant toutes les vitesses expérimentales.	Très simple et convivial. Un unique fichier de données, contenant certaines vitesses expérimentales de production.
<u>Modification du réseau biochimique :</u>		
- ajout	Simple (a priori). Risque de redondances, de singularités, ou	- simple, par ajout d'une carte individuelle.
- suppression	d'indéterminations qui peuvent être complexes à résoudre.	- simple, par déletion d'une carte individuelle.
- modification		- impossible, sauf en modifiant toutes les cartes individuelles.

Chapitre 6

*Modélisation
Métabolique*



SOMMAIRE du CHAPITRE VI

VI.1. Evaluation des flux métaboliques en croissance.....	169
VI.1.1. Culture discontinue de référence.....	170
VI.1.2. Cultures discontinues à pression osmotique élevée.....	173
VI.1.2.1. Culture discontinue à 1,5 Osm.....	173
VI.1.2.2. Cultures discontinues à pressions osmotiques supérieures à 2 Osm.....	176
VI.1.3. Discussion : effet de l'osmolarité sur le calcul des flux.....	178
VI.1.3.1. Effet sur le calcul des paramètres cinétiques.....	178
VI.1.3.2. Prédiction de la vitesse de production de CO ₂	178
VI.1.3.3. Effet sur la distribution du flux carboné.....	179
VI.2. Analyse métabolique en procédé de production de glutamate...181	
ABSTRACT.....	181
INTRODUCTION.....	181
MATERIALS AND METHODS.....	182
RESULTS AND DISCUSSION.....	184
Fed-batch fermentation.....	184
Specific rates of cell growth and metabolism.....	184
The individual metabolic map for glutamate production.....	185
The individual metabolic map for biomass production.....	186
The flux distributions during the fermentation.....	186
Time variations of intracellular fluxes.....	188
CONCLUSION.....	189
REFERENCES.....	190
VI.3. Résumé - Discussion.....	191

Modélisation métabolique :

application de Métaflux aux cultures de *Corynebacterium glutamicum*.

Dans les chapitres précédents, nous avons présenté les cultures cinétiques et une méthode de modélisation des flux carbonés. Dans cette partie, nous allons appliquer cette méthode à l'analyse métabolique de *Corynebacterium glutamicum* pour les différentes cultures que nous avons mises en œuvre. Les objectifs sont multiples : tester notre méthode, identifier les informations que l'on peut en tirer, déterminer les points sensibles, rechercher des particularités métaboliques dans le réseau étudié comme par exemple une étape limitante.

Nous aborderons successivement les points suivants :

- évaluation des flux métaboliques lors de la croissance de la bactérie en culture discontinue,
- évaluation de flux métaboliques lors de la production de glutamate en culture semi-continue. Cette partie sera présentée sous la forme d'une publication,
- une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus.

VI.1. Evaluation des flux métaboliques en croissance

La méthodologie Métaflux sera employée pour déterminer les flux métaboliques lors de la croissance de *Corynebacterium glutamicum*. Comme nous l'avons vu précédemment, aucun métabolite n'est excrété, la biomasse et le CO₂ étant les seuls composés produits. Pour appliquer Métaflux, nous avons recours à un artifice consistant à définir une pseudo-excrétion des métabolites accumulés intracellulairement en réponse à l'augmentation de l'osmolarité du milieu. La méthode des pseudo-excrétions, définie en détail dans le chapitre Matériel et Méthodes, consiste à soustraire du niveau intracellulaire d'un métabolite (à osmolarité élevée) une quantité de référence, définie par le niveau intracellulaire de ce métabolite à pression osmotique normale. Cette différence est convertie en grandeur extracellulaire, et appelée pseudo-excrétion. Il est ensuite possible d'en étudier la cinétique comme pour un métabolite réellement excrété. Nous présenterons tout d'abord l'évaluation des flux et

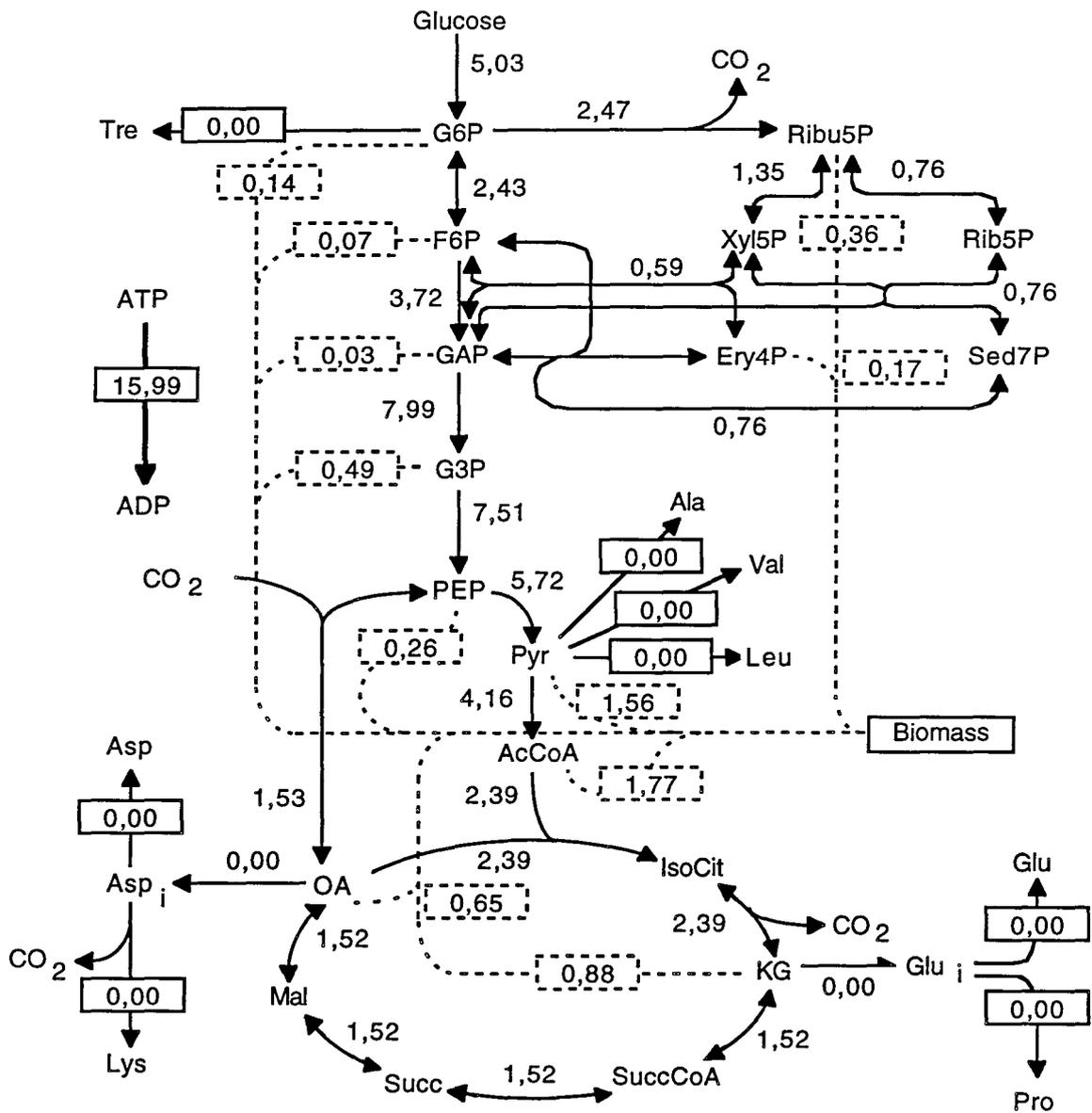


Figure VI.1 : Distribution du flux carboné pour la culture à 0,45 Osm en phase de croissance rapide (t=6h). ($\mu=0,45 \text{ h}^{-1}$; $q_s \text{ expérimental} = 5,5 \text{ mmol/gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

les paramètres de répartition du flux carboné lors de la culture discontinue à pression osmotique normale, puis nous appliquerons Métaflux aux cultures d'osmolarité élevée.

VI.1.1. Culture discontinue de référence

Il s'agit de la culture à pression osmotique normale (0,45 Osm) présentée au chapitre III. Cette expérience permet de définir les niveaux intracellulaires de référence des métabolites. Cette référence est fixée à $450 \pm 50 \mu\text{mol/gMS}$ pour le glutamate et à $50 \pm 20 \mu\text{mol/gMS}$ pour la proline. En ce qui concerne le trehalose, son niveau de référence varie de 100 à 200 $\mu\text{mol/gMS}$. Cette variation étant la même pour quasiment toutes les cultures (même à osmolarité élevée), la pseudo-excrétion du tréhalose sera considérée nulle (sauf exception explicitement mentionnée).

L'estimation des flux métaboliques sous forme de cinétiques utilise l'ensemble des données expérimentales, lissées, puis converties en vitesses de production. En l'occurrence, ces données se résument à la biomasse. Il n'y a donc aucune évolution des paramètres de répartition du flux au cours du temps : 38 % de voie des pentoses (méthode de calcul "C", c'est à dire correspondant au %PPP du projet de publication présenté au chapitre V) et 78 % de glycolyse au nœud PEP. Rappelons que la méthode de synthèse de la biomasse retenue pour ces calculs est celle utilisant les données de Guyonvarch pour *Corynebacterium glutamicum*.

Un exemple de carte de flux est présenté sur la figure VI.1. Il représente la distribution du flux carboné dans le réseau biochimique au milieu de la phase de croissance rapide ($t=6$ h). La vitesse spécifique de croissance est évaluée à $0,45 \text{ h}^{-1}$ et la consommation du glucose à $5,5 \text{ mmol/gMS.h}^{-1}$.

La figure VI.2 représente l'évolution des flux carboné aux nœuds G6P et PEP, apportant une vision dynamique des flux. Une donnée importante peut ressortir de ces courbes. Il s'agit du flux maximum que doit supporter l'enzyme responsable de l'étape considérée et qui peut être comparé à des données expérimentales si elles sont disponibles. Dans le cas de l'hexokinase (G6P \rightarrow F6P) et de la G6P deshydrogénase (G6P \rightarrow 6PG), le flux maximum relevé est de $4 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La synthèse de pyruvate, quant à elle, montre un flux de plus de $8 \text{ mmol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$. On pourra remarquer que ce dernier flux est quasiment identique au flux d'entrée du glucose dans la cellule (c'est à dire la synthèse du G6P). Ceci laisse supposer que si le glucose utilise majoritairement le PTS pour entrer dans la cellule, c'est également le PTS qui fournit la grande majorité du Pyruvate et donc que l'activité Pyruvate Kinase est très restreinte pendant la croissance.

La figure VI.2 reproduit également la vitesse de dissipation de l'ATP intracellulaire nécessaire pour respecter l'hypothèse d'état pseudo-stationnaire. On constate que la courbe suit parfaitement l'évolution de la vitesse spécifique de croissance, ce qui semble normal puisque la production d'ATP est liée au métabolisme, en l'occurrence à la synthèse de biomasse. On observe

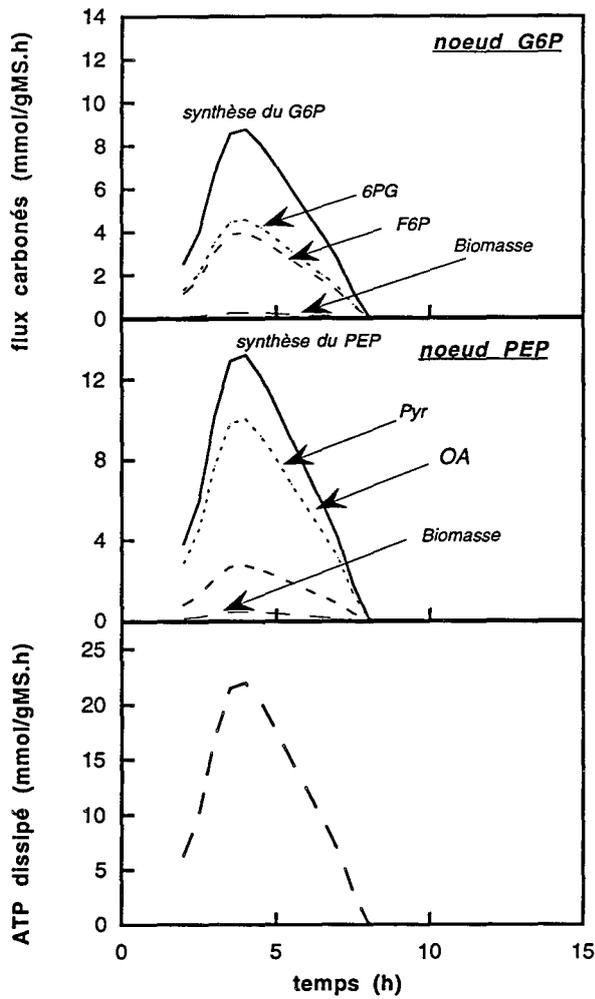


Figure VI.2 : Cinétiques de flux aux nœuds G6P et PEP et dissipation d'ATP pour la culture à pression osmotique normale.

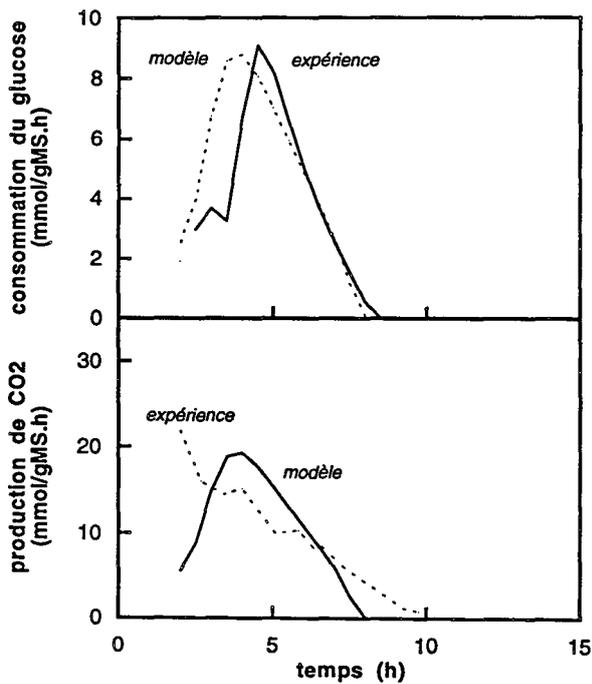


Figure VI.3 : Comparaison des vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production de CO₂ entre expérience et modèle à 0,45 Osm.

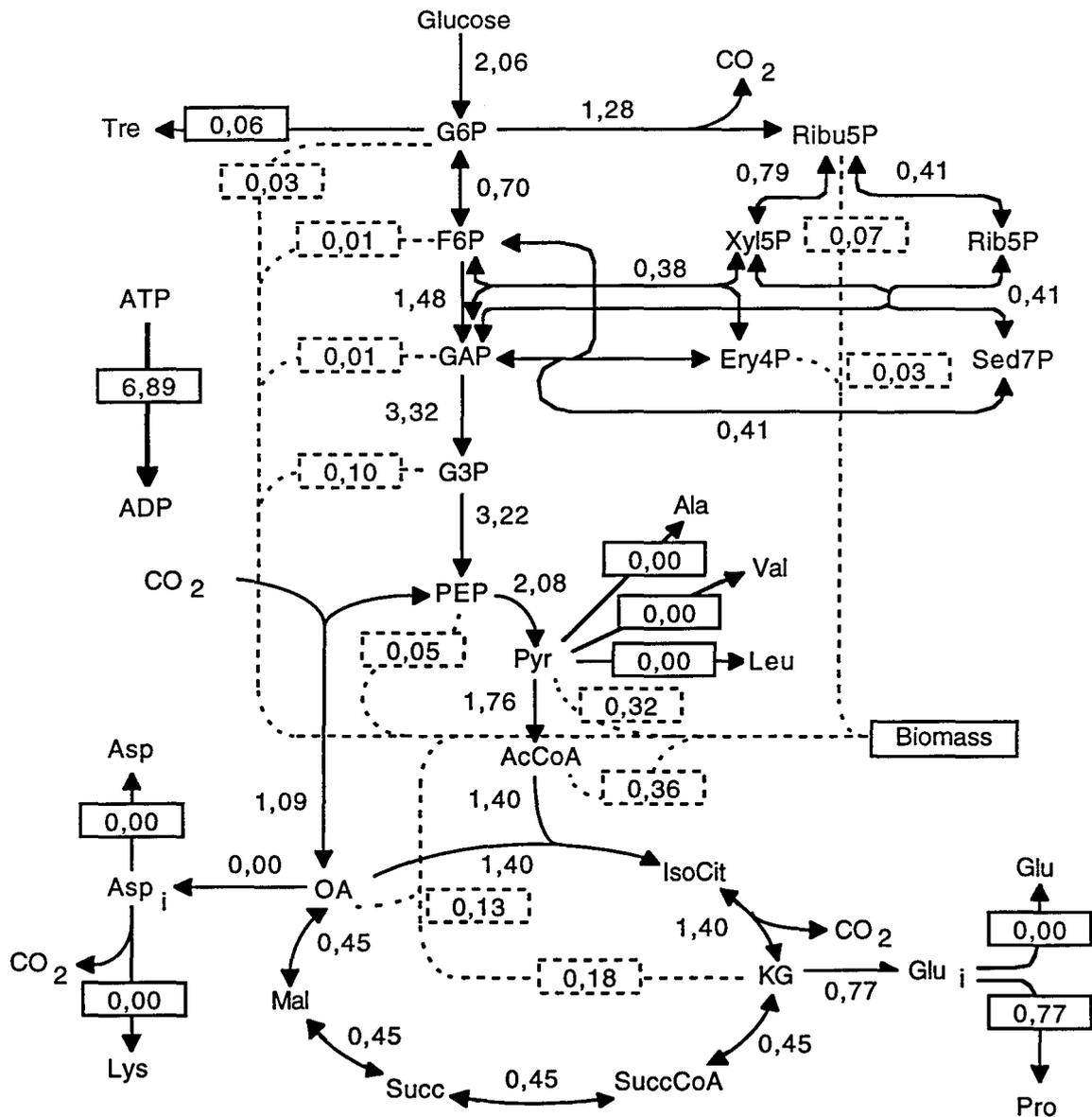


Figure VI.4 : Distribution du flux carboné pour la culture à 1,5 Osm juste après le choc osmotique (t=2,6h). ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$)

Tous les flux sont donnés en mmol.gMS⁻¹.h⁻¹

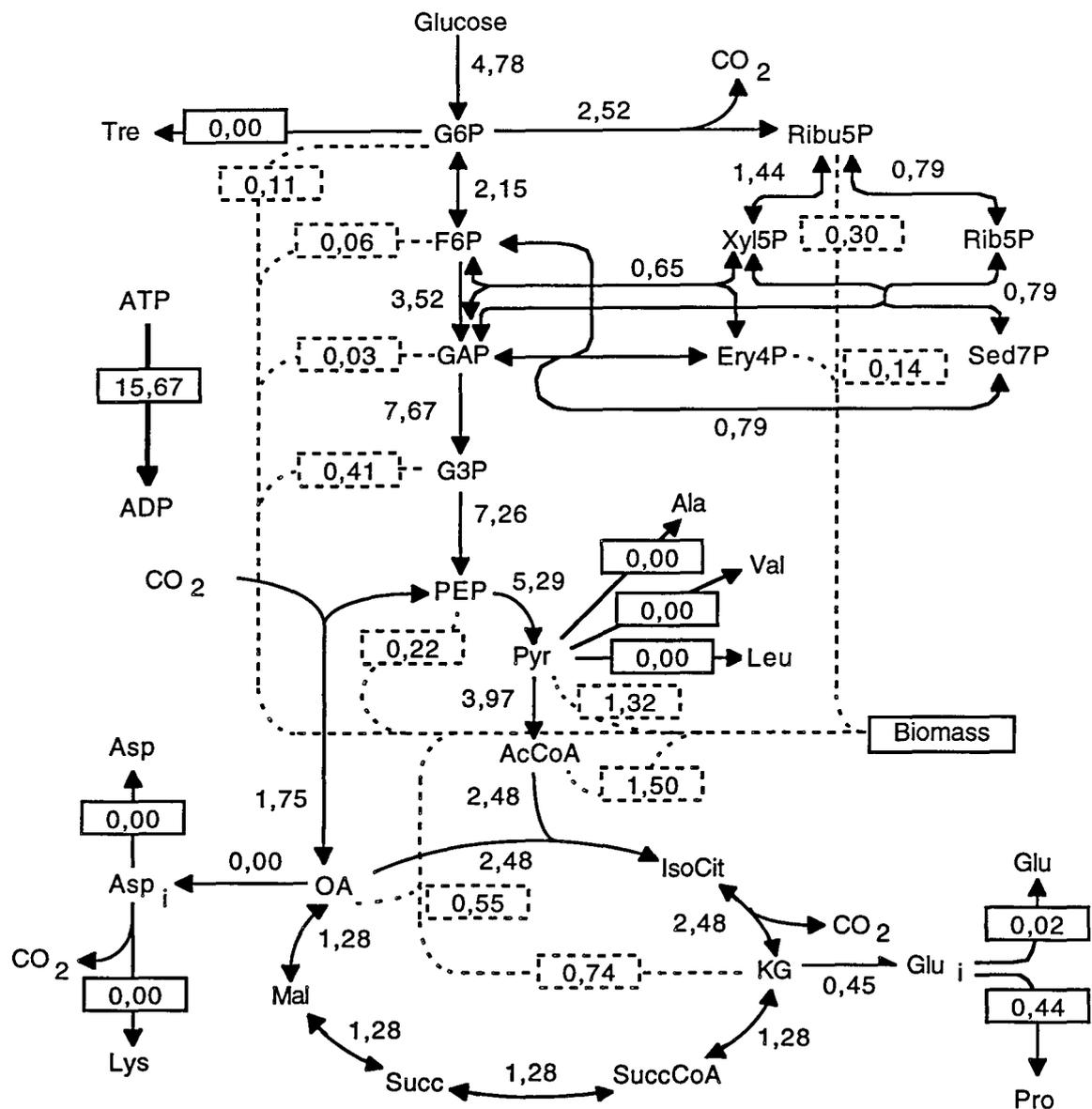


Figure VI.5 : Distribution du flux carboné pour la culture à 1,5 Osm en phase de croissance ($t=6,5h$). ($\mu=0,35 h^{-1}$; q_s expérimental = $2,5 \text{ mmol/gMS}^{-1}.h^{-1}$)

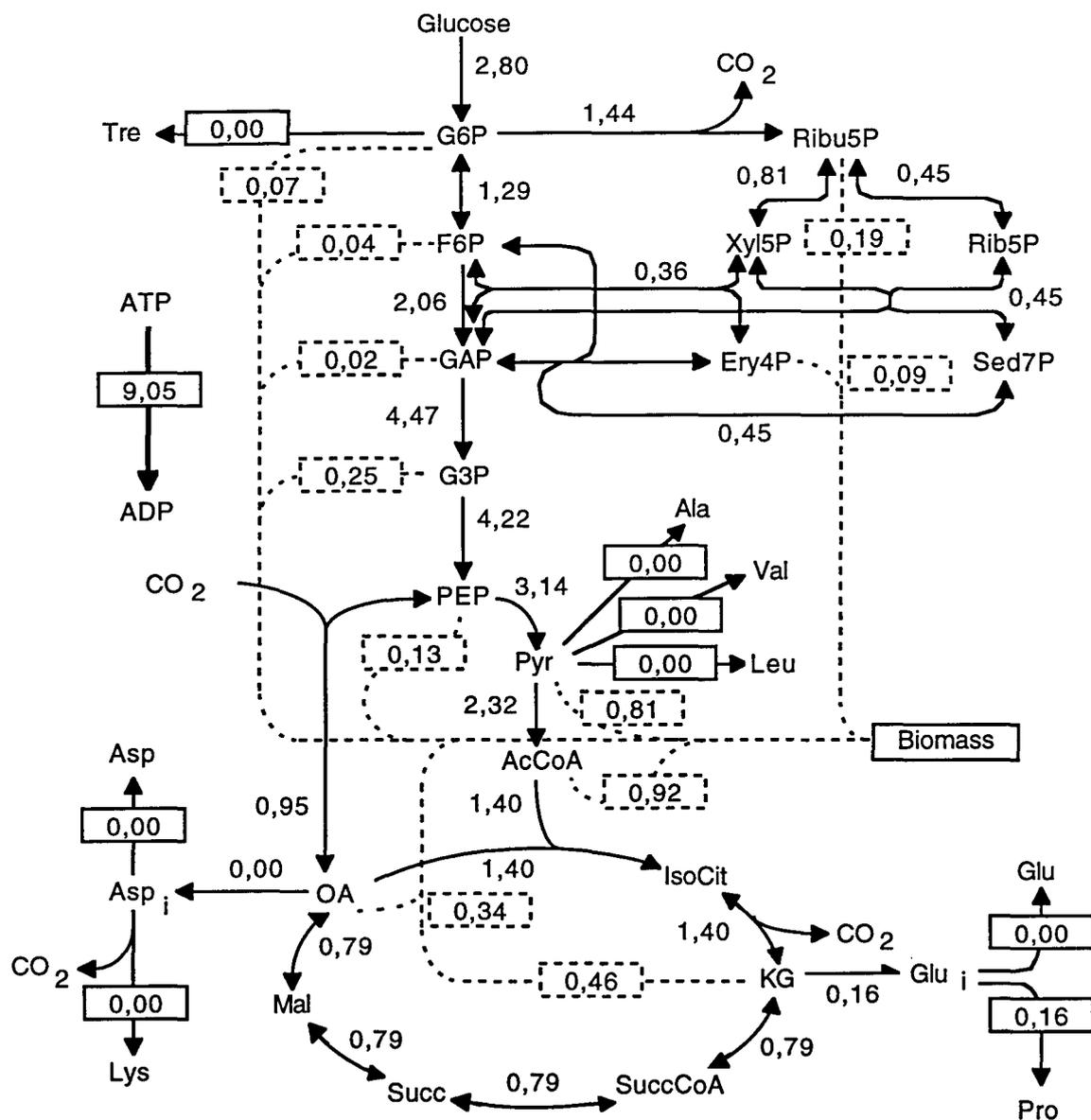


Figure VI.6 : Distribution du flux carboné pour la culture à 1,5 Osm en fin de phase de croissance (t=8,9h). ($\mu=0,23 \text{ h}^{-1}$; $q_s \text{ expérimental} = 3,5 \text{ mmol/gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

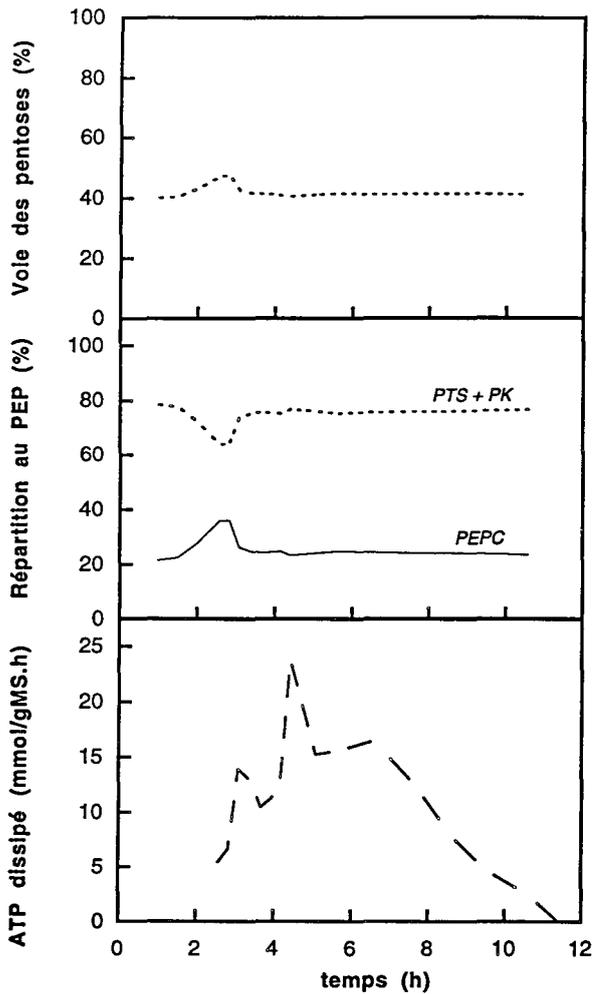


Figure VI.7 : Evolution des paramètres de répartition des flux à 1,5 Osm.

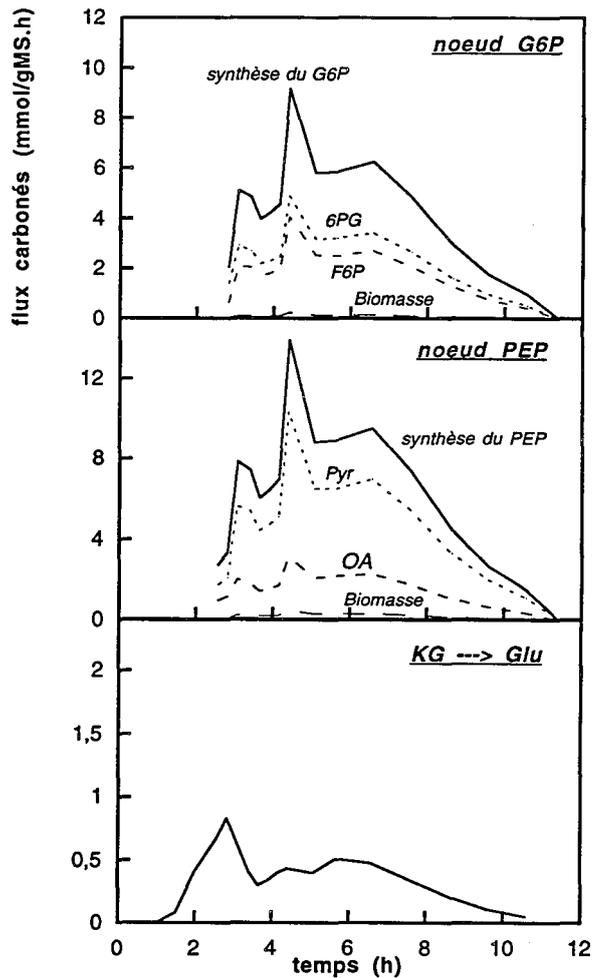


Figure VI.8 : Cinétiques des flux à 1,5 Osm.

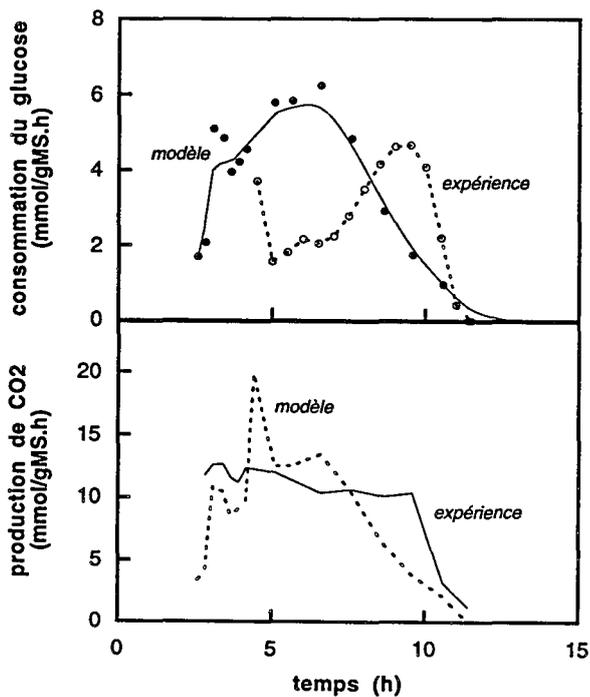


Figure VI.9 : Comparaison expérience-modèle des vitesses de consommation du glucose et de production de CO₂ à 1,5 Osm.

surtout que la quantité d'ATP est relativement élevée laissant supposer que l'ATP n'est pas limitant en croissance.

Les estimations de la vitesse spécifique de consommation de glucose et de production de CO₂ sont comparées aux données expérimentales sur la figure VI.3. On observe une bonne corrélation pour le glucose, de même que pour le CO₂ sauf en phase de latence. Or, cette phase répercute les erreurs de dosage dues à la faible production de CO₂ et de biomasse, ce qui peut provoquer cet écart entre simulations et expérience.

VI.1.2. Cultures discontinues à pression osmotique élevée

VI.1.2.1. Culture discontinue à 1,5 Osm

Les données nécessaires au calcul de flux sont la production de biomasse et les pseudo productions de métabolites : glutamate et proline, le tréhalose n'est pas considéré puisque sa pseudo excrétion est nulle (se reporter au chapitre III). Trois exemples de carte de flux en début, milieu et fin de phase de croissance ($t=2,6$ h, $t=6,5$ h et $t=8,9$ h) sont présentées sur les figures VI.4, VI.5 et VI.6. Elles sont caractérisées par une faible croissance et une "forte" production de proline (figure VI.4, $\mu=0,1$ h⁻¹ et $q_{\text{pro}}=0,77$ mmol/gMS.h⁻¹), une croissance forte et une synthèse de proline intermédiaire (figure VI.5, $\mu=0,35$ h⁻¹ et $q_{\text{pro}}=0,44$ mmol/gMS.h⁻¹), et enfin une croissance plus faible et une faible synthèse de proline (figure VI.6, $\mu=0,23$ h⁻¹ et $q_{\text{pro}}=0,16$ mmol/gMS.h⁻¹). En relation avec ces phase de croissance, on observe une augmentation puis une diminution de la consommation du glucose (de 2,06 à 4,78 puis 2,8 mmol/gMS.h⁻¹).

La vitesse de consommation du glucose étant un résultat de la procédure Métaflux, les données exposées ci-dessus permettent de recalculer le rendement instantané de croissance ($Y_{X/S}$). On obtient respectivement 0,27, 0,41 et 0,46 g/g, valeurs qui sont tout à fait en accord avec celles calculées à partir des données expérimentales (voir figure III.8).

remarque : recalculer $Y_{\text{pro}/X}$ ne présente aucun intérêt puisqu'il s'agit des données expérimentales.

La figure VI.7 présente l'évolution des paramètres du réseau métabolique en fonction du temps. L'influence de la biomasse y apparaît clairement puisque ce sont globalement les paramètres individuels de la biomasse qui sont obtenus : 40 % de voie des pentoses, 78 % de PK et 22 % de PEP. Cependant, on observe une perturbation à environ 2,5 heures de culture. Les études de sensibilité présentées ci-dessous montrent qu'il s'agit de l'intervention de la proline. Elle provoque une hausse du %PPP à 45 %, une forte hausse du %PC à presque 40 % et une chute du %PK à presque 60 %. L'influence de la proline ne s'observe qu'au début de la culture alors que la biomasse n'est pas encore prépondérante. Par la suite, la production de biomasse devient majoritaire et couvre largement les faibles productions de proline et de glutamate. Ainsi, aucune perturbation particulière

n'est visible vers 6-7 heures de culture bien qu'il s'agisse des moments de pseudo-production maximale de glutamate et de proline.

L'influence relative de chaque métabolite sur les paramètres du réseau et donc sur les flux eux-mêmes, peut être visualisée grâce à une étude de sensibilité des paramètres par rapport à la vitesse de production de chaque métabolite. Cette procédure a été décrite au chapitre V. Les coefficients s_{qs} et s_{PPP} ont été calculés pour la culture à 1,7 Osm à $t=2,6$ h, $t=6,5$ h et $t=8,9$ heures (tableau VI.1).

Tableau VI.1 : calcul des coefficients de sensibilité de la vitesse de consommation du glucose et de la participation de voie des pentoses par rapport à la synthèse des métabolites pour les 3 échantillons de la culture à 1,5 Osm.

	s_{qs}			s_{PPP}		
	2,6 h	6,5 h	8,9 h	2,6 h	6,5 h	8,9 h
<i>Biomasse</i>	0,5	0,9	0,94	0,07	0,05	0,04
<i>Proline</i>	0,1	0,08	0,04	0,34	0,04	0,02
<i>Tréhalose</i>	0,04	-	-	0,03	-	-
<i>Glutamate</i>	0	0	-	0	0	-

Les résultats indiquent que la biomasse est le métabolite majoritaire, puisqu'elle possède le coefficient de sensibilité à la vitesse spécifique de consommation du glucose (s_{qs}) le plus élevé (0,5 ; 0,9 et 0,94 à 2,6 h ; 6,5 et 8,9 h respectivement). La proline est minoritaire à 2,6 h ($s_{qs} = 0,1$) et quasi absente à 6,5 et 8,9 h ($s_{qs}=0,08$ et 0,04). L'interprétation du coefficient de sensibilité de la participation de la voie des pentoses (s_{PPP}) est plus délicate car il faut considérer s_{qs} et s_{PPP} en même temps. Ainsi, la biomasse étant majoritaire, c'est elle qui impose la valeur du %PPP, et une variation de la production de biomasse n'aura pas d'effet (cas de 8,9 h). En revanche, lorsque la proline est assez importante en tant que matière comme à 2,6 h (s_{qs} significatif), alors elle influence la valeur du %PPP et le s_{PPP} rend compte de cette influence. Ainsi, la proline est suffisamment importante à $t=2,6$ h pour imposer sa marque sur le %PPP, ce qui explique la perturbation observée sur la figure VI.7.

Quant à la vitesse de dissipation de l'ATP, elle témoigne à nouveau d'une forte quantité produite. Elle reste parfaitement corrélée à la biomasse. Il en est de même pour les cinétiques des flux nets aux noeuds du réseau (figure VI.8), et sur lesquelles on notera en particulier le flux α -KG \rightarrow glu qui reflète la somme des pseudo-productions de glutamate et de proline, ce qui explique le pic vers 2,5 heures.

La comparaison des vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production de CO_2 expérimentale et calculée donne des résultats tout à fait satisfaisants puisque les deux courbes

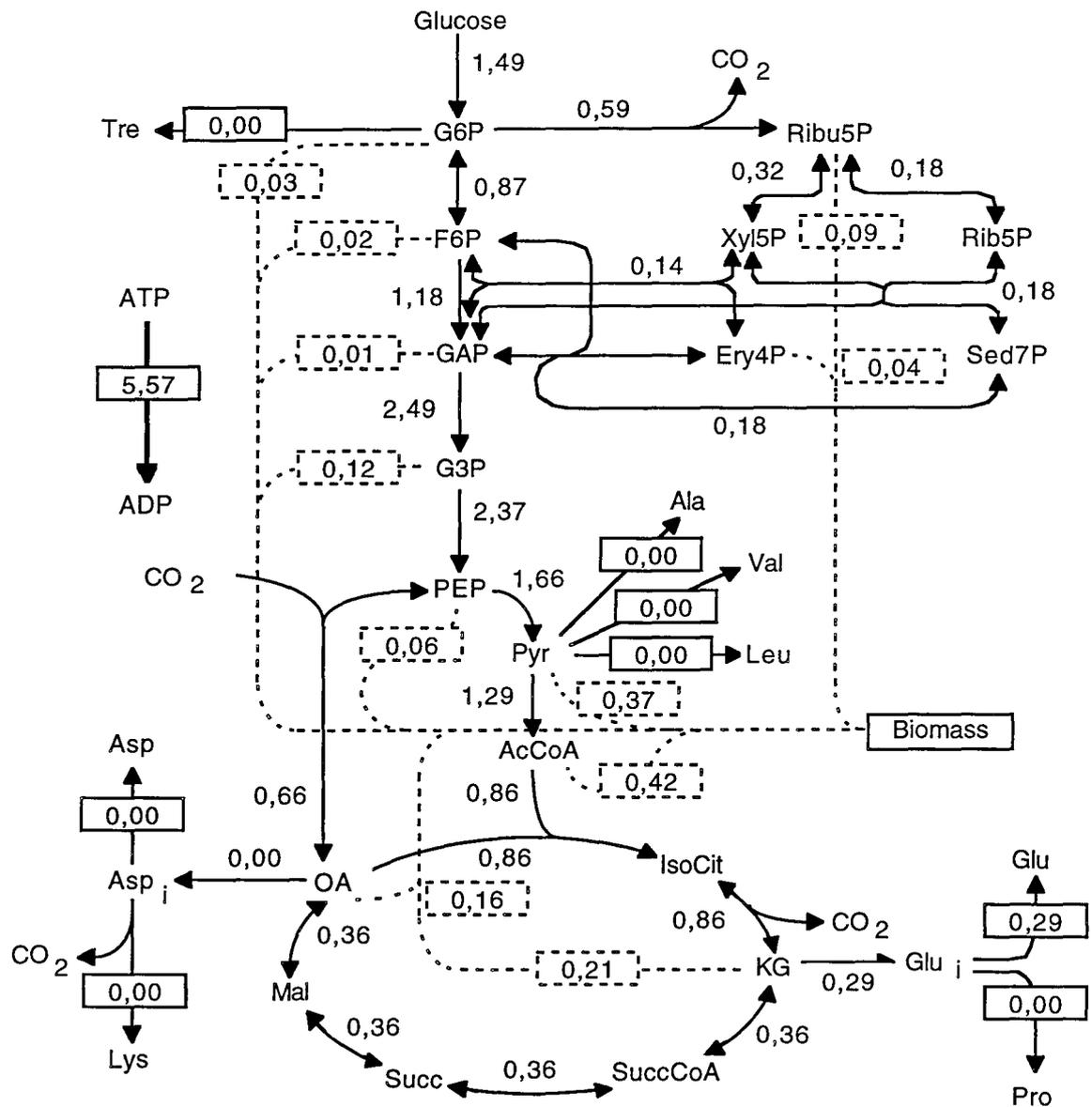


Figure VI.10 : Distribution du flux carboné pour la culture à 3,0 Osm immédiatement après le choc osmotique (croissance et synthèse de glutamate, t=3h) ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$; $q_s \text{ expérimental} = 2 \text{ mmol/gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

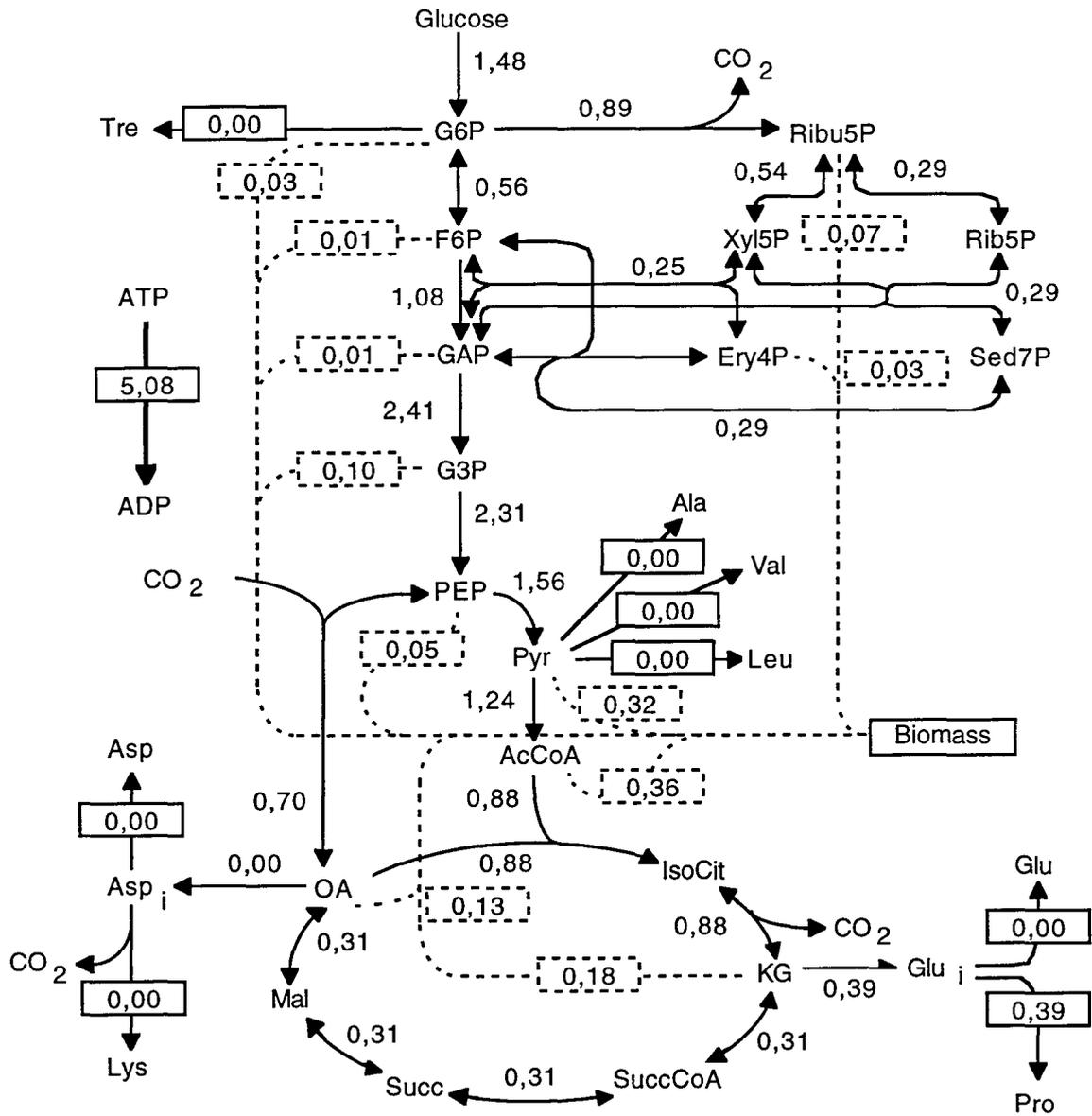


Figure VI.11 : Distribution du flux carboné pour la culture à 3,0 Osm en croissance et synthèse de proline (t=8h) ($\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$; $q_s \text{ expérimental} = 1 \text{ mmol/gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

sont très proches pour chacun des deux composés (figure VI.9). Les résultats sont un peu moins bons pour le CO₂ que pour le glucose, surtout en phase de latence. L'évolution de la production de CO₂ calculée montre de fortes irrégularités. Ceci s'explique par le fait que le calcul des flux s'effectue à partir des vitesses de production des différents métabolites, ce qui répercute et amplifie les irrégularités. En l'occurrence, il est très probable que ce soient les irrégularités des pseudo-excrétions qui se reportent sur le calcul de la vitesse de production de CO₂.

Les différences majeures avec les flux évalués à 0,45 Osm sont dues à la synthèse de proline et de glutamate qui engendrent une réorganisation de la répartition du flux dans le réseau biochimique, avec une augmentation de la voie des pentoses et un nivellement de la répartition au nœud PEP. Mais cette réorganisation n'est que temporaire, le temps que la biomasse devienne le métabolite majoritaire.

VI.1.2.2. Cultures discontinues à pressions osmotiques supérieures à 2 Osm

Les expériences réalisées à 2,2, 2,7 et 3,0 Osm présentent des allures de cinétique très voisines. Seules les valeurs absolues des vitesses de production ou de pseudo-production des différents métabolites varient, mais en gardant des "rapports de force" comparables. Nous ne présenterons donc en détails que la culture à 3,0 Osm, dont les pseudo-productions sont les plus élevées et dont les effets sur le calcul des flux sont les plus visibles.

Trois cartes sont à nouveau présentées. Il s'agit cette fois d'une phase de croissance avec production de glutamate (figure VI.10, t=3 h, $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ et $q_{\text{glu}}=0,29 \text{ mmol/gMS.h}^{-1}$), d'une phase de croissance avec production de proline (figure VI.11, t=8 h, $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ et $q_{\text{glu}}=0,29 \text{ mmol/gMS.h}^{-1}$), et d'une phase de croissance faible sans autre production (figure VI.12, t=16 h, $\mu=0,03 \text{ h}^{-1}$). Rappelons qu'à 3,0 Osm, la vitesse spécifique maximale de croissance est de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

Les vitesses de consommation du glucose sont ainsi calculées à 1,5, 1,5 et 0,48 mmol/g.h⁻¹, conduisant à des valeurs du rendement instantané de croissance de 0,37, 0,37 et 0,35 g/g. Ces valeurs sont en parfait accord avec les valeurs expérimentales (voir figure III.19).

On pourra encore observer en particulier la répartition au nœud G6P entre les deux premières cartes. Pour une même vitesse de croissance et une même consommation du glucose, on assiste à une inversion de la répartition du flux entre voie des pentoses et glycolyse (0,59 et 0,87 respectivement à 3 h, et 0,89 et 0,56 à 8 h). En revanche, la répartition au nœud PEP est comparable dans les deux cas, avec 1/3 du flux dans les voies anaplérotiques. Dans la dernière carte, la distribution est encore différente : environ moitié-moitié au nœud G6P, et 80-20 au nœud PEP en faveur de la "PK+PTS".

De la même manière que pour les cultures précédentes, on réalise une cinétique de flux. Les cinétiques des paramètres montrent des irrégularités témoignant de l'influence des différents métabolites (figure VI.13). Les valeurs des paramètres restent cependant très proches de celles de la

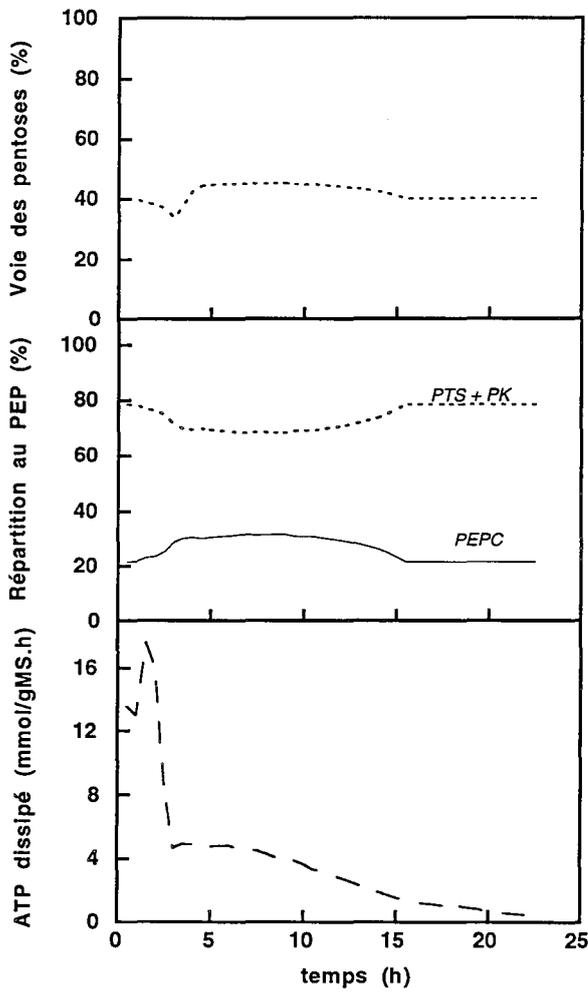


Figure VI.13 : Evolution des paramètres de répartition du flux carboné à 3,0 Osm.

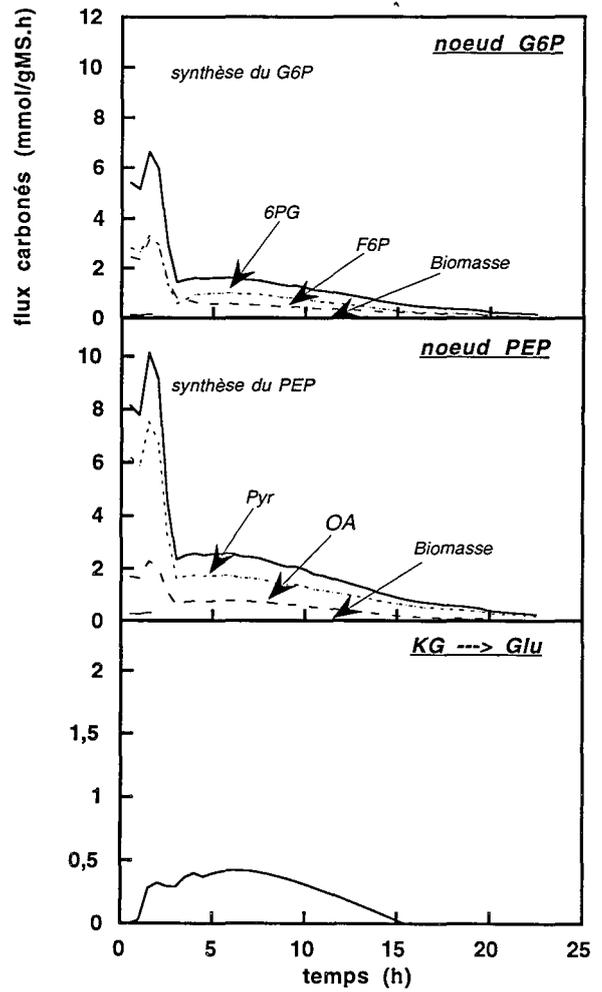


Figure VI.14 : Cinétiques des flux à 3,0 Osm.

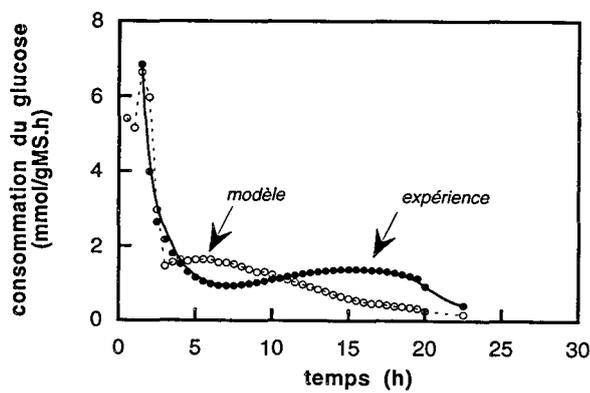


Figure VI.15 : Comparaison expérience-modèle de la vitesse de consommation du glucose à 3,0 Osm.

carte biomasse. Le %PPP subit un décrochement diminuant de 40% à 35% (inverse à celui de la culture à 1,5 Osm), puis remonte à 45% pour retrouver finalement sa valeur initiale de 40% au-delà de 15 heures de culture. Les études de sensibilité à $t=3$ h, $t=8$ h et $t=16$ h indiquent les périodes d'influence des différents métabolites et expliquent les variations observées (tableau VI.2) : à 3 heures, le glutamate est le métabolite mineur mais qui exerce une influence comparable à celle de la biomasse sur le %PPP, provoquant la diminution observée puisque le %PPP du glutamate est égal à 0 ; à 8 heures, la proline remplace le glutamate et augmente le %PPP ; enfin, à 16 heures, la biomasse est seule et impose sa valeur au %PPP (bien entendu le s_{PPP} est alors égal à 0).

Tableau VI.2 : calcul des coefficients de sensibilité de la vitesse de consommation du glucose et de la participation de voie des pentoses par rapport à la synthèse des métabolites pour les 3 échantillons de la culture à 3,0 Osm.

	s_{qs}			s_{PPP}		
	3 h	8 h	16 h	3 h	8 h	15 h
<i>Biomasse</i>	0,8	0,7	1	0,2	0,09	0
<i>Proline</i>	-	0,24	-	-	0,07	-
<i>Glutamate</i>	0,14	-	-	0,11	-	-

Les courbes de répartition du flux au nœud PEP montrent une diminution de la participation de "PTS+PK", et une augmentation de la voie PC. Ceci témoigne à nouveau de l'intervention du glutamate et de la proline (pour lesquels le nœud PEP a une répartition 50:50) qui pondère la répartition 78:22 de la biomasse.

L'évolution des flux nets est présentée sur les cinétiques de flux (figure VI.14). On constate en particulier que le flux vers le 6PG devient supérieur à celui dirigé vers le F6P lors de l'influence du glutamate et de la proline. Il y a donc une réorientation du flux carboné de la glycolyse vers la voie des pentoses qui n'apparaît pas clairement sur les cinétiques de paramètres. Ceci est illustré en détail sur les cartes de flux, qui reflètent bien les trois périodes de synthèse de biomasse et glutamate, de biomasse et proline puis de biomasse uniquement (figure VI.10, VI.11 et VI.12 respectivement).

La comparaison de la vitesse spécifique de consommation du glucose expérimentale et simulée est acceptable, bien que les maxima ne soient pas obtenus au même moment et indique une bonne cohérence entre modèle et expérience (figure VI.15).

Ces évaluations apportent ici un élément supplémentaire dans la visualisation de la distribution du flux carboné dans le réseau métabolique par rapport aux cultures à 0,45 et 1,5 Osm.

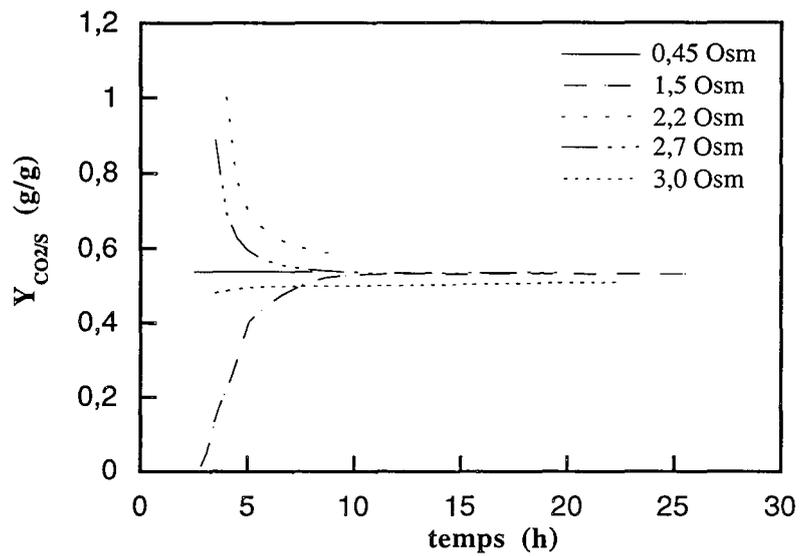


Figure VI.16 : Calcul du coefficient de conversion du glucose en CO_2 à partir des estimations de la production de CO_2 par Métaflux pour toutes les cultures discontinues (milieu BMCG).

L'introduction de la synthèse du glutamate engendre un comportement en opposition avec celui de la proline au nœud G6P en favorisant la glycolyse. En revanche, il possède la même action sur le nœud PEP.

VI.1.3. Discussion : effet de l'osmolarité sur les flux calculés

Dans ce paragraphe, nous discuterons les capacités de Métaflux à prendre en compte l'effet de la variation de l'osmolarité du milieu de culture. La méthode développée n'intègre en effet aucune donnée spécifique sur ce phénomène, et il paraît important d'analyser les potentialités et les limites de Métaflux face à une telle situation. Nous regarderons donc plus précisément les capacités à simuler ou à confirmer les observations faites au chapitre III et IV, à savoir une diminution de la vitesse spécifique de croissance et du rendement instantané de croissance, une augmentation de la synthèse de proline et de gaz carbonique.

VI.1.3.1. Effet sur le calcul des paramètres cinétiques

La vitesse spécifique de croissance constitue une donnée de base aux calculs de flux par Métaflux. Elle est donc bien évidemment prise en compte et tout à fait fidèle aux données expérimentales. De même pour la synthèse de proline et de glutamate. Nous avons introduit l'effet de l'osmolarité par le biais des pseudo-excrétions de ces composés. Ils sont donc correctement pris en compte lors des calculs de flux.

Les calculs permettent également de simuler la diminution du rendement instantané de croissance ($Y_{X/S}$) comme l'ont montré les chiffres présentés dans les paragraphes précédents. En théorie, une même consommation de glucose devrait être obtenue pour une même production de biomasse, puisque la relation stœchiométrique de synthèse de la biomasse à partir du glucose ne varie pas d'une culture à l'autre. La variation observée est imputable à l'utilisation des pseudo-excrétions de proline et de glutamate. Ces composés vont créer une augmentation de la vitesse de consommation du glucose en proportion directe avec leurs vitesses de synthèse non corrélées à celle de la biomasse. Ceci aura pour conséquence de diminuer d'autant le rendement $Y_{X/S}$.

VI.1.3.2. Prédiction de la vitesse de production de CO₂ par Métaflux

Comme nous l'avons montré dans le chapitre III, l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture engendre une augmentation de la production de gaz carbonique. Métaflux évalue cette vitesse de production et il nous est alors possible de recalculer les valeurs du coefficient $Y_{CO_2/S}$ de manière à les comparer aux valeurs trouvées expérimentalement. Le résultat de ces calculs (en valeurs cumulées) sont reportés sur la figure VI.16. On peut observer que ce coefficient est constant

quelle que soit la culture, à une valeur d'environ 0,55 g/g. Ce chiffre correspond parfaitement à la valeur de 0,56 tirée de l'équation stœchiométrique de synthèse de la biomasse à partir du glucose, ce qui est tout à fait logique puisque Métaflux utilise les équations stœchiométriques pour calculer la production de CO₂, et que la biomasse est le seul métabolite produit dans ces différentes cultures.

Les conclusions que nous pouvons en tirer sont les suivantes :

- Métaflux est incapable de prédire ou de confirmer l'augmentation de production de gaz carbonique avec l'osmolarité du milieu.
- l'augmentation de la production de CO₂ n'est pas due à la synthèse de proline et/ou de glutamate consécutive à l'augmentation de l'osmolarité, puisque la méthode des pseudo-excrétions ne permet pas non plus de simuler les données expérimentales.
- l'augmentation de la production de CO₂ est donc liée à une ou plusieurs réactions qui ne sont pas explicitement incluses dans le réseau biochimique de Métaflux. Il pourrait en fait s'agir de réactions de maintenance, se traduisant par une consommation de glucose entièrement oxydé en CO₂ et H₂O. Ce type de réactions ne pourrait être pris en compte qu'en réalisant un bilan matière sur le gaz carbonique, et donc en utilisant ce composé comme une donnée et non un résultat de calcul.
- remarquons enfin que les comparaisons expériences-simulations, qui ont conduit à des résultats globalement acceptables, ne permettent pas non plus de refléter ce phénomène.

VI.1.3.3. Effet sur la distribution du flux carboné

L'augmentation de l'osmolarité du milieu se traduit par une diminution de la synthèse de biomasse et une augmentation de celle de proline et de glutamate. Ceci se répercute sur le calcul et la distribution du flux carboné dans le réseau métabolique. Dans tous les cas, cette redistribution des flux est transitoire et intervient immédiatement après le choc osmotique, pendant la phase relativement courte de fortes accumulations de proline et/ou glutamate et de faible croissance. Ensuite, la synthèse de biomasse devient largement majoritaire devant l'accumulation de proline et la distribution des flux reflète alors la carte individuelle de la biomasse.

L'effet de l'augmentation de l'osmolarité du milieu sur la distribution des flux se caractérise donc par :

- une diminution des flux de "sorties biomasse" au niveau de chaque précurseur,
- une redistribution du flux au nœud G6P, c'est à dire une augmentation de la voie des pentoses lors de l'accumulation de proline, et une diminution de cette même voie lors de la synthèse transitoire de glutamate aux pressions osmotiques supérieures à 2 Osm,
- une redistribution du flux au nœud PEP, avec une augmentation de la participation des voies anaplérotiques lors de la synthèse de proline ou de glutamate par rapport à la répartition en synthèse de biomasse seule.

Conclusions

L'application de Métaflux aux cultures discontinues réalisées donne dans l'ensemble des résultats satisfaisants :

- aucune incohérence,
- bonne corrélation entre les vitesses spécifiques de consommation du glucose expérimentale et calculée (en phase de croissance),
- cinétiques des paramètres et des flux en accord avec les études de sensibilité,
- utilité de la méthode de pseudo-excrétion.

Les informations qui peuvent être tirées de ces calculs sont les suivantes :

- l'influence des métabolites définissant les différentes phases de la culture,
- la répartition du flux carboné et l'importance relative des différentes voies métaboliques,
- le flux instantané, maximum ou minimum que doit supporter chaque étape enzymatique.

Concernant l'influence de l'osmolarité sur les calculs de Métaflux, nous avons vu que

- les paramètres cinétiques peuvent être correctement évalués, grâce à la méthode des pseudo-excrétions, à l'exception de la production du gaz carbonique,
- l'augmentation de la production de gaz carbonique n'est pas liée à la synthèse de biomasse, ni de proline ou de glutamate. L'explication est donc à rechercher auprès d'autres réactions biochimiques, telle qu'une maintenance de type $\text{glucose} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ par exemple,
- la proline et le glutamate provoquent des réarrangements transitoires du flux carboné aux nœuds du réseau, réarrangement d'autant plus marqués que la synthèse de ces composés est forte, et donc que l'osmolarité est élevée.

VI.2. Analyse métabolique en procédé de production de glutamate

Analysis of metabolic fluxes during glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* in fed-batch fermentation with surfactant addition.

ABSTRACT

The physiological behavior of *Corynebacterium glutamicum* during glutamate production with surfactant addition in fed-batch culture on glucose was examined in terms of carbon flux distribution within the central metabolism. Carbon fluxes were evaluated from the measured fed-batch fermentation kinetics with the recently developed Metaflux procedure, assuming the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) as sole anaplerotic reaction. A 52% pentose phosphate pathway (PPP) participation is observed during the growth phase to meet the NADPH requirement, and a low utilization of the PEPC (20%). The PPP is then found to decrease from 52% to 5% as the glutamate production increases, whereas the repartition at the PEP node equilibriate. It is thus shown the important role of the anaplerotic pathway, which are proposed, together with glutamate secretion, to be the limiting steps for high glutamate production rates.

INTRODUCTION

Glutamate, the major commercial amino acid with an annual production of 800 000 tonnes, is produced by *Corynebacteria* strains. Industrial fed-batch fermentations consist of an initial rapid growth of the bacteria followed by a glutamate excretion phase, induced by the addition of surfactants. The processes result in final glutamate concentrations above 100 g/l with relatively high sugar to glutamate conversion yield. Future productivity improvements are likely to be achieved by the engineering of *Corynebacteria* aimed at amplifying the metabolic fluxes leading from the consumed sugar to the excreted glutamate. But this pathway engineering approach requires an adequate understanding of the control mechanisms that regulate first the transport of sugar, then the carbon flux through the several parts of the central metabolism (the glycolysis, the pentose phosphate cycle, the tricarboxylic acid cycle, and the associated anaplerotic reactions) and finally the excretion of glutamate.

Recent efforts have been devoted to understand which pathways are operative in defined culture conditions and to evaluate the fluxes through the pathways using complementary experimental and theoretical approaches. For *Corynebacterium glutamicum* growing in batch cultures, ^{13}C -NMR studies indicated, at the G6P node, a split ratio of 40 to 45 % of the glucose uptake rate towards the pentose phosphate pathway^{1,2}. Flux distribution at the PEP node was found to be 38% for the anaplerotic pathways¹. For *Corynebacterium glutamicum* grown in continuous culture on glucose, enzymatic measurements showed a cascade in the anaplerotic pathways from PEP Carboxylase to malic enzyme and finally Pyruvate Carboxylase when the dilution rate was increased³. Other calculated flux distributions during batch growth on glucose showed a 30% repartition towards PPP and a 14% towards anaplerotic pathways⁴. According to several NMR and flux analysis studies, a shift from cellular growth to lysine production resulted in a higher participation PPP cycle. Thus the flux towards the pentose pathway went up to 66% of the glucose uptake rate in order to meet the higher NADPH requirements associated with lysine production^{4,5}. Only one recent NMR investigation² dealt with the flux analysis of glutamate producing *Corynebacteria*. For cells grown in flasks on glucose under biotin limitations, the flux repartition at the G6P node was found to decrease to 17% during glutamate production.

Flux analysis using mass balances is now the classical method for metabolic fluxes evaluation in microorganisms. For example, the Bionet program⁶ is based on a bioreaction network encoded under a matricial form. Major assumption is the pseudo steady state (PSS) for intracellular metabolites. However, recent work by Sonntag et al² proposes an important back flux in anaplerotic pathways but also in the PPP, which could not be included in classical flux analysis methods, and postulates an excess of NADPH, whereas it is usually assumed to limit the metabolism. This counteracts the PSS hypothesis, and a novel approach for fluxes evaluation was developed based on these observations and on NMR determined ^{13}C distribution in metabolites⁵.

In order to improve our understanding of flux distribution in glutamate producing *Corynebacteria*, this study determined the fermentation kinetics and the dynamics of carbon fluxes through the central metabolism under intense glutamate production conditions triggered by surfactant addition. The kinetics of fed-batch fermentation of *Corynebacterium glutamicum* was first determined under controlled pH, dissolved oxygen and glucose concentration. A newly developed flux analysis procedure⁷ was then used to evaluate the time variation of the intracellular fluxes through some of the key reaction steps of the bacterial central metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and media. *Corynebacterium glutamicum* (strain ATCC 17965) given by Orsan (Paris, France) is grown for inoculum in the modified basal medium for *Corynebacteria* growth

BMCG⁸. Catechol is replaced by a mixture containing nicotinic acid, pantothenic acid, choline chloride and deferoxamine at a concentration of 3 mg/l each. Biotin and thiamine hydrochloride are used respectively at 30 µg/l and 2 mg/l. Glucose at 60 g/l is the sole carbon source. Osmolarity of the fermentation medium is measured to be 1.3 osmol/kg.

Fermentation. The kinetics of *Corynebacterium glutamicum* growth and glutamate excretion was determined in a fed-batch fermentation carried out in a 20 liters fermentor (Biolafitte, France). The first part of the fermentation was performed in a batch mode. Four 150 ml flasks overnight culture of *Corynebacterium glutamicum* in basal medium were used to inoculate 8 liters of modified basal medium. The culture was grown at a controlled temperature of 35°C with an initial aeration rate of 500 l/h. The pH was measured by an Ingold probe (Ingold, France) and automatically regulated at 7.3 by adding 12 N ammonia. At 7.5 hours ($OD_{570}=17$), 2.5 g/l autoclaved Tween 40 was added to the medium. Feeding with a solution at 600 g/l glucose was started one hour later with an initial flow rate of 100 ml/h. The flow rate was then adjusted to maintain the glucose concentration in the reactor at less than 5 g/l. Dissolved oxygen was measured by a galvanometric probe (Ingold, France) and maintained over 20% by adjusting the stirring and aeration rates.

Analysis. During the fermentation, samples were collected and centrifuged (2 min, 6000 g, 4° C). The biomass concentration was determined by the dry cell weight method. Sugars and organic acids analysis 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 H₂SO₄ (0.02 M) elution, a UV detector and a refractometer detector. L-glutamate was assayed enzymatically (Boehringer enzymatic kit, France) on the supernatant. The glutamate dehydrogenase converted the L-glutamate to α -ketoglutarate with concomitant formation of NADH. Thanks to the pig heart diaphorase, NADH reduces the iodinitrotetrazolium chloride in a formazan salt detectable at 492 nm with a spectrophotometer Multiskan MCC/340. The CO₂ proportion in the exhaust gas was measured by infra-red absorption with a Binos 100 (Rosemount, France).

Specific rates. These were calculated by derivative methods after smoothing and extrapolation of the experimental data.

Evaluation of carbon fluxes. Intracellular fluxes through the central pathways were calculated using the previously developed Metaflux procedure. It relies on an assumed biochemical reaction network for the conversion of consumed glucose into biomass and excreted metabolites. It also assumes a pseudo-steady state approximation for all the intracellular metabolites. The central feature of Metaflux, which greatly simplifies the mathematical resolution of the problem, is to consider the self-sufficiency for the individual metabolite and biomass producing pathways in terms of intermediate regeneration. Thus regeneration reactions for the metabolic intermediates and cofactors are applied first to the individual glutamate producing pathway, then to the pathways leading to biomass precursors. One thus obtains individual metabolic maps representing the flux distribution through the central metabolism for the production of either one mole of glutamate or 1 g of biomass. Metaflux procedure then multiplies the fluxes given by the individual metabolic maps by the specific

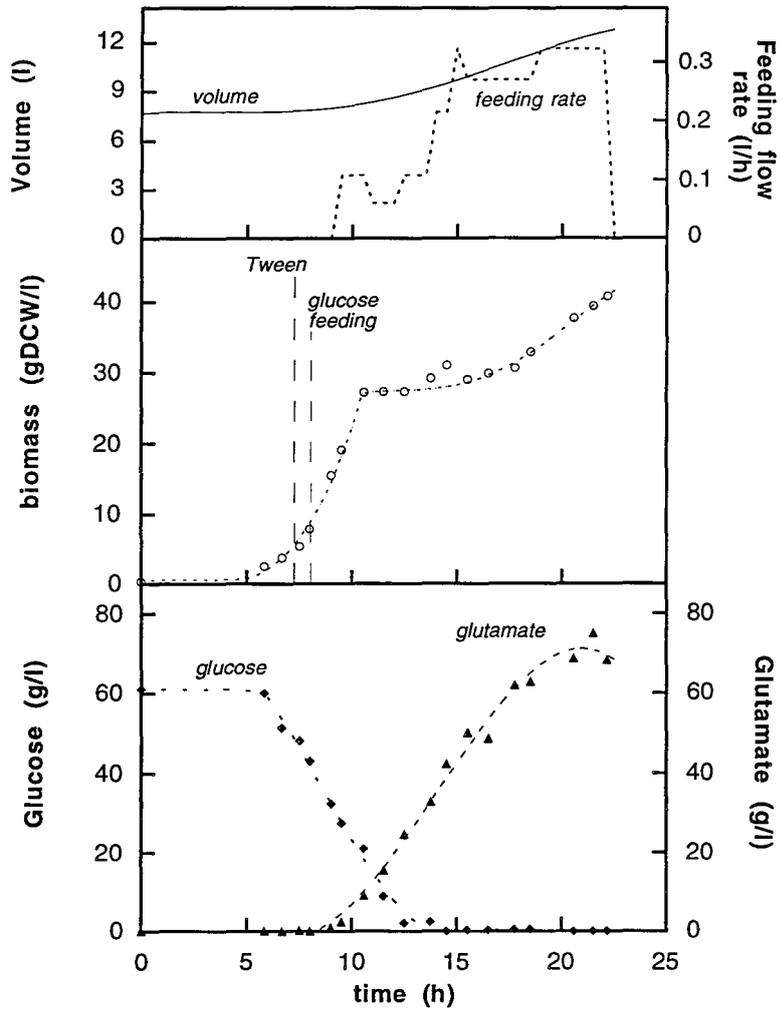


Figure 1 : Evolution of the volume, the feeding flow rate, the biomass, glucose and glutamate concentrations during the fermentation course.

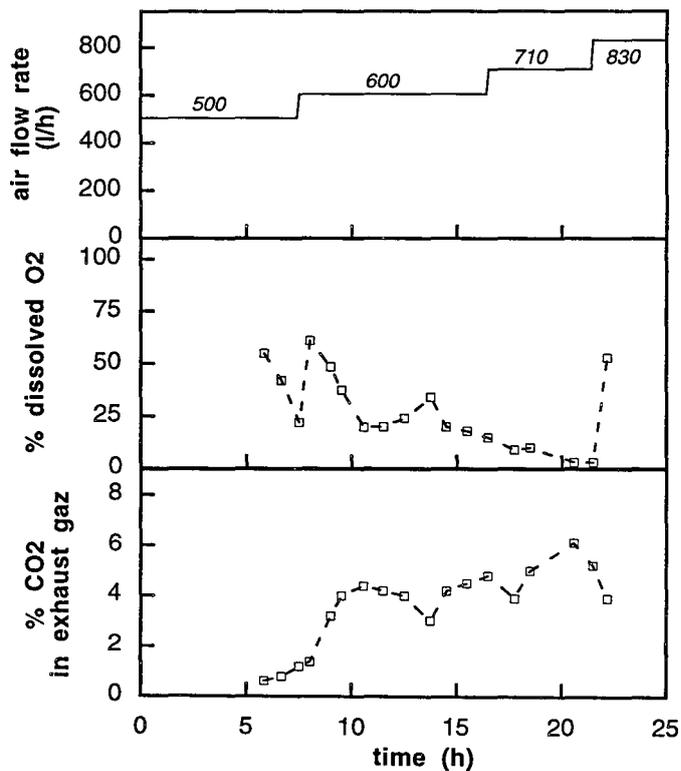


Figure 2 : Evolution of the air flow rate, the dissolved oxygen and the pourcentage of CO₂ in exhaust gas during the fermentation course.

rates of either glutamate or biomass production and calculates the total flux for a given reaction by adding the contribution from glutamate and biomass production. The final step in the Metaflux procedure is to calculate the total substrate uptake rate and the total intracellular fluxes by adding the previously determined contributions of the individual metabolites and biomass.

RESULTS AND DISCUSSION

Fed batch fermentation.

Corynebacterium glutamicum was first grown batchwise starting from 60 g/l glucose. After 8.5 hours a concentrated glucose solution was continuously fed to the fermentor to maintain a glucose level around 5 g/l. The necessary feed flow rate and the time variation of the medium volume in the fermentor, which increased from 8 to 12.6 liters, are indicated in figure 1.

As also seen in figure 1, growth only started after a 4 hours lag phase probably because of the strong increase of osmotic pressure from 0.5 osmol/kg to 1.3 osmol/kg between the inoculum and the fermentation medium. Growth then proceeded at a fast rate until the biomass level reached 27 g/l dry cell weight after 10 hours. The addition of the surfactant Tween at 7.5 hours did not have an immediate effect on cellular growth. It is only a few hours later that the growth rate was considerably decreased. The addition of Tween, on the contrary, resulted in an immediate excretion of glutamate which proceeded at a high rate until reaching a final 70 g/l after 20 hours of fermentation (figure 1). At the end of the culture one observed a strong reduction in glutamate production, concomitant with a faster cellular growth. This is probably the result of the progressive dilution of the surfactant level which becomes too low to sufficiently affect the membrane permeability for glutamate. Other metabolites were found in very small amounts, specially at the end of the fermentation, such as trehalose, proline, and organic acids (data not shown).

Dissolved oxygen decreased during the initial fast growth phase and was then maintained around 20% by adjustment of the air flow rate and stirring speed (figure 2). At the time of Tween addition, one observed a sharp transient increase in the dissolved oxygen. The second growth phase occurring towards the end of the fermentation is accompanied by a progressive decrease in dissolved oxygen. The CO₂ content in the exhaust gas phase was also monitored (figure 2). It showed a progressive increase up to 6%.

A carbon balance was performed during the course of the fermentation. Assuming a carbon biomass content of 44%, the carbon contained in the produced biomass, glutamate and CO₂ was found to represent 93% of the carbon content of the consumed glucose. This confirms the absence in significant quantities of other excreted metabolites.

Specific rates of cell growth and metabolism.

Specific rates of cell growth and metabolism were calculated from the previous experimental results and are represented as a function of time in figure 3. The specific growth rate increases rapidly

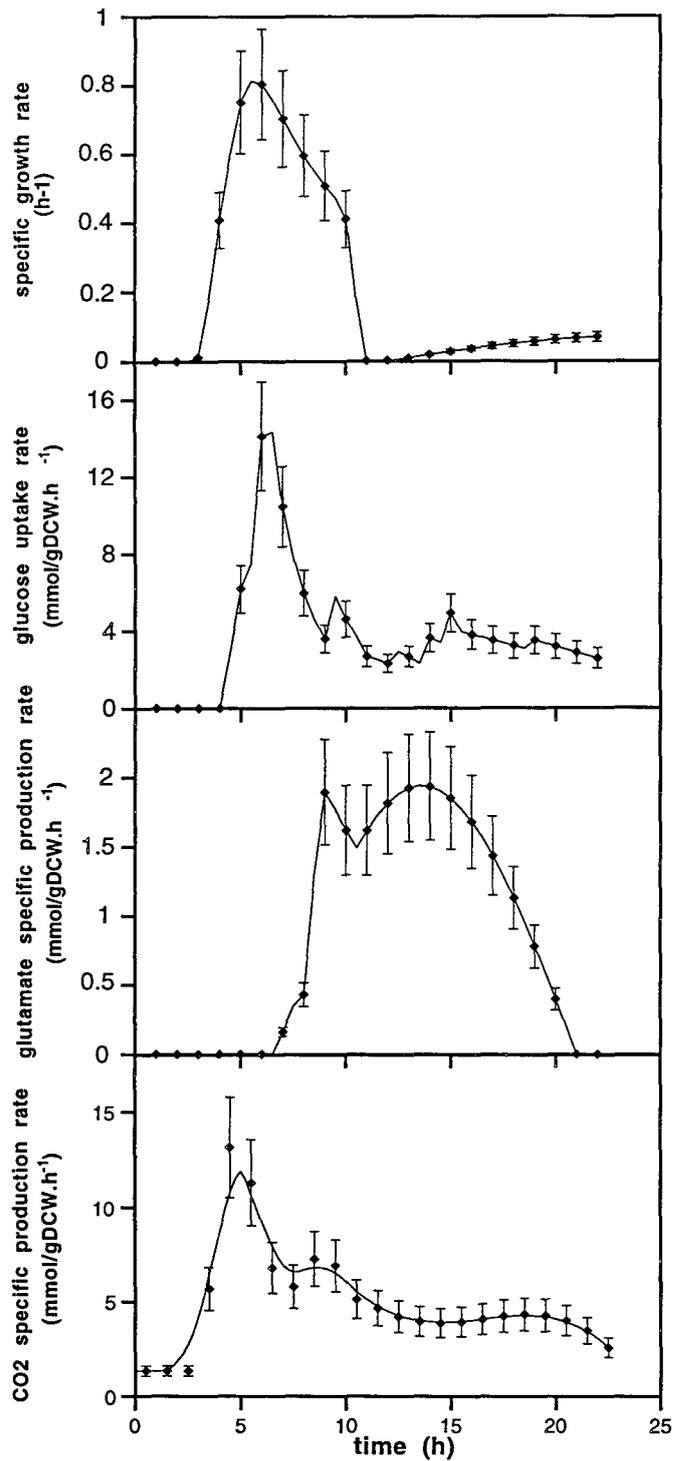


Figure 3 : Specific rates during the fermentation.

to a maximum of $0.8 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$. After the addition of Tween, it decreased first slowly to 0.4 h^{-1} then more suddenly after 10 hours. The specific glucose uptake rate showed a maximum around $14 \pm 3 \text{ mmol Glc/gDCW.h}^{-1}$ at 6.5 h, corresponding to the fastest growth rate. It then decreased to a relatively stable value of 3.5 maintained during the whole glutamate production phase. The specific glutamate production rate sharply increased after the addition of Tween, and was maintained at a maximum value near $1.8 \text{ mmol Glu/gDCW.h}^{-1}$ during 7 hours of fermentation. After 15 h it progressively decreased until the end of the excretion phase. The specific rate of CO_2 production showed a time variation comparable to that of the specific rate of glucose consumption, showing a maximum of $13 \text{ mmol Glu/gDCW.h}^{-1}$ during the initial rapid growth phase and then a relatively constant level during glutamate production.

The individual metabolic map for glutamate production.

A first essential step in the Metaflux procedure is to establish the individual metabolic maps for the excreted glutamate. It consists in identifying the main pathway leading from the consumed carbon source to a considered metabolite, and then applying a set of regeneration reactions for the intermediates or cofactors. Figure 4 represents the main pathway of transformation of glucose into glutamate. The only assumed anaplerotic pathway is the transformation of PEP into OAA by the PEP carboxylase reaction. Sugar transport is assumed to take place by a PTS system. Figure 4 also indicates the cosubstrates which are required for the involved reactions. Thus for the production of 1 mole glutamate this pathway consumes 0.5 glucose, 0.5 PEP, 0.5 ATP, 1 NAD, 1 ADP, 1 AcCoA, 1 NADP and 1 NADPH. Simultaneously it generates 0.5 Pyr, 0.5 ADP, 1 NADH, 1 ATP, 1 CoA, 1 NADPH and 1 NAD.

Regeneration reactions are then applied to the net consumed intermediates. Either direct regeneration of PEP from Pyr, ADP from ATP, NAD from NADH. There is no net requirement for NADPH. Acetyl coenzyme A is regenerated from glucose through a pathway involving glucose transport, glycolysis and the pyruvate reaction according to the following stoichiometry :



The overall balance for the main and the regeneration reactions indicates a global consumption of 1 glucose per mole glutamate formed. There is also a net production of 2 ATP.

The corresponding flux distribution for the production of 1mole glutamate can then be determined. 1 mole of glucose is transported inside the cell and transformed by glycolysis into 2 moles PEP. At the PEP node there is an equal flux repartition towards pyruvate and oxaloacetate. The final condensation of 1 mole OAA with 1 AcCoA yields 1 KG and thus 1 Glutamate. There is a global production of 1 mole CO_2 . There is no requirement for the PPP cycle, since the glutamate main pathway is self sufficient for NADPH.

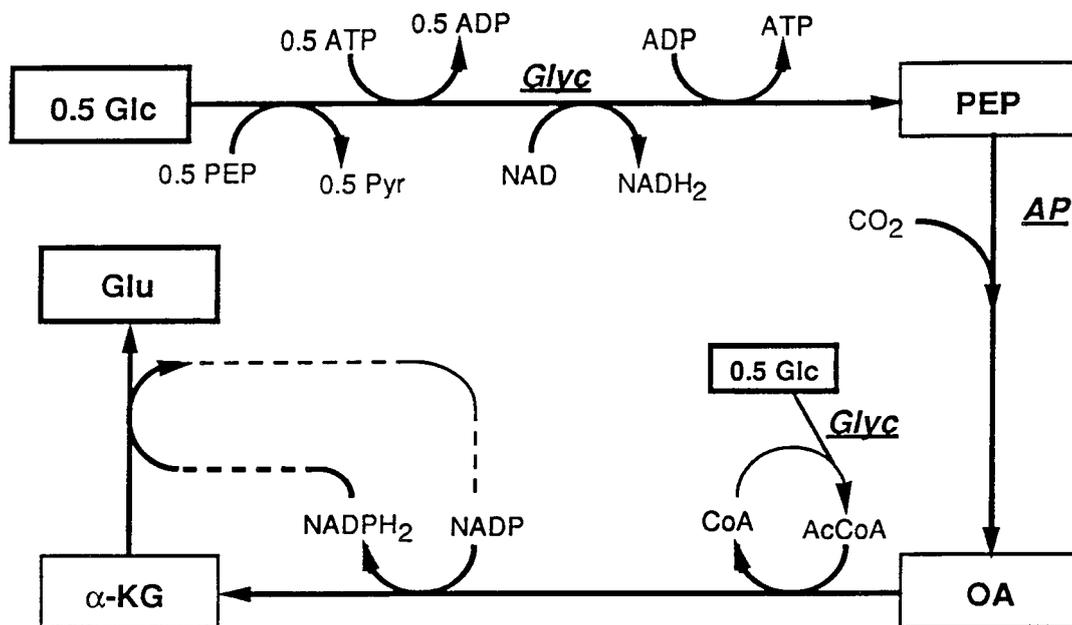


Figure 4 : Glutamate individual biosynthetic pathway.

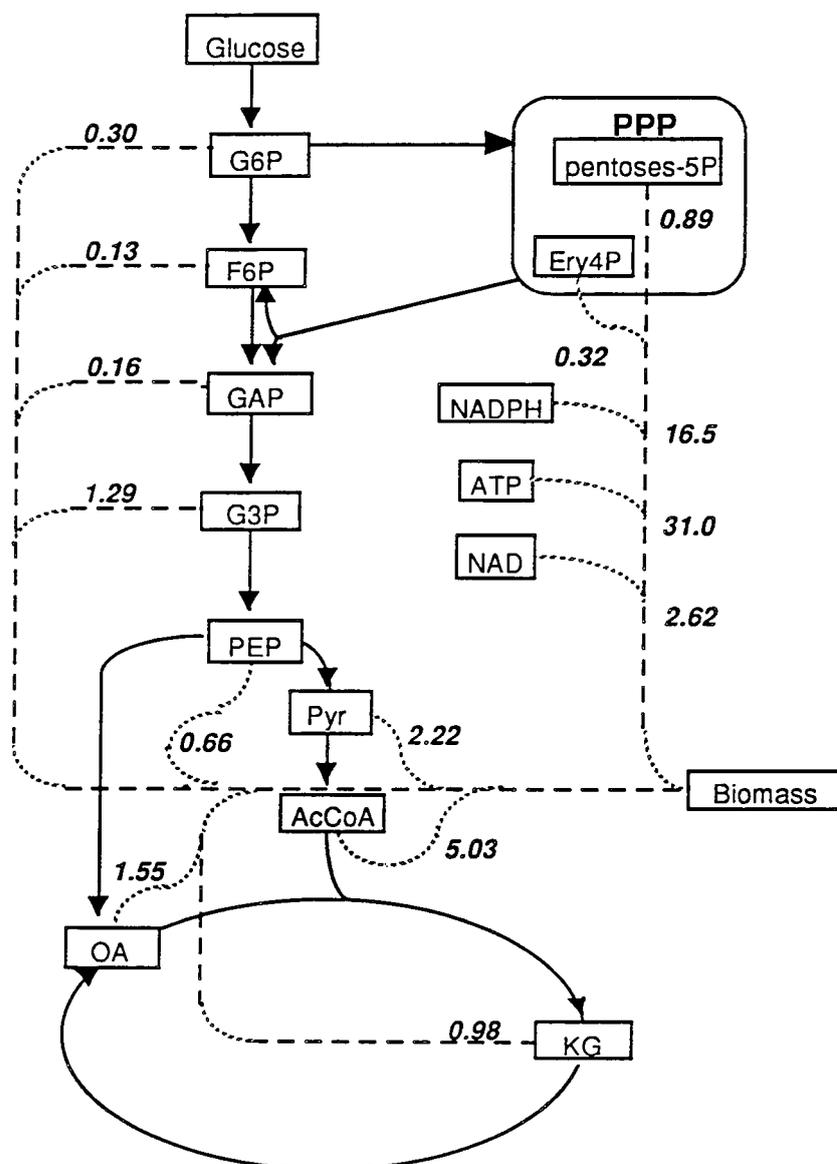


Figure 5 : Biomass individual biosynthetic pathway.

The individual metabolic map for biomass production

The metabolic map for biomass production is determined considering the initial transformation of glucose into 11 precursors, then the synthesis of macromolecules (proteins, DNA, RNA, polysaccharides...) from these precursors, and finally the assembly of the the macromolecules into biomass⁹. An individual metabolic map is first determined for each of the precursors, assuming the self-sufficiency of the precursor synthesis pathway in regenerating all the metabolic intermediates involved. Corynebacteria are assumed to be composed of 11 classes of constitutive biomolecules : proteins, DNA, RNA, lipids, glutamate, peptidoglycan, glycogen, serine, polyamines and others (teichoic and mycolic acids). In a final step, the global metabolic map for biomass production is calculated by adding the flux contributions of the individual maps of the precursors weighted by the molar requirement of each of them. By adding all the metabolic contributions for precursors and cofactors production, one obtains the overall flux distribution per g of formed biomass indicated in Figure 5. Corynebacteria formation is thus seen to require the consumption of 0.01 mole glucose per g biomass. It also results in a CO₂ production of 0.023 mol CO₂ / g biomass (0.62 mol/mol) and an ATP dissipation of 0.026 mol ATP / g biomass (0.7 mol/mol).

The global flux distribution at the G6P node is characterized by a split ratio of 52% in the pentose phosphate pathway. At the PEP node, on the other hand, there is a global repartition of 80% towards pyruvate.

Flux distributions during the fermentation

The individual maps for biomass and glutamate production are used to evaluate the global intracellular flux distribution at a given time of the fermentation process.

First one calculates, for the production of biomass, the specific rate (in mole/g biomass.h⁻¹) of glucose uptake and the fluxes of intermediate by multiplying the previously determined molar quantities per g biomass by the specific rate of cell growth. In a similar manner, for glutamate, one calculates the specific rate of glucose uptake and intermediary fluxes by multiplying the molar quantities obtained in the individual map by the specific rate of glutamate excretion. The total flux at each reaction step is then simply determined by adding all the flux contributions from biomass and metabolites production. In addition to the global flux distribution, the procedure yields the total specific consumption rate of glucose and the total specific rate of CO₂ production at a given time of the fermentation.

Figure 6 shows the calculated flux distribution after 5 hours, at the beginning of the growth phase. The specific growth rate was near 0.75 h⁻¹. Under these conditions, the flux repartition at the critical nodes is that of the individual metabolic map for biomass production namely 52% towards PPP at the G6P node and 80% towards pyruvate at the PEP node. It should be noticed that the flux indicated from PEP to Pyr corresponds to the sum of the fluxes by the PTS transport system and by

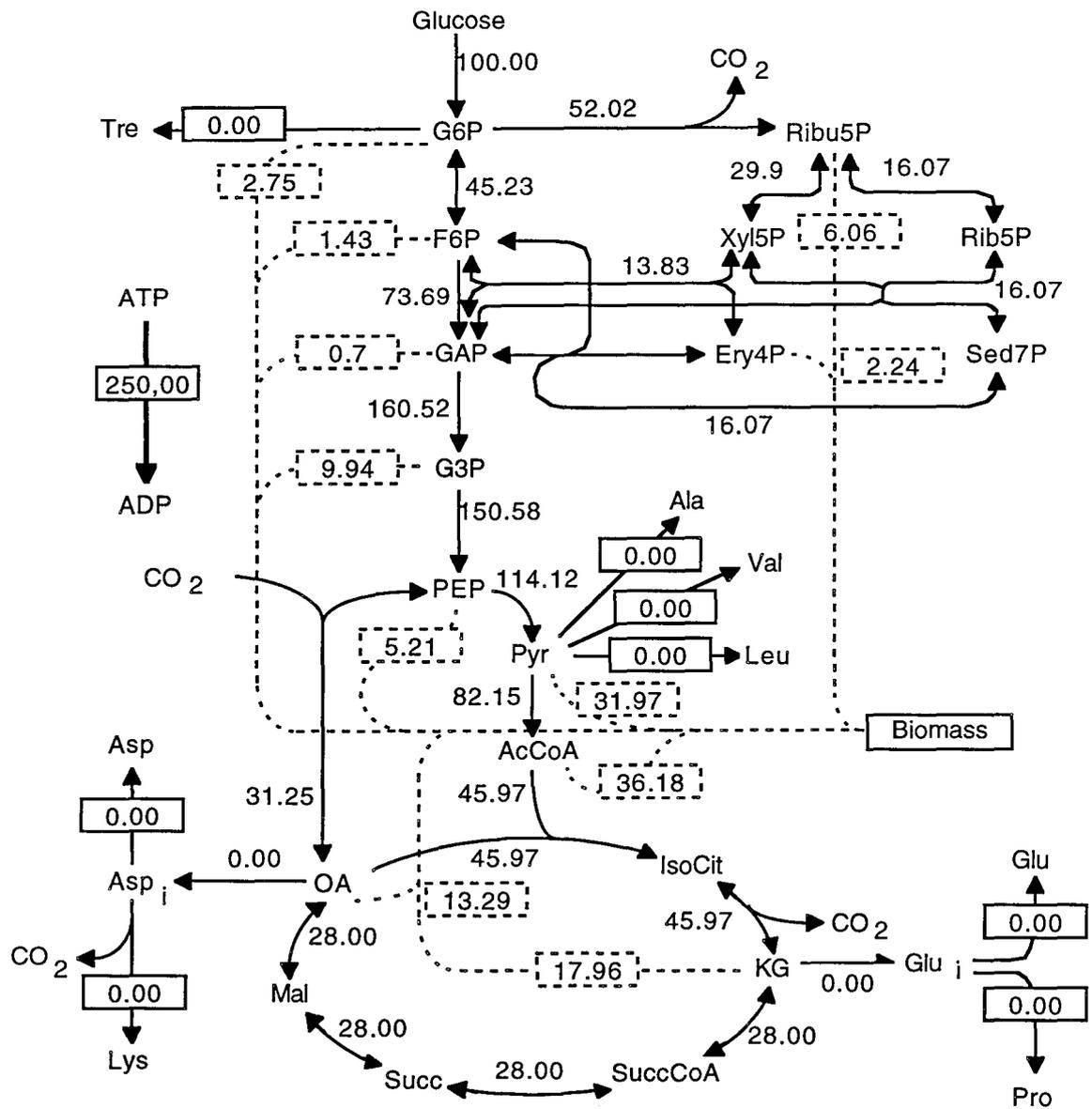


Figure 6 : Normalized carbon fluxes distribution at 5 h. Calculated glucose consumption rate is 5.2 mmol/gDW⁻¹.h⁻¹, Experimental specific growth rate is 0.75 h⁻¹, and glucose consumption rate is 3 mmol/gDW⁻¹.h⁻¹

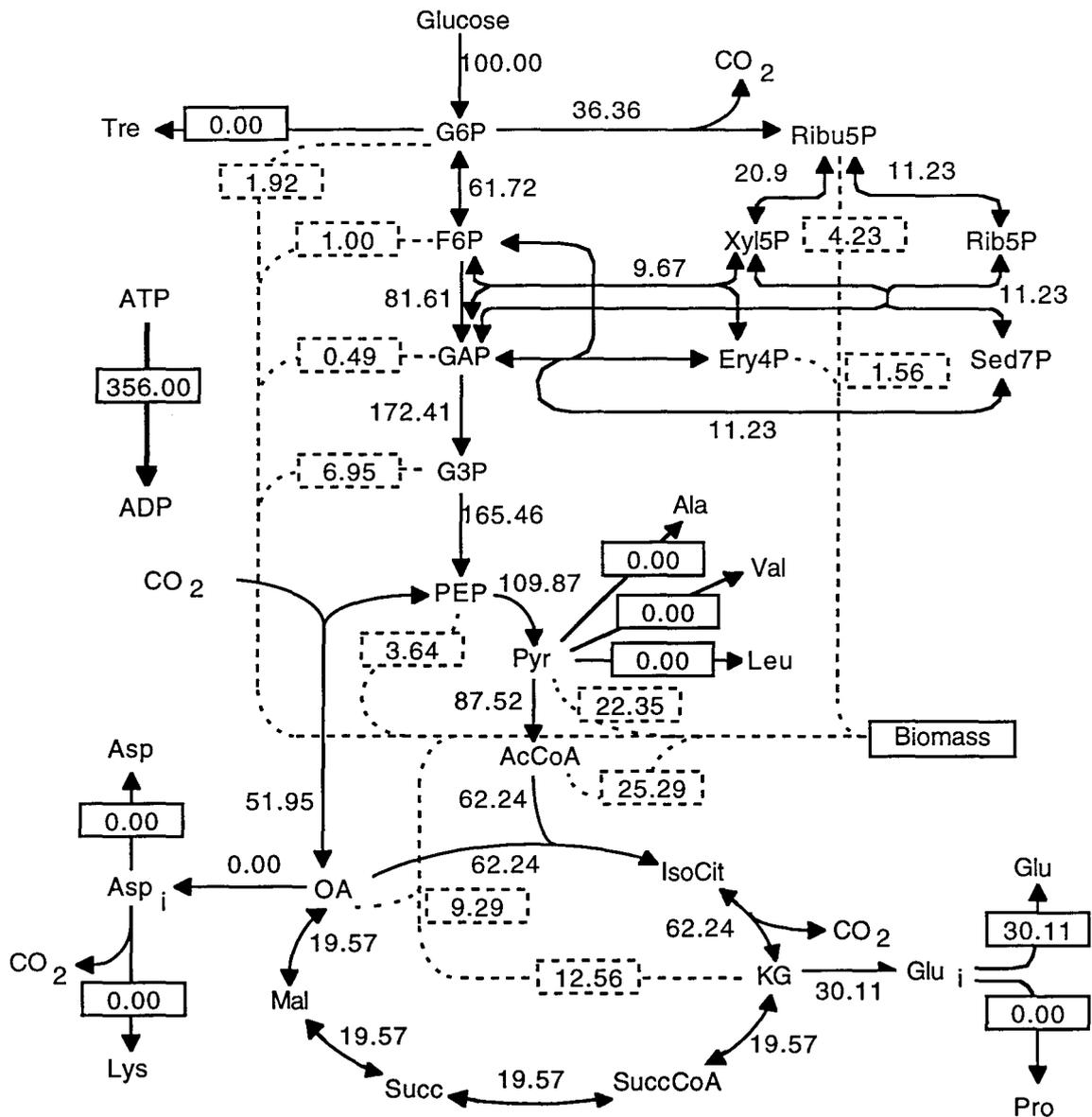


Figure 7 : Normalized carbon fluxes distribution at 10 h. Calculated glucose consumption rate is 5.9 mmol/gDW⁻¹.h⁻¹. Experimental specific growth rate is 0.4 h⁻¹, and glucose consumption rate is 5.8 mmol/gDW⁻¹.h⁻¹

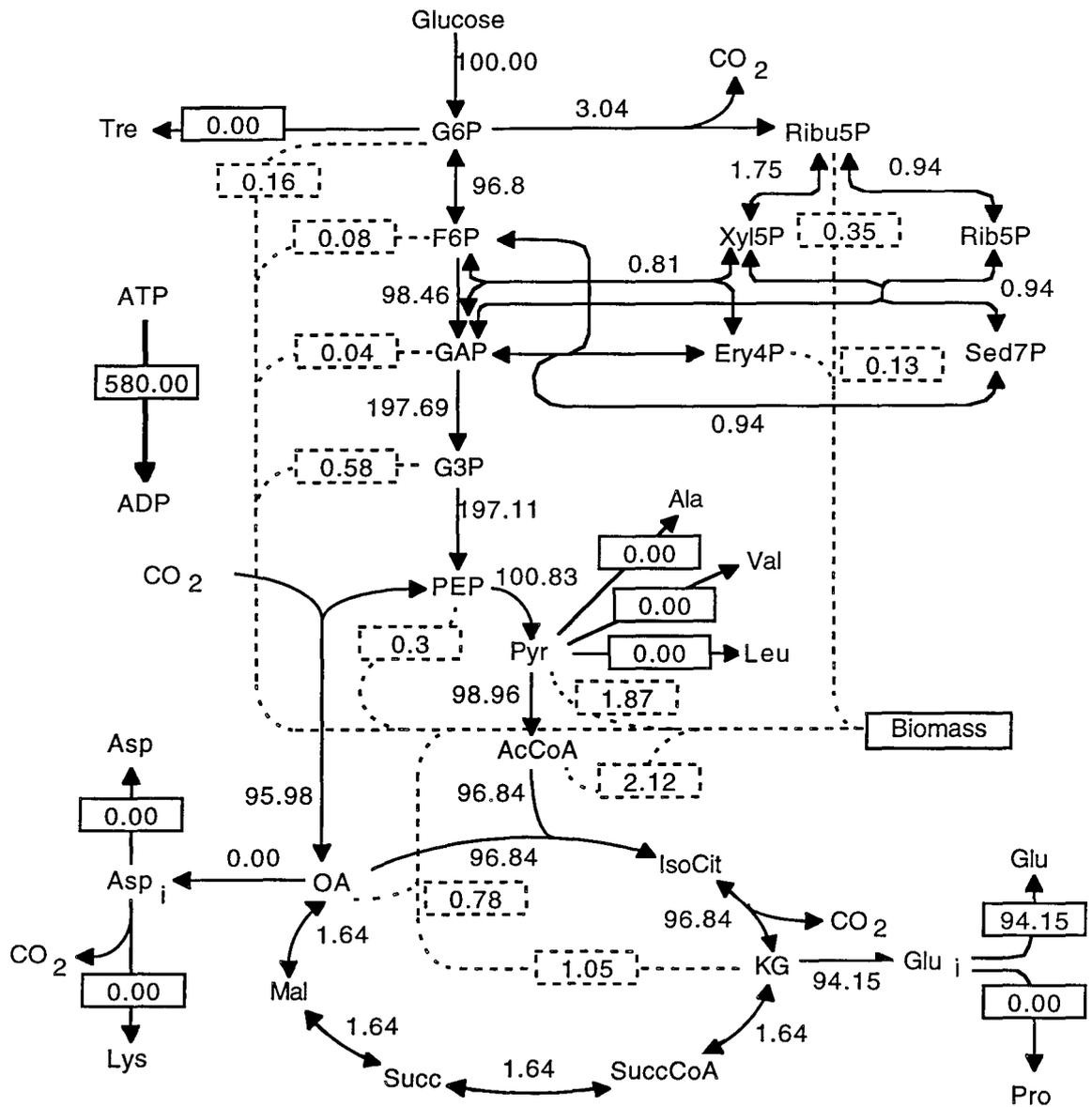


Figure 8 : Normalized carbon fluxes distribution at 14 h. Calculated glucose consumption rate is $2.2 \text{ mmol/gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Experimental specific growth rate is 0.05 h^{-1} , and glucose consumption rate is $2.3 \text{ mmol/gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

the pyruvate kinase. The calculated glucose uptake rate of $5.2 \text{ mmol/gDCW.h}^{-1}$, corresponding to a 80% (w/w) conversion yield of glucose into biomass, was much greater than the experimental value ($3.0 \text{ mmol/gDCW.h}^{-1}$). This difference can probably be attributed to the very large uncertainties associated with the determination of the specific rates of both cell growth and glucose consumption during the initial fermentation phase. On the contrary, the calculated CO_2 production rate of $13 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ is in good agreement with the experimentally determined production rate of $14 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$.

The flux distribution after 10 hours is given in figure 7. The specific growth rate decreased to 0.4 h^{-1} and the specific rate of glutamate production was $1.6 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$, accounting for slower growth and glutamate production. The PPP participation at the G6P node was found to decrease to 30%, whereas the part of the PEPC anaplerotic pathway was calculated to be 32% at the PEP node. This reflects the influence of the glutamate map, which do not require the PPP. A 30% participation of the glutamate in the global glucose consumption rate yields a 40% decrease of the PPP cycle and a 50% increase of the PEPC pathway compared to the previous calculations. A specific glucose uptake rate as high as $5.8 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ was observed (leading to a glucose to glutamate conversion yield of 22% (w/w)), in great agreement with the theoretical value of $5.9 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$. This yields The specific rate of CO_2 production was estimated to $10.3 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ for an experimental value around $7 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$.

Flux distribution at 14 hours was obtained during the phase of reduced growth rate (specific growth rate of 0.05 h^{-1}) concomitant to a high specific glutamate production rate of $1.9 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ (figure 8). Under these conditions, the flux distribution closely reproduced the individual map for glutamate production, i.e., the PPP drastically dropped to 5%, whereas glycolysis and anaplerotic pathways equilibriate. Theoretical glucose uptake rate of $2.2 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ was found to be in close agreement with the experimentally determined value of $2.3 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$. This yields a glucose to glutamate conversion of 68% (w/w). Theoretical CO_2 production rate was calculated to be $2.4 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ in relation with the $4 \text{ mmole/gDCW.h}^{-1}$ experimentally determined.

Time variations of intracellular fluxes

The flux distributions through the central pathway of *Corynebacterium glutamicum*, which were illustrated at three fermentation times, can be calculated during the whole fermentation using the determined specific rates of growth and glutamate excretion determined in figure 3. It is thus possible to evaluate the time variation the metabolic flux at a given point in the metabolic pathway. Figure 9 indicates the time variation of the calculated flux repartition at the G6P and PEP nodes. At the former, the split ratio towards the PPP cycle is the highest during the fast growth phase (a 40% PPP participation), then diminishes with decreasing growth rate and increasing glutamate production rate. This result is in agreement with recent NMR measurements showing a decrease of the pentoses

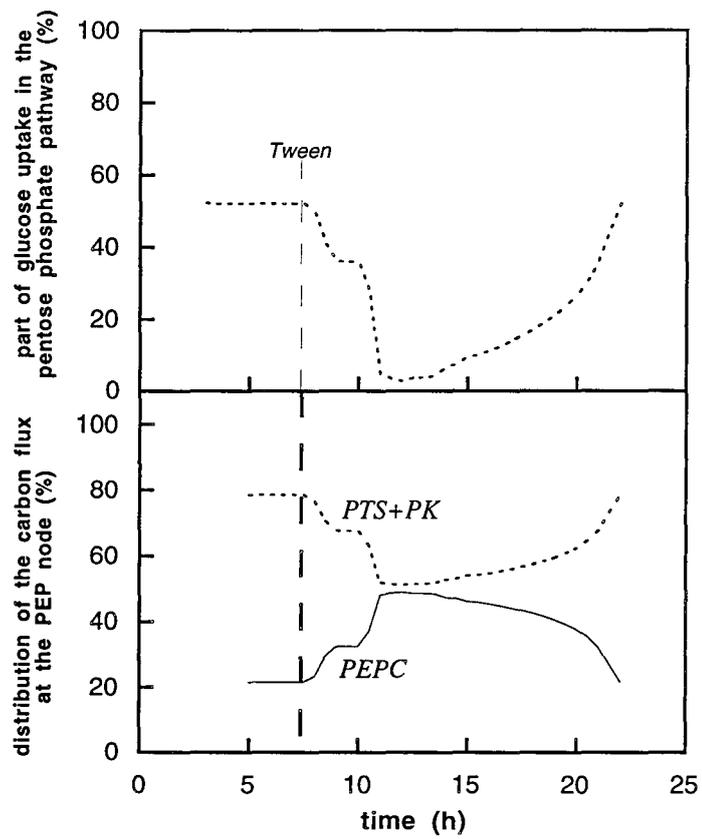


Figure 9 : Distribution of the carbon flux at the G6P and PEP nodes of the biochemical network during the fermentation.

phosphate pathway participation from 40 % during the growth of *Corynebacterium glutamicum* in batch culture on glucose to 17 % during glutamate production². At the PEP node, the split ratio towards pyruvate by both PTS and pyruvate kinase simultaneously decreases during the fed-batch fermentation from 80% to 50%, showing an increasing participation of anaplerotic pathways for glutamate production.

Interesting information is also obtained when comparing in figure 10 the time variation of the carbon fluxes at different points in the pathway leading from glucose to glutamate. For many of the metabolic steps, for instance at G6P to F6P, GAP to PEP or PEP to Pyr, the calculated fluxes show a time variation similar to that of the specific glucose uptake rate. They are the highest during the initial rapid growth phase, then decrease during glutamate production. Accordingly these steps are not likely to be limiting the specific rate of glutamate production, since they can carry higher fluxes during fast *Corynebacteria* growth. A major exception is the anaplerotic flux through the anaplerotic PEP carboxylase reaction, which carries a relatively constant flux of 2.5 mmol/gDCW.h⁻¹ during most of the fermentation. The anaplerotic reaction may thus be rate limiting for a high production rate of glutamate. An additional step that may act as a bottleneck is the excretion of glutamate which results from the permeabilizing effect of Tween¹⁰. Glutamate excretion rate rapidly increases after the surfactant addition, remains essentially constant during 7 hours, and finally decreases.

The flux analysis results of this study are based on a biochemical reaction network with PEPC as the single anaplerotic pathway. PEPC has indeed been identified as a major enzyme for fueling carbon precursors in the TCA cycle. Recently, the activities of other enzymes responsible for anaplerotic pathways, namely malic enzyme, pyruvate carboxylating enzyme, have been detected in *Corynebacteria* growing on glucose. A back flux from OA to PEP/Pyr was also identified during the growth of *Corynebacterium glutamicum* and the glutamate production induced by biotin limitations, which may be attributed to PEP carboxykinase like reactions^{2,5}. If future biochemical analysis confirm the presence at significant levels of additional anaplerotic enzymes, the flux evaluation procedure will have to be adapted to the modified reaction networks. This may result in different fluxes either through the competing anaplerotic reactions or through the PPP cycle. For instance, with an operative malic enzyme which consumes NADPH, a higher participation of the PPP cycle is expected.

Conclusion

This study was aimed at the evaluation of flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* under fermentation conditions leading to a high level of excreted glutamate. From the measured fed-batch fermentation kinetics, the time variations of the intracellular fluxes through the central metabolism were evaluated, assuming a reaction network with PEPC as the anaplerotic reaction. During the initial rapid growth phase, there is an important participation of the PPP cycle to meet the

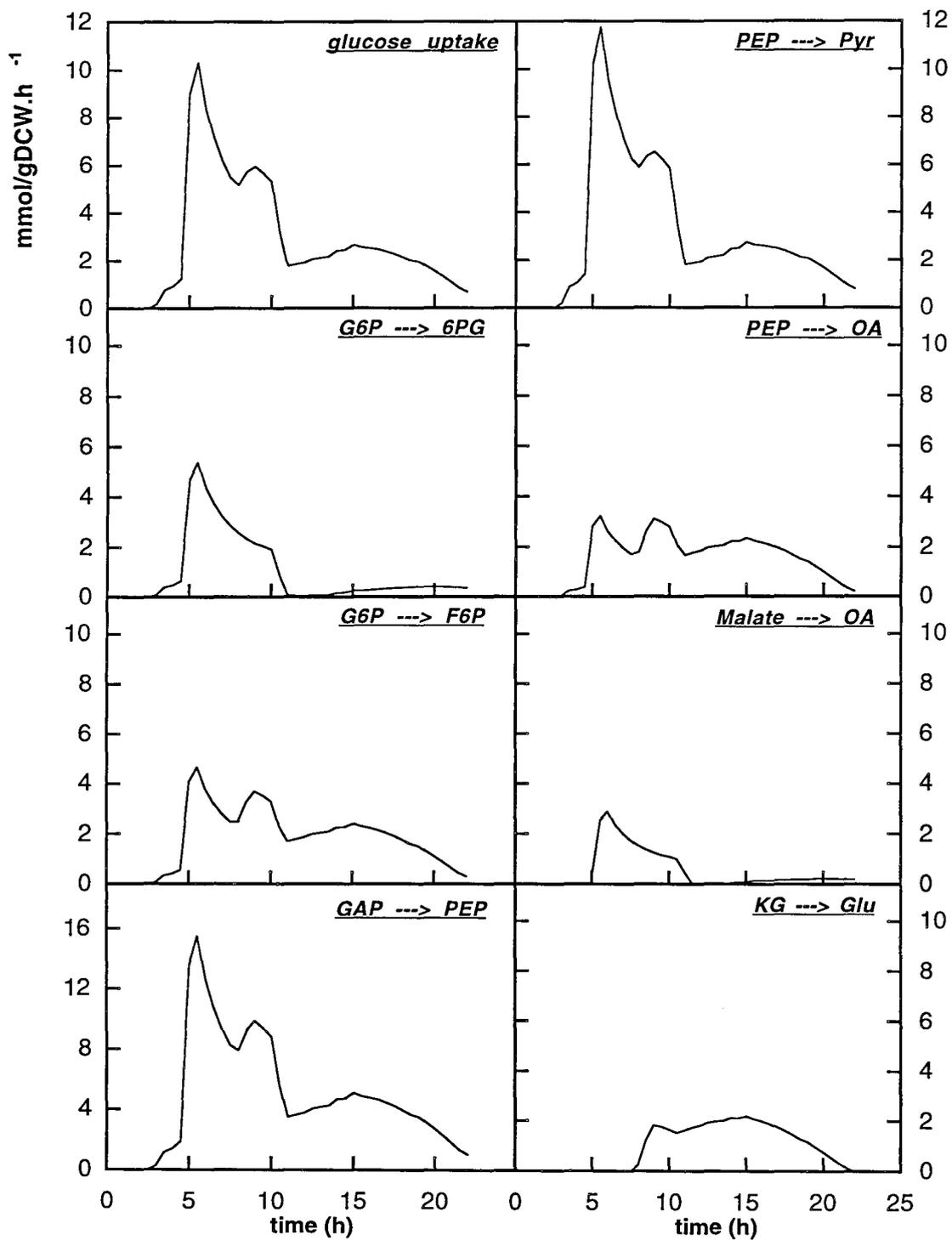


Figure 10 : Evolution of different key fluxes during the fermentation course.

high requirement of biomass synthesis for NADPH. Addition of Tween to a rapidly growing culture induced a permeabilization of the membrane and a rapid excretion of glutamate up to a final 80 g/l. It also resulted in an important reorientation of the flux distribution through the central metabolism with a reduced participation of the PPP cycle, but a higher shift ratio towards the anaplerotic reaction at the PEP node.

Additional conclusions on the regulation of the cell metabolism can be drawn from the calculated time variations of the intracellular fluxes at different points in metabolic pathways. During the rapid growth phase, all intracellular fluxes are at their highest values. The rate of *Corynebacteria* metabolism may then be limited by several of the steps of the reaction network, namely the transport of glucose, the glycolysis, the PPP cycle, the anaplerotic reaction or the TCA cycle. During reduced growth rate and rapid glutamate excretion, whereas the fluxes through most of the steps decrease together with the the flux of transported glucose, the rate of the PEPC anaplerotic reaction remains at the same level than during rapid cell growth. This may suggest a dominant limiting effect of the anaplerotic reaction on the rate of glutamate production. An additional step capable of limiting the glutamate productivity is the glutamate secretion through the membrane. Eventhough the membrane permeability towards glutamate has been considerably enhanced by the addition of an adequate level of surfactant, the amino acid efflux may still represent a bottleneck when compared to the possible rate of glutamate synthesis. Additional biochemical and flux analysis studies are required to more precisely elucidate the respective role of the anaplerotic pathways and membrane transport in controlling the rate of glutamate production in high producing *Corynebacteria* strains.

References :

- (1) Rollin C., Morgan V., Guyonvarch A., Guerquin-Kern J.L., “¹³C NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways.”, *Eur. J. Biochem.*, 1995, 227, 488-493.
- (2) Sonntag K., Schwinde J., A. de Graaf A., Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W. and Sahm H., “¹³C-NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures.”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 44, 489-495.
- (3) Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A. and Lindley N.D., “Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*.”, *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62.
- (4) Vallino J.J., Stephanopoulos Gr., Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and Lysine overproduction, *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 41, 633-646.
- (5) Marx A., A. de Graaf A., Wiechert W., Eggeling L., Sahm H., “Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing.”, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49, 111-129.
- (6) Vallino J. J. and Stephanopoulos G., "Flux determination in cellular bioreaction networks : application to lysine fermentations.", in "Frontiers in Bioprocessing", S.K. Sikdar, M. Bier, P. Todd eds. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990, pp 205.
- (7) Kuehm N., Simon J.L., Fonteix C. and Engasser J.M., “A new method for cellular flux analysis based on the concept of individual metabolic maps for metabolites and biomass production“, in preparation.

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

(9) Ingraham J.L., Maaloe O. and Neidhardt F. *Corynebacterium*, In : Growth of the bacterial cell, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1983, pp

(10) Duperray F., Jezequel D., Ghazi A., Letellier L., Shechter E., "Excretion of Glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants", Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 1103, 250-258.

VI.3. Discussion

La discussion des résultats obtenus nécessite tout d'abord de rappeler les hypothèses fondamentales de la méthode d'évaluation des flux :

- le calcul est basé sur la méthode des bilans matière, avec comme données, les vitesses macroscopiques de production des métabolites. Ceci nous a conduit à définir les pseudo-excrétions des composés accumulés intracellulairement lors de l'étude de la croissance en milieu hyperosmotique (cultures discontinues),
- les voies de biosynthèse des métabolites sont considérées indépendantes les unes des autres,
- l'entrée du glucose se fait majoritairement par le système PTS, mais une participation des perméases n'est pas exclue,
- les voies anapérotiques de la zone "PEP-Pyr-OA" sont regroupées en une seule réaction catalysée par la PEP Carboxylase.

D'une manière générale, Métaflux permet de visualiser la réorganisation du flux lors de changements physiologiques, (quantification des flux, évaluation de la répartition du flux aux nœuds du réseau). Il permet en outre l'évaluation de la vitesse spécifique de consommation du glucose et de production de CO₂, qui pourront être comparées aux données expérimentales pour s'assurer de la consistance du système.

Deux observations générales ressortent des résultats : une bonne adéquation entre les valeurs expérimentales et celles prédites par le modèle, aussi bien pour les vitesses spécifiques que pour les répartitions aux nœuds (ce dernier point a été présenté en synthèse bibliographique et lors des projets de publication), et une synthèse d'ATP non limitante quelle que soit la culture considérée, puisqu'il y a toujours une dissipation d'ATP. On notera cependant que l'approche des voies individuelles surestime la synthèse d'ATP, et donc sa dissipation.

Lors de la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en cultures discontinues, nous avons recours à la méthode des pseudo-excrétions pour prendre en compte le glutamate et la proline. Cette méthode met en évidence une réorganisation temporaire du flux carboné immédiatement après le choc osmotique et permet de simuler l'effet de l'augmentation de l'osmolarité du milieu. La biomasse représente ensuite le composé très largement majoritaire, et les évaluations de flux conduisent en fait à étudier la synthèse de la biomasse. Dans ce cadre, nous montrons que la voie des pentoses, c'est à dire la production de NADPH, n'est pas limitante avec un flux d'entrée représentant la moitié du flux de glucose (%PPP=40). De même, la répartition au nœud PEP est largement en faveur de la fin de la glycolyse avec 78% contre 22% pour la PEP Carboxylase. Ces données laissent supposer une activité très faible de la Pyruvate kinase, puisque le flux du PEP vers le pyruvate est de l'ordre de grandeur de celui du système PTS.

Concernant l'exemple de la production de lysine en culture discontinue (présenté dans le projet proposition de publication du chapitre V) nous mettons en évidence une limitation de la production de lysine par le NADPH, puisque le %PPP augmente de 40 à 66%, nécessitant plusieurs tours de la voie des pentoses (flux G6P ---> F6P négatif). Cette augmentation de la participation de la voie des pentoses a d'ailleurs été constatée expérimentalement par RMN par Sonntag et coll. (1995). D'autre part, la répartition au nœud PEP passe de 75/25 en croissance à 50/50 en synthèse de lysine, en faveur de la PEP Carboxylase. Il est important de regarder ces répartitions avec soin, puisque les 25% de la phase de croissance représentent un flux carboné de 1,7 mmol/gMS.h⁻¹, alors que le 50% de la phase de production n'en valent que 0,9 mmol/gMS.h⁻¹. Il n'y a donc pas réellement d'augmentation de l'activité de la voie anaplérotique. La représentation des flux sous forme de cinétiques montre des valeurs élevées à chaque étape du réseau, ne permettant pas de suggérer d'éventuelles limitations métaboliques.

Dans les procédés de production de glutamate en cultures semi-continues, nous n'avons plus besoin d'utiliser la notion de pseudo-excrétion, la biomasse et le glutamate étant cette fois deux variables macroscopiques. Nos résultats en phase de production montrent une forte diminution de la participation de la voie des pentoses (40 à 3%). Cette diminution a également été constatée par Sonntag et coll. (1995), mais dans une moindre mesure (40 à 17%). Les travaux Coccagn-Bousquet et coll. (1996) fournissent une explication qui laisse supposer que les deux résultats sont en fait cohérents. Ces derniers auteurs ont mesuré en cultures continues les activités des voies anaplérotiques du système "PEP-Pyr-OA". Ils proposent une utilisation séquentielle de différentes enzymes en fonction de la vitesse de croissance : d'abord la PEP Carboxylase ($\mu \leq 0,1 \text{ h}^{-1}$), puis l'enzyme malique (μ compris entre 0,2 et 0,33 h⁻¹), et enfin une enzyme de type OA Décarboxylase ($\mu > 0,33 \text{ h}^{-1}$). Conformément à ces données, la vitesse spécifique de croissance observée en phase de production de glutamate dans notre culture ne nous permet pas d'exclure une activité de l'enzyme malique, alors que

nous n'en tenons pas compte dans Métaflux. Or cette enzyme consomme du NADPH, réclamant un surplus de voie des pentoses, ce qui pourrait expliquer la différence entre les 17% de la RMN et notre évaluation à 3%.

La répartition au PEP subit également une réorganisation entre croissance et production, passant de 78/22 à 50/50 en faveur de la PEP Carboxylase. La situation est différente du cas précédent puisqu'ici le flux dans la voie anaplérotique est constant entre les deux phases, et c'est le flux via le "PTS+PK" qui diminue. On peut alors supposer que le flux des voies anaplérotiques est une étape limitante de la production de glutamate. Peters-Wendisch et coll. (1993) ont montré que la PEP Carboxylase n'était pas indispensable à la croissance ou à la production de lysine, efficacement remplacée par une autre enzyme anaplérotique. Ceci n'est pas en contradiction avec le fait que les voies anaplérotiques soient limitantes dans leur ensemble, mais montre que la PEP Carboxylase ne l'est pas.

Enfin, d'après nos études, le nœud PEP pourrait être qualifié de faiblement rigide, puisqu'une seule de ces branches (PEP ---> Pyr) peut s'adapter aux variations de flux, alors que Vallino et Stephanopoulos (1994b) qualifient ce même nœud de fortement rigide lors de la production de lysine. Or les caractéristiques d'un réseau biochimique sont différentes d'une souche à l'autre, et d'un métabolisme à l'autre, et ce qui est valable pour la production de lysine ne l'est pas forcément pour celle de glutamate.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons développé une méthode originale de modélisation métabolique pour les Corynébactéries cultivées sur glucose. Cette méthode a été appliquée à l'évaluation des flux métaboliques lors de la croissance en culture discontinue à différentes osmolarités et à la production de glutamate en procédé semi-continu. Nous avons consacré la majeure partie de nos recherches à l'étude et à la mise au point de cet outil d'analyse métabolique (modélisation et procédures annexes) de manière à en faciliter la compréhension et l'utilisation.

Les principaux résultats que nous avons obtenus se répartissent en trois catégories : cinétiques macroscopiques, méthodologie de modélisation métabolique et analyse des flux métaboliques.

■ cinétiques macroscopiques :

En présence d'un choc osmotique d'amplitude croissante (1,5 Osm, 2,2 Osm, 2,7 Osm et 3,0 Osm), l'étude de la croissance en cultures discontinues conduit à des résultats en accord avec les études précédentes, soit

- une diminution d'un facteur 10 de la vitesse spécifique de croissance entre la pression osmotique normale et la culture à 3,0 Osm,
- une diminution de 30% du rendement de synthèse de biomasse par rapport au glucose,
- une augmentation du niveau intracellulaire en proline, qui passe de 50 à 2000 $\mu\text{mol/gMS}$
- au delà de 2 Osm, le glutamate intracellulaire montre un pic préalable à l'augmentation de proline.

Des précisions supplémentaires ont pu être apportées grâce à la mesure du CO_2 expiré. Le coefficient de production du CO_2 par la biomasse augmente fortement de 0,6 g/gMS à 1,1 g/gMS lorsqu'on passe de 0,5 à 1,5 Osm. La part du CO_2 dans le bilan carboné se trouve ainsi presque doublée (de 33 à 56%).

Ces observations permettent de conclure que la résistance à l'hyperosmolarité passe par une réorientation de l'utilisation du substrat carboné au détriment de la biomasse et au profit de la synthèse de proline et de CO_2 .

Une modélisation cinétique utilisant une production de proline associée à la croissance suffit à reproduire les résultats expérimentaux. Cependant, des améliorations sont encore à apporter pour simuler correctement la synthèse de proline en fin de culture. Cette modélisation cinétique nous a conduit à développer la procédure de détermination du domaine de validité d'un modèle, également capable de quantifier la cohérence entre l'expérience et le modèle et de rechercher une nouvelle expérience pour renforcer le modèle.

■ méthodologie de modélisation métabolique :

L'algorithme que nous avons choisi repose sur la méthode des bilans matière. Le problème d'évaluation de la répartition du flux aux nœuds du réseau biochimique a été résolu par une méthode originale d'analyse des voies de biosynthèse de chaque métabolite (sur la base des travaux de Simon, 1986). Nous introduisons le concept de voie individuelle de biosynthèse d'un métabolite donné et de régénération des composés consommés, qui conduisent au calcul de la répartition et à l'évaluation du flux carboné pour ce métabolite. Le métabolisme général est rétabli en additionnant les voies et les flux relatifs à chaque métabolite détecté dans le milieu de culture.

Les hypothèses indispensables sont de deux types : celles liées à la connaissance de la biochimie des Corynébactéries et celles liées à la méthode.

- L'entrée du glucose dans la cellule se fait majoritairement par le système PTS, mais une participation de perméases est également prévue. Bien que leur existence réelle n'aie pas encore été clairement démontrée, ce choix s'appuie sur des résultats récents remettant en cause la suprématie du PTS et suggérant l'existence d'autres modes de transport. Une conséquence immédiate de cette hypothèse est que le flux PEP \rightarrow Pyr n'est plus strictement corrélé à celui de l'entrée du sucre dans la cellule, il pourra être inférieur ce qui n'est pas possible dans le cas du "tout PTS".

- Les voies anaplérotiques du système "PEP-Pyr-OA" sont regroupées en une seule réaction catalysée par la PEP Carboxylase. Cette hypothèse repose sur les données de la littérature montrant sans ambiguïté l'existence de cette enzyme, alors que la polémique reste toujours d'actualité quant à l'existence *in vivo* des autres voies anaplérotiques. Il est important de bien conserver cette hypothèse dans les esprits car si ces différentes voies ne sont pas distinguables par RMN ou par modélisation mathématique, elles ne présentent pourtant pas la même biochimie, ce qui peut se reporter fortement sur l'évaluation des flux. En particulier, l'enzyme malique consomme du NADPH et influence ainsi la voie des pentoses.

- Le calcul est basé sur la méthode des bilans matière, avec l'indispensable corollaire d'état pseudo-stationnaire pour les métabolites intracellulaires intermédiaires. Les données sont représentées par les vitesses macroscopiques de production des métabolites, ce qui nous a conduit à définir les pseudo-excrétions des composés accumulés intracellulairement.

- Les voies métaboliques sont considérées indépendantes les unes des autres et utilisent des voies de régénération pour se procurer les intermédiaires et autres cofacteurs requis.
- La biomasse est synthétisée à partir de précurseurs issus du métabolisme central (méthode "Ingraham"), dont les besoins ont été adaptés aux Corynébactéries.

Les facteurs influençant la méthode d'évaluation des flux se résument en fait à la biochimie de la souche considérée, car c'est elle qui définit les voies individuelles, les règles de régénération et les stœchiométries. La composition de la biomasse est aussi un facteur important, qui intervient en modifiant les fuites en précurseurs au niveau du métabolisme central.

Nous avons développé **deux procédures annexes**. L'une permet de faciliter la construction des voies individuelles grâce à une procédure automatique standardisée, qui permet de rajouter facilement de nouveaux métabolites dans la procédure. Cette procédure a également été développée pour permettre, à terme, la communication entre Métaflux et des logiciels ou des bases de données d'analyse qualitative du métabolisme telle que Metalgen.db.

La seconde procédure est une analyse de sensibilité des calculs aux données. Elle peut déterminer l'effet d'une variation de la vitesse de production d'un métabolite donné sur le calcul de la consommation du glucose, sur la répartition du flux aux nœuds du réseau, ou encore sur l'évaluation d'un flux particulier.

Enfin, **la comparaison avec Bionet** montre que les deux méthodes conduisent globalement à des résultats comparables, avec des spécificités locales. Nous rappellerons par exemple une différence de composition de la biomasse (Bionet travaille avec *E. coli* et Métaflux avec *C. glutamicum*), d'évaluation de certains flux (nets ou bruts, comme KG ----> Glu), de dissipation d'ATP ou encore de production de CO₂.

■ application de Métaflux :

Dans l'ensemble, les résultats théoriques proposés par Métaflux (vitesse de consommation du glucose, vitesse de production du CO₂ et répartition du flux aux nœuds du réseau) sont en accord avec les cinétiques expérimentales et les mesures par RMN. L'exploitation de ces résultats peut se faire sous la forme de cartes de flux, qui permettent de visualiser la répartition du flux carboné dans le réseau et d'apprécier l'importance relative des différentes voies, ou sous la forme de cinétiques de flux, qui permettent d'observer la variation dans le temps du flux au niveau d'une étape donnée, de déterminer la valeur et le moment du flux maximum requis et d'en déduire les risques de limitation métabolique. Une autre observation générale est que l'ATP ne semble pas limitant, ni en croissance, ni en production, puisqu'on obtient toujours une (forte) dissipation. Rappelons que la procédure de voie indépendantes surestime la production d'ATP (et donc sa

dissipation) puisqu'il ne peut pas être cédé aux étapes consommatrices, telle que la synthèse de la biomasse par exemple.

Nous avons testé l'influence d'un échange possible de NADPH et d'ATP entre les voies lors de la synthèse de biomasse de manière à obtenir une dissipation globale nulle en ATP. Cette variante ne modifie pas les besoins en autres précurseurs, mais conduit à une diminution de la consommation du glucose ($Y_{S/X}$) et du coefficient de production de gaz carbonique ($Y_{CO_2/X}$). On observe également une réorganisation de la distribution du flux carboné, avec une augmentation de la participation de la voie des pentoses qui passe de 50 à 60%, et une répartition au nœud PEP qui passe de 80/20 à 75/25 (PK+PTS/PC).

Dans le cas de la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en culture discontinue, les études de flux reviennent en fait à la synthèse de biomasse et montrent l'influence de sa composition macromoléculaire. La méthode des pseudo excréctions permet de simuler les effets de l'augmentation de l'osmolarité du milieu décrits précédemment, à l'exception de l'augmentation de la production de gaz carbonique. Ceci nous amène à proposer que ce phénomène soit dû à des réactions d'oxydation complète du glucose en CO_2 et H_2O , qui ne sont pas prises en compte dans Métaflux et qui prendraient une forte importance aux pressions osmotiques élevées. Or cela entraînerait une augmentation de la consommation calculée du glucose, qui ne correspondrait plus alors à celle mesurée expérimentalement. Ce point particulier de la production de CO_2 nécessite donc des investigations supplémentaires.

Nous avons par ailleurs écrit une procédure matricielle qui permet le calcul des besoins en précurseurs en fonction de la composition macromoléculaire de la cellule. Cette procédure a été utilisée pour adapter les valeurs d'*Echerichia coli* aux Corynébactéries. On observe des variations significatives essentiellement dues à la différence de structure de l'enveloppe cellulaire. Les conséquences sur le calcul des flux sont qualitatives, c'est à dire qu'elles entraînent une distribution différente des "fuites carbonées" au niveau des voies du métabolisme central. Nous avons d'autre part montré expérimentalement des variations de la composition élémentaire de la cellule. Si elle reflète en réalité une variation de composition macromoléculaire, cette dernière n'est pas quantifiable à partir d'une simple mesure CHON. La variation de la composition élémentaire aura donc pour seule conséquence la modification des coefficients de production de biomasse par rapport au substrat et de production de CO_2 par rapport à la biomasse, mais en aucun cas une réorganisation des "fuites" de précurseurs. Cette conséquence quantitative n'est cependant pas négligeable puisqu'elle permet de mieux refléter les données expérimentales.

Les cultures semi-continues pour la production de glutamate apportent des informations sur le passage de la phase de croissance à la phase de production, en indiquant la nature et l'importance des voies réactionnelles requises pour l'une ou l'autre des deux phases : en croissance, la voie des pentoses et la glycolyse sont prépondérantes (au nœud G6P et PEP respectivement), cédant la place à la glycolyse et aux voies anaplérotiques lors de la production.

Nous avons en particulier mis en évidence une forte chute de la participation de la voie des pentoses lors de la production de glutamate, de 40% à 3%. Nous avons vu que cette diminution avait également été observée par ailleurs (de 40 à 17%), et qu'elle pouvait s'expliquer par une diminution du besoin en NADPH lors de la synthèse de glutamate. Il est cependant très probable que notre valeur de 3% soit sous-estimée car nous ne considérons pas l'activité de l'enzyme malique alors qu'elle semble présente. Cette enzyme est consommatrice de NADPH, ce qui a pour conséquence d'augmenter donc la part de voie des pentoses.

D'autre part, la représentation des flux au nœud G6P sous forme de cinétique permet d'observer que tous ces flux varient en fonction du flux d'entrée et indépendamment les uns des autres. Ceci laisse penser que le nœud G6P est flexible comme le concluent Vallino et Stephanopoulos (1994b). La situation est identique au nœud PEP, sauf pour le flux de la PEP Carboxylase qui est constant. Ceci suggère que le nœud PEP est rigide, et qu'il peut ainsi constituer une étape limitante du métabolisme central. Ce type de représentation permet ainsi de montrer que la PEP Carboxylase ou la synthèse de glutamate (au niveau de la GDH ou de l'excrétion) sont des cibles de choix pour lever d'éventuelles limitations du flux carboné et tenter d'accroître la production de cet acide aminé.

Métaflux constitue ainsi un outil prospectif mais fonctionnel de modélisation métabolique, permettant de quantifier les flux carbonés et de localiser les étranglements métaboliques dans le but de faciliter l'amélioration des souches.

Les perspectives à ces recherches sont nombreuses pour faire de Métaflux l'outil d'analyse métabolique idéal. Il faudrait tout d'abord **multiplier les exemples d'application** afin de cerner les potentialités exactes de Métaflux.

Il serait aussi nécessaire d'étudier le problème de la **prise en compte simultanée de réactions ou voies concurrentes**. L'exemple le plus crucial est celui des voies anaplérotiques du système "PEP-Pyr-OA". On a vu que ces voies ne sont pas distinguables par RMN et par le calcul mathématiques. Cependant elles existent et présentent une biochimie différente, influençant le calcul des flux dans l'ensemble du réseau (exemple de l'enzyme malique). Il paraît donc indispensable d'intégrer ces données. Un autre exemple est constitué par les variantes de la voie de synthèse du glutamate ou de la lysine. La part d'utilisation de ces variantes est maintenant connue ou en cours d'étude, et il suffirait (par exemple) de réaliser l'analyse individuelle de chacune de ces

voies puis de leur affecter un coefficient de pondération défini *a priori* ou dépendant des conditions intracellulaires et/ou environnementales.

Dans le même registre, on pourrait envisager d'introduire un certain nombre d'informations de cinétiques enzymatiques de manière à **prendre en compte les régulations du réseau biochimique** et à appliquer la théorie du contrôle métabolique. Cet objectif ultime de la modélisation métabolique me semble utopique compte tenu de nos connaissances actuelles, trop diverses et souvent trop imprécises. Une solution pourrait être de considérer les cinétiques enzymatiques sous la forme de règles floues avec un formalisme de type "Si <cause> Alors <effet>", plus souple que les équations mathématiques traditionnelles.

Il paraît également important d'étudier une méthode pour **simuler une modification du réseau biochimique** : délétion, amplification d'une réaction... La structure actuelle nécessite de recommencer toutes les analyses des voies individuelles de biosynthèse en tenant compte de cette modification. Il faudrait imaginer un système évitant ce travail fastidieux. Une solution détournée pourrait être d'utiliser les outils de modélisation qualitative des voies métaboliques, tel que Métalgen.db par exemple. Ce logiciel est capable de rechercher sous contraintes les voies de biosynthèse d'un métabolite, c'est à dire en évitant une réaction donnée, ce qui simule une délétion. Il peut en outre fournir le bilan stœchiométrique et la liste des composés intermédiairement consommés et produits. La procédure d'analyse automatique de voies métaboliques que nous avons développer peut ensuite prendre le relais et permettre une modification facile et rapide de Métaflux adapté à ce nouveau réseau biochimique.

La relation avec de telles bases de données pourra présenter d'autres avantages, mais cette fois en aval de Métaflux. Lorsqu'une limitation est mise en évidence par Métaflux, l'information peut être transmise à Métalgen.db qui peut alors se charger proposer la cible d'une éventuelle modification, en tous cas de fournir toutes les données relatives à cette étape limitante (enzyme, déterminisme génétique, régulations...).

Au travers de ces travaux, nous avons constaté que l'ingénierie métabolique apparaît comme une voie de recherche prometteuse, grâce à son approche globale du métabolisme se rapprochant plus de la réalité physiologique que les études enzymatiques isolées. Elle s'adresse aujourd'hui aussi bien aux Procaryotes qu'aux Eucaryotes, et a déjà conduit à des résultats intéressants quant à la localisation des étapes biochimiques limitantes. Mais comme le mentionnait Stephanopoulos, le développement de l'ingénierie métabolique ne peut se faire sans l'appui des techniques "classiques", et uniquement par la multiplication et l'intégration des outils et des techniques d'analyse du métabolisme cellulaire. C'est dans cet esprit qu'a été conçu Bionet et dans lequel nous avons essayé d'inscrire Métaflux.

Annexes

Annexe 1 : Publication acceptée à paraître dans le journal
Automatique, Productique et Informatique Industrielle.

Détermination de la validité d'une prédiction d'état par plans d'expériences dynamiques flous.

Fuzzy dynamic experimental sets for the determining of
the validity of a state estimation.

Nicolas Kuehm ¹, Christian Fonteix ¹, Ivan Marc ²

¹ *Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - UPR CNRS 6811
ENSAIA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172,
54505 VANDŒUVRE les Nancy - CEDEX*

² *Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - UPR CNRS 6811
ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 NANCY - CEDEX.*

RESUME : Une nouvelle méthodologie générale de détermination du domaine expérimental couvert par une expérience dynamique, et, par suite, du domaine de validité d'un modèle est proposée. Elle est plus particulièrement destinée aux procédés non stationnaires et non linéaires. Un développement possible est la recherche d'une nouvelle expérience complétant au mieux les données existantes. La méthode repose sur les techniques de plans d'expériences classiques, sur la théorie des sous-ensembles flous et sur la théorie des possibilités. La technique requiert simplement un ensemble de résultats expérimentaux et un minimum de connaissances fondamentales sur le phénomène étudié. Une transformation floue des données permet le calcul du degré de réalisation de chaque expérience d'un plan d'expériences de référence, indiquant ainsi le degré de couverture de chaque zone de l'espace d'état par l'expérience dynamique ou la validité du modèle en chacun de ces points. Cette représentation floue sert ensuite à caractériser la validité de toute prédiction intervenant lors d'une synthèse de commande, d'une estimation d'état ou d'une décision utilisant le modèle. Les exemples présentés montrent l'efficacité et l'utilité de la méthode, en précisant l'influence de l'expertise.

ABSTRACT : We have developed a general and new methodology based on classical experimental design and fuzzy sets for determining the experiment validity field of a dynamic experiment or a model, particularly for unsteady or non-linear processes. The main applications could be the evaluation of the validity of a state estimated by a model and the determination of a new experiment. This methodology requires only a set of experimental data and a minimum amount of information about the process. The conversion of data using fuzzy sets leads to the determination of a degree of realisation of each experiment of the reference experimental design, thus evaluating the experimental field of these data. The given examples demonstrate the efficiency of the method and the importance of human expertise.

MOTS CLÉS : procédés non stationnaires et non linéaires - logique floue - plan d'expériences - domaine de validité d'un modèle - prédiction d'état.

KEY WORDS : unsteady and non linear processes - fuzzy sets - experimental design - model validity - state estimated.

1. Introduction.

La plupart des procédés industriels doivent aujourd'hui répondre à des besoins d'automatisation pour être compétitifs. Si certains, purement mécaniques, s'y prêtent facilement, d'autres, reposant sur des phénomènes évolutifs, posent d'importants problèmes. En particulier, les procédés biotechnologiques, qui mettent en œuvre des cellules vivantes, sont complexes, instables et parfois assez peu reproductibles. L'automatisation de tels procédés fait de plus en plus appel à des modèles de connaissance [ALB 93, AND 93, BAS 90]. Ils sont utilisés pour représenter, simuler et prédire le comportement des cellules vivantes dans un environnement donné [BEL 91]. De plus, ces modèles permettent de synthétiser des commandes non linéaires et de piloter des procédés [ABI 93].

La construction d'un modèle de connaissance constitue un point crucial dans le développement d'un procédé biotechnologique. Outre le manque de connaissances fondamentales qui entraîne une simplification des phénomènes biologiques, les étapes successives de recherche des phénomènes limitants, d'établissement des équations mathématiques, d'identification des paramètres de relations non linéaires, de validation et de détermination du domaine de validité du modèle sont autant de points délicats à réaliser. Les techniques utilisées reposent toujours sur l'expérimentation, mais sont souvent complétées par une grande part d'empirisme. Cependant, de nouveaux outils de modélisation automatique [FAR 91, GAR 93] ou d'identification paramétrique [PER 93] sont aujourd'hui proposés. L'étape de validation, qui consiste à vérifier que les prédictions d'un modèle suivent bien les données expérimentales, s'effectue par vérification de tests statistiques ou réalisation d'expériences complémentaires. Mais aucune méthodologie n'est encore vraiment adaptée à la détermination de la validité d'un modèle. Un modèle est généralement construit à partir d'un nombre limité d'expériences puis extrapolé. Il peut donc être localement erroné, ce qui implique des erreurs de prédiction et de commande qui risquent d'être fatales pour le procédé en cours. Déterminer la validité a pour but de délimiter le domaine expérimental pour lequel le modèle est réellement applicable.

La méthode proposée a pour objectif de déterminer facilement ce domaine de validité, qui dépend des données expérimentales utilisées pour la construction d'un modèle. Elle repose sur les techniques de plans d'expériences [DIA 89], la théorie des sous-ensembles flous [ZAD 65] et la théorie des possibilités [DUB 87]. Le principe de base consiste à comparer les données dynamiques utilisées pour construire le modèle avec un plan d'expérience théorique qui décrit l'espace expérimental. La théorie des sous-ensembles flous est, par ailleurs, déjà utilisée en génie des procédés, aussi bien en modélisation [JIT 92], en commande [NYT 92, MAH 94] ou en estimation d'état [SIM 92], mais trouve ici une nouvelle application. Le domaine de validité peut ensuite servir à évaluer le degré de validité d'une prédiction d'état faite par le modèle.

2. Développement théorique.

2.1. Intérêt de deux représentations floues.

L'objectif est ici de représenter le domaine de validité d'un modèle par un sous-ensemble flou d'un ensemble de référence. Si l'ensemble de référence est l'espace d'état, le degré local de validité du modèle est donné par une hypersurface. Cette représentation spatiale est nécessaire lors du calcul de la validité d'une prédiction par le modèle. Elle est précise et fine, mais difficile à stocker pour une utilisation ultérieure. Par ailleurs, sa finesse peut être illusoire, car sa précision réelle dépend de la quantité d'information qui a permis de la construire. Il est donc intéressant de pouvoir disposer d'une représentation plus compacte, adaptée à la quantité d'information initiale et à un stockage éventuel. Cette représentation compacte pourra être transformée en forme spatiale lors de certaines utilisations. Si l'ensemble de référence est un plan d'expériences, le domaine de validité du modèle est représenté par un nombre fini de valeurs. Il s'agit d'une représentation floue compacte sous la forme d'une image facile à stocker. La définition de l'image dépend du nombre de

qualificatifs employés pour chaque élément du vecteur d'état. Plus leur nombre est grand, plus le grain de l'image est fin, et plus celle-ci est précise. Mais dans ce cas, la quantité d'information initiale doit être grande. Par ailleurs, la signification physique de cette image est évidente pour l'expert, et cette représentation du domaine de validité du modèle est directement utilisable, pour définir une expérience complémentaire à réaliser, par exemple.

2.2. Représentation compacte du domaine de validité d'un modèle.

2.2.1. Plan d'expériences de référence et expériences réelles.

Un plan d'expériences de référence E est formé de n expériences de référence E_i. Une expérience de référence E_i est un ensemble de m qualificatifs Q_{ij}, correspondant chacun à un composant C_j de l'ensemble C des m composants caractérisant l'état du système. Chaque composant C_j a une concentration x_j pouvant varier dans le domaine expérimental D_j. Chaque qualificatif Q_{ij} est caractérisé par une représentation floue F_{ij} dans le domaine D_j, soit :

$$F_{ij} = \int_{x_j \in D_j} \mu_{Q_{ij}}/x_j \quad [1]$$

Les expériences réellement réalisées forment un ensemble P de h points expérimentaux P_k dans l'espace d'état. P_k peut être la k^{ième} expérience statique ou la mesure à l'instant t_k d'une expérience dynamique. Chaque expérience P_k est un ensemble de mesures de chaque constituant C_j. Chaque mesure pouvant être bruitée, on la représentera par un sous-ensemble flou M_{jk} de D_j (relation [2]), incluant aussi la confiance accordée aux mesures (hauteur pouvant être inférieure à 1). Un modèle est alors élaboré à l'aide de l'ensemble P de toutes les données expérimentales. Son incertitude acceptable étant définie, la simulation de P_k est représentée par un sous-ensemble flou S_{jk} de D_j, pour chaque constituant C_j (relation [3]).

$$M_{jk} = \int_{x_j \in D_j} \mu_{M_{jk}}/x_j \quad [2]$$

$$S_{jk} = \int_{x_j \in D_j} \mu_{S_{jk}}/x_j \quad [3]$$

2.2.2. Réalisation du plan d'expériences par les expériences réelles.

La représentation cherchée est le sous-ensemble flou R de E qui représente une réalisation de E par l'ensemble P des points expérimentaux, où r_i est le degré de réalisation de E_i par P. Or, P est un ensemble de points expérimentaux P_k . Les sous-ensembles flous A_k de E correspondent à la réalisation de E par le résultat expérimental P_k , où a_{ik} est le degré de réalisation de E_i dans P_k .

$$R = \sum_{E_i \in E} r_i/E_i \quad [4]$$

$$A_k = \sum_{E_i \in E} a_{ik}/E_i \quad [5]$$

$$\text{Or } R = \cup_{(P_k \in P)} A_k \text{ donc, } r_i = \text{Sup}_{(P_k \in P)} a_{ik} \quad [6]$$

L'expérience de référence E_i est formée des qualificatifs Q_{ij} . L'objectif théorique en est la réalisation totale, représentée par un sous-ensemble flou T_i de E_i . Mais, en réalité, chaque expérience P_k ne représente que partiellement E_i , ce qui se traduit par le sous-ensemble flou B_{ik} de E_i . Ainsi, R est le profil de réalisation de E dans P, A_k celui de E dans P_k , et B_{ik} celui de E_i dans P_k . T_i est le profil théorique idéal de réalisation de E_i . Par conséquent, a_{ik} traduit la comparaison de B_{ik} et T_i . Ceci signifie que a_{ik} est la nécessité de B_{ik} relative à T_i .

$$T_i = \sum_{Q_{ij} \in E_i} t_{ij}/Q_{ij} \text{ avec } t_{ij} = 1, \forall i \text{ et } \forall j \quad [7]$$

$$B_{ik} = \sum_{Q_{ij} \in E_i} b_{ijk}/Q_{ij} \quad [8]$$

$$a_{ik} = N(B_{ik}; T_i) = \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} \text{Max}[b_{ijk}, 1-t_{ij}] = \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} b_{ijk} \quad [9]$$

2.2.3. Représentation du domaine de validité du modèle.

b_{ijk} est le degré de compatibilité du qualificatif Q_{ij} avec, à la fois, la mesure de x_j dans P_k et la valeur de x_j obtenue par simulation de P_k par le modèle, c'est-à-dire que F_{ij} est plus ou moins compatible avec le sous-ensemble flou H_{jk} de D_j .

H_{jk} représente le couple mesure-simulation, défini par :

$$H_{jk} = \int_{x_j \in D_j} \mu_{H_{jk}/x_j} \quad [10]$$

Le degré de compatibilité b_{ijk} est donc la possibilité de F_{ij} relative à H_{jk} , soit :

$$b_{ijk} = \prod (F_{ij} ; H_{jk}) = \text{Sup}_{(x_j \in D_j)} \text{Min} [\mu_{Q_{ij}}(x_j) , \mu_{H_{jk}}(x_j)] \quad [11]$$

Or H_{jk} est la partie commune entre le sous-ensemble flou M_{jk} de D_j , (mesure de x_j dans P_k) et le sous-ensemble flou S_{jk} de D_j (simulations de x_j par le modèle dans P_k). H_{jk} est donc l'intersection de M_{jk} et S_{jk} , soit :

$$H_{jk} = M_{jk} \cap S_{jk} \quad \text{soit} \quad \mu_{H_{jk}}(x_j) = \text{Min} [\mu_{M_{jk}}(x_j) , \mu_{S_{jk}}(x_j)] \quad [12]$$

Finalement, les relations [6], [9], [11] et [12] permettent d'exprimer la représentation floue compacte du domaine de validité du modèle donnée par R. Le choix de $\mu_{S_{jk}}(x_j)$ est prépondérant et caractérise sa signification physique.

$$r_i = \text{Sup}_{(P_k \in P)} \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} \text{Sup}_{(x_j \in D_j)} \text{Min} [\mu_{Q_{ij}}(x_j) , \text{Min} [\mu_{M_{jk}}(x_j) , \mu_{S_{jk}}(x_j)]] \quad [13]$$

2.3. Représentation spatiale du domaine de validité du modèle.

2.3.1. Degré de validité local du modèle.

La représentation floue compacte du domaine de validité peut dans certains cas être utilisée directement, sans être décompactée. Il s'agit, par exemple, de la recherche d'une nouvelle manipulation augmentant la couverture du champ expérimental potentiel. Cependant, la décompactation est nécessaire dans d'autres cas, notamment pour déterminer le degré de certitude de la validité d'une prédiction par le modèle. Celle-ci est effectuée dans l'espace d'état X de dimension m , il s'agit donc d'un vecteur d'état $x \in X$ tel que $x = (x_1 \dots x_j \dots x_m)^T$. L'image floue compacte du domaine de validité du modèle est le sous-ensemble flou R de E , caractérisé par un

ensemble fini de nombres. Sa forme décompactée est le sous-ensemble flou V de X , caractérisé par une hypersurface :

$$V = \int_{x \in X} v(x)/x \quad [14]$$

Le degré de validité local $v(x)$ du modèle est une mesure de la compatibilité entre l'image floue compacte R du domaine de validité du modèle, et le sous-ensemble flou $U(x)$ de E (fonction du vecteur d'état x). $U(x)$ caractérise le domaine couvert par chaque expérience E_i , où $u_i(x)$ est le degré d'appartenance du vecteur d'état x au domaine représenté par E_i . Donc $v(x)$ est la possibilité de R relative à $U(x)$.

$$U(x) = \sum_{E_i \in E} u_i(x)/E_i \quad [15]$$

$$v(x) = \prod (R; U(x)) = \text{Sup}(E_i \in E) \text{Min}[r_i, u_i(x)] \quad [16]$$

2.3.2. Spacialisation de la forme compacte.

Le domaine couvert par l'expérience E_i est lié aux qualificatifs dont E_i est constituée. Ce domaine est donc caractérisé par le sous-ensemble flou $G_i(x)$ de E_i ,

$$G_i(x) = \sum_{Q_{ij} \in E_i} g_{Q_{ij}}(x_j)/Q_{ij} \quad [17]$$

où $g_{Q_{ij}}(x_j)$ caractérise le domaine représenté par l'expérience E_i dans l'espace d'état. Il ne s'agit pas ici d'un degré d'appartenance au qualificatif, mais de la possibilité pour que le qualificatif soit admissible. Ainsi, $g_{Q_{ij}}(x_j)$ est une possibilité qui doit être supérieure ou égale à la fonction d'appartenance $\mu_{Q_{ij}}(x_j) \forall x_j$. Tous les qualificatifs doivent être totalement compatibles entre eux, et leur union doit couvrir l'ensemble de l'espace d'état. La possibilité de chaque qualificatif de E_i relativement aux autres dans E doit donc être égale à 1, soit :

$$\text{Sup}(E_i \in E) \text{Inf}(Q_{ij} \in E_i) g_{Q_{ij}}(x_j) = 1 \quad \forall x \quad [18]$$

Dans le cas traité ici $\mu_{Q_{ij}}(x_j)$ est défini par des fonctions d'appartenance triangulaires, et $g_{Q_{ij}}(x_j)$ par des fonctions trapézoïdales (figure 1).

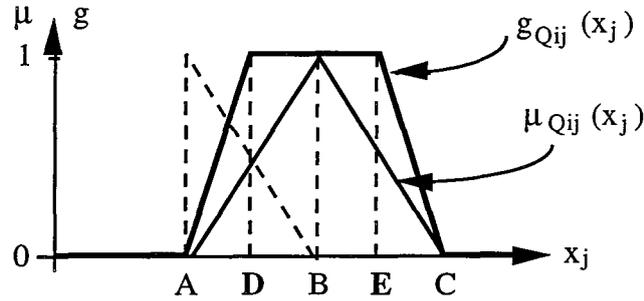


Figure 1. Fonctions d'appartenance aux qualificatifs en vue de la décomposition.

$u_i(x)$ est le résultat de la comparaison de $G_i(x)$ avec la référence T_i (réalisation totale de E_i). C'est donc la nécessité de $G_i(x)$ relative à T_i , soit

$$\begin{aligned} u_i(x) &= N(G_i(x); T_i) = \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} \text{Max}[g_{Q_{ij}}(x_j), 1-t_{ij}] \\ &= \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} g_{Q_{ij}}(x_j) \end{aligned} \quad [19]$$

La représentation spatiale floue du domaine de validité du modèle, déduite de sa représentation compacte (relation [16]), est finalement donnée par V , avec

$$v(x) = \text{Sup}_{(E_i \in E)} \text{Min}[r_i, \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} g_{Q_{ij}}(x_j)] \quad [20]$$

Si $r_i = 0 \forall i$ (non validité totale du modèle), alors $v(x) = 0 \forall x$. En revanche, si $r_i = 1 \forall i$, [20] donne [21], ce qui correspond bien à la réalisation totale du plan d'expérience de référence E , avec une validité totale du modèle.

$$v(x) = \text{Sup}_{(E_i \in E)} \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} g_{Q_{ij}}(x_j) = 1 \forall x \quad [21]$$

2.4. Degré de certitude de la validité d'une prédiction par le modèle.

Connaître le degré de validité d'une prédiction d'état par le modèle serait très utile en estimation d'état, commande, détection de dysfonctionnements ou optimisation de procédés. Le degré de validité d'une prédiction peut également servir à définir quand

un changement de modèle est nécessaire, dans le cas où l'on dispose de plusieurs modèles correspondant chacun à un domaine donné de l'espace d'état.

Soit d le degré de validité d'une prédiction par le modèle. C'est une mesure de la compatibilité des sous-ensembles flous V et W de X , où W caractérise la prédiction et son incertitude prévisible, soit :

$$W = \int_{x \in X} w(x)/x \quad [23]$$

$$d = \Pi(V ; W) = \text{Sup}_{(x \in X)} \text{Min}[v(x) , w(x)] \quad [24]$$

$w(x)$ est le résultat de la conjonction des différentes fonctions d'appartenance de la prédiction, correspondant à chaque composant de C , où $\mu_{L_j}(x_j)$ est la fonction d'appartenance du composant C_j de la prédiction d'état.

$$W = \bigcap_{(C_j \in C)} L_j \quad \text{avec} \quad L_j = \int_{x \in X} \mu_{L_j}(x_j)/x \quad [25]$$

$$\text{Ainsi,} \quad w(x) = \text{Inf}_{(C_j \in C)} \mu_{L_j}(x_j) \quad [26]$$

$$\text{d'où} \quad d = \text{Sup}_{(x \in X)} \text{Min}[v(x) , \text{Inf}_{(C_j \in C)} \mu_{L_j}(x_j)] \quad [27]$$

$$d = \text{Sup}_{(x \in E)} \text{Min}[\text{Sup}_{(E_i \in E)} \text{Min}[r_i , \text{Inf}_{(Q_{ij} \in E_i)} g_{Q_{ij}}(x_j)], \text{Inf}_{(C_j \in C)} \mu_{L_j}(x_j)] \quad [28]$$

3. Exemples d'applications.

3.1. Description d'une production discontinue d'acide lactique.

Le procédé discontinu est un mode de culture dans lequel tous les composants (microorganisme, source carbonée et azotée, vitamines, autres nutriments ...) sont présents dès le début de la fermentation. Le procédé évolue alors sans autre intervention extérieure que la régulation de la température, du pH et de l'agitation. L'exemple présenté concerne l'étude d'un procédé discontinu de production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur glucose. Un système de prélèvement

d'échantillon permet le suivi, entre autres, de la concentration de biomasse (souche *Lactobacillus casei*), de substrat carboné (glucose) et de produit (lactate).

Des données expérimentales [GON 91], correspondant à 24 mesures sur 40 heures, ont servi de base à l'élaboration d'un modèle [FON 93, FON 94a]. Celui-ci se compose d'équations de bilans de matière et de lois cinétiques, et représente au mieux les points expérimentaux sous forme d'ODEs. Nous comparerons plusieurs cas, en traitant l'expérience avec ou sans modèle, et avec ou sans erreur.

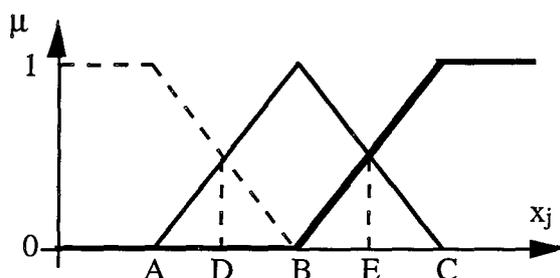


Figure 2. Fonctions d'appartenance des différents qualificatifs, utilisées pour la conversion floue.

Au travers de l'expérience, on se propose d'étudier les composants biomasse (x), glucose (s) et lactate (p). Trois qualificatifs sont envisagés pour chacun d'entre eux : faible (f), moyen (m) et élevé (e). Ceci conduit à définir les fonctions d'appartenance caractérisant les sous-ensembles flous Q_{ij} (figure 2). Ces fonctions résultent de la connaissance dont dispose l'expert sur le phénomène étudié.

Il est également nécessaire de définir les fonctions d'appartenance caractérisant M_{jk} (erreur de mesure expérimentale) et S_{jk} (erreur commise en simulation par le modèle). M_{jk} est de forme triangulaire de support 2α , avec α , l'erreur de mesure expérimentale maximale estimée pour chaque composant (figure 3a). S_{jk} est de forme trapézoïdale, de support 2β et de noyau 2γ (figure 3b). β et γ peuvent prendre différentes valeurs comme, par exemple, pour γ , la racine carrée de l'écart quadratique moyen entre simulations et points expérimentaux, ou bien l'écart maximum, et 2γ pour β .

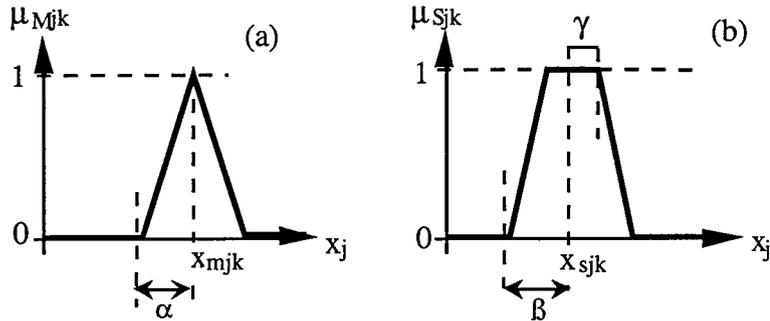


Figure 3 (a). Fonction d'appartenance de l'erreur de mesure. (b) Fonction d'appartenance de l'erreur de simulation. Par exemple $\beta=2\gamma=2\alpha$.

$C_j \backslash E_i$	1	2	3	4	5	6	7	...	23	24	25	26	27
1 = biomasse	f	f	f	f	f	f	f	...	e	e	e	e	e
2 = glucose	f	f	f	m	m	m	e	...	m	m	e	e	e
3 = éthanol	f	m	e	f	m	e	f	...	m	e	f	m	e

Figure 4. Représentation du plan d'expériences de référence. Valeur des qualificatifs (niveaux) : f=faible, m=moyen et e=élevé.

3.2. Domaines de validité associés à la production d'acide lactique.

Le plan de référence choisi est un plan classique comportant 3 composants à 3 qualificatifs, soit 27 expériences de référence (figure 4). Chaque qualificatif Q_{ij} est donné par l'intersection d'une ligne et d'une colonne. La technique étant très souple, il n'est pas nécessaire de respecter la structure d'un plan classique, et le nombre de qualificatifs par composant pourrait être différent. Le choix de ce nombre peut donc s'effectuer en fonction de la connaissance disponible sur chaque composant.

3.2.1. Champ couvert par une expérience dynamique sans erreur de mesure.

Pour cet exemple restrictif, le modèle n'existe pas et les mesures sont considérées sans erreur. Les fonctions d'appartenance de S_{jk} et de M_{jk} , décrivant

respectivement les simulations et les mesures, sont données par les relations [29] et [30] où x_{mjk} en la mesure de la concentration du composant C_j à l'instant t_k .

$$\mu_{Sjk}(x_j) = 1 \quad \forall x_j \quad \forall j \quad \forall k \quad [29]$$

$$\mu_{Mjk}(x_j) = 1 \text{ si } x_j = x_{mjk} \text{ et } \mu_{Mjk}(x_j) = 0 \text{ dans les autres cas} \quad [30]$$

Les qualificatifs Q_{ij} sont définis comme indiqué dans la figure 2, avec (A B C) égal à (2 5 8) pour la biomasse, (0 60 120) pour le glucose et (0 50 100) pour le lactate. Le calcul des r_i , selon la relation [13], fournit une image du plan d'expériences de référence au travers de l'expérience dynamique. C'est ce qui constitue le domaine expérimental réellement couvert par l'expérience dynamique. Ce domaine de validité est représenté par la figure 5a. Nous pouvons ici constater que l'expérience dynamique explore bien certaines zones du domaine expérimental (r_i proche de 1) comme (x s p) = (f e f) ou (e f e), alors que d'autres zones sont totalement inexplorées (r_i proche de 0) comme par exemple (x s p) = (f f f) ou (e e e).

3.2.2. Champ couvert par une expérience dynamique avec erreur de mesure.

Une estimation de l'erreur de mesure expérimentale maximale commise sur les x_j est cette fois prise en compte, mais le modèle n'est toujours pas considéré. Cette erreur est évaluée par l'expert en fonction des appareils et des techniques utilisées. L'erreur estimée sur chacune des variables est définie par la figure 3a avec $\alpha=0,4$ pour les trois variables. La fonction d'appartenance des simulations est toujours donnée par l'expression [29] et r_i par l'équation [13]. L'image du domaine expérimental ainsi obtenue est présentée en figure 5b. La prise en compte de l'erreur expérimentale se traduit par une meilleure couverture de l'espace expérimental par l'expérience dynamique, c'est-à-dire une meilleure réalisation du plan d'expériences statiques. Ce résultat s'avère logique puisqu'une incertitude supplémentaire a été introduite, se répercutant sur les r_i . Dans ce cas, le domaine de validité de l'expérience s'est étendu par manque de précision.

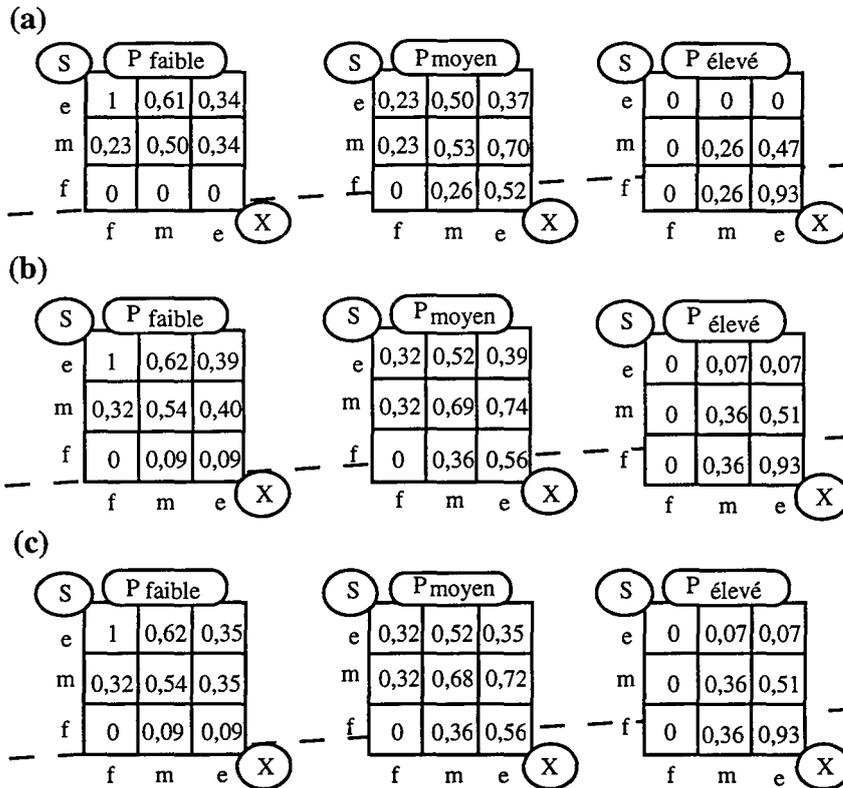


Figure 5. Champ expérimental couvert par l'expérience dynamique. (a) sans erreur de mesure, ni modèle, (b) avec erreur de mesure expérimentale, (c) avec erreur de mesure expérimentale et de simulation. Les nombres représentent le degré de réalisation de chaque expérience du plan de référence.

3.2.3. Forme compacte du domaine de validité expérimental du modèle.

Il s'agit cette fois de déterminer le domaine de validité du modèle. C'est en fait l'un des intérêts majeurs de la technique. Elle permet en effet de connaître avec précision le domaine pour lequel le modèle est fondé expérimentalement, et donc digne de confiance. La fonction d'appartenance décrivant l'erreur de simulation est définie figure 3b, avec $\alpha=0,4$ et $\beta=2\gamma=2\alpha$. L'équation complète [13] est utilisée pour le calcul des r_i . Les résultats obtenus sont représentés par la figure 5c.

Peu de différences sont observables par rapport au cas précédent. Ceci provient du fait que le modèle proposé est très fidèle à la réalité expérimentale. Dans ce cas précis, l'erreur de simulation n'influence que très peu le résultat final. Cependant, une diminution apparaît pour certaines valeurs de r_i . Ceci correspond aux zones du domaine expérimental où le modèle est légèrement moins bon. En effet, une comparaison est effectuée entre la mesure réelle et la mesure simulée ; plus elles diffèrent, plus la valeur de r_i diminue, traduisant le désaccord mesure-modèle.

3.2. *Suivi d'une fermentation semi-continue de levures.*

Le fonctionnement semi-continu d'un fermenteur est caractérisé par une alimentation en substrat, mais pas de sortie de liquide. Le volume V de milieu dans le réacteur est donc variable. L'exemple présenté concerne une production de levure *Saccharomyces cerevisiae* en culture semi continue [ABI 93, MAH 94]. Les concentrations en biomasse X , en substrat S (glucose) et en éthanol E (produit parasite de la bioconversion recherchée) sont mesurées tous les quarts d'heure. Des données expérimentales ont permis la construction d'un modèle simplifié (figure 6, toutes les mesures ne sont pas représentées) :

$$\dot{X} = (\mu - D)X \quad \dot{S} = D(S_e - S) - 5\mu X \quad \dot{E} = 1,95\mu X - DE \quad [31]$$

$$\text{avec } D = \frac{Q}{V} \text{ (taux de dilution) et } \mu = \frac{0,394S}{S + 0,33}$$

L'objectif recherché est la maximisation de la quantité de levures en évitant de produire de l'éthanol. Ceci nécessite une régulation de la concentration en glucose dans le réacteur aux alentours de 0,07 g/l (en pratique, entre 0,04 et 0,12 g/l); la concentration en éthanol doit simultanément restée à 0,04 g/l (comprise entre 0,01 et 0,12 g/l) [MOS 91]. Ces régulations peuvent s'effectuer en pilotant de façon appropriée le débit d'alimentation Q en glucose du réacteur ($S_e = 300$ g/l). Une

commande non-linéaire de ce débit a été synthétisée à l'aide du modèle et d'une linéarisation par retour d'état [ABI 93]. Sa stabilité théorique est réalisée par placement de pôles. Or, ce modèle présente des imperfections qui risquent de fausser la commande. La méthode des plans d'expériences dynamiques flous permet de déterminer le degré de validité de cette commande.

Deux composants, glucose et éthanol, à 3 niveaux (faible, moyen, fort) ont été choisis pour construire un plan de 9 expériences de référence. Les différentes fonctions d'appartenance sont définies figures 2 et 3, avec $\alpha = 0,1$, x_{mjk} , $\gamma = 0,1$, x_{sjk} et $\beta = 0,4$, x_{sjk} . Les valeurs des triplets (A B C) sont déterminés par la valeur de consigne et les encadrements limites des concentrations des composants, soit (0,04 0,07 0,12) pour le glucose et (0,01 0,04 0,12) pour l'éthanol. Ceci entraîne pour $g_{Qij}(x_j)$ une forme trapézoïdale (ADEC) de (0,004 0,0055 0,095 0,12) pour le glucose et (0,01 0,025 0,08 0,12) pour l'éthanol (figure 1 et 2). La relation [13] est utilisée pour le calcul des r_j .

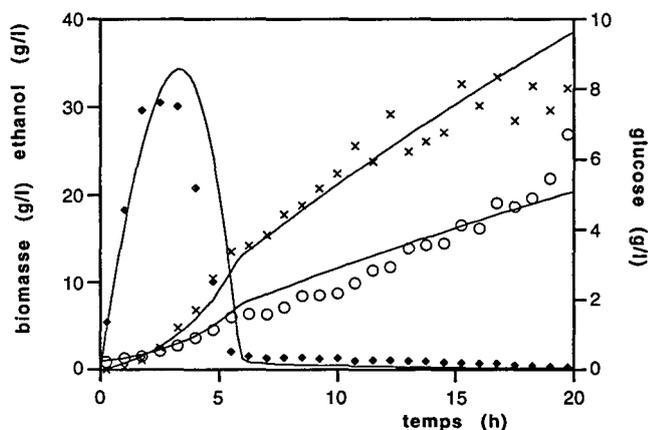


Figure 6. Evolution des concentrations de biomasse, glucose et éthanol lors du procédé de production de levures en semi-continu. Points expérimentaux (o biomasse, ◆ glucose, x éthanol) et simulations du modèle (en traits continus).

3.4. Validité de la loi de commande de production de levures.

Les résultats de la transformation floue donnant le domaine de validité du modèle sont présentés figure 7. Le modèle montre donc des prédictions très acceptables dans les zones glucose et éthanol forts, glucose moyen et éthanol fort, ainsi que glucose faible et éthanol moyen. La commande mise en place à partir des données du modèle devrait donc également suivre ces zones de validité.

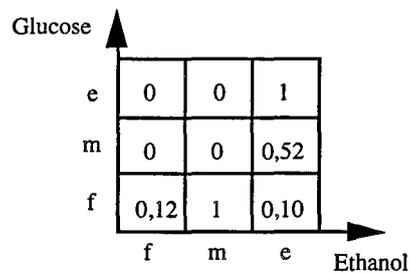


Figure 7. Image floue compacte du domaine de validité du modèle.

La figure 8 présente les mesures bruitées (10%) des concentrations en glucose et en éthanol obtenues lors de l'application de la loi de commande. Le début de la culture correspond à une phase normale de consommation du glucose initial (5 g/l), donc à un développement des levures et à une production d'éthanol. Ainsi la concentration en glucose diminue pour atteindre la consigne après 2 h, la concentration d'éthanol ayant alors atteint son maximum. A partir de 7 h, la concentration de glucose diminue de nouveau pour se stabiliser nettement en dessous de la consigne. Parallèlement, l'éthanol est reconsommé pour disparaître totalement vers 9 h. Le taux de dilution augmente régulièrement des 2 h (figure 8). Il aurait dû cependant augmenter beaucoup plus... Le degré de confiance accordée aux valeurs de la commande au cours de la culture est également présenté en figure 8. Ce degré de confiance chute brutalement vers 8 h, traduisant la dérive de la culture et l'inefficacité de la commande. La définition d'un seuil de validité du modèle et de la commande est déterminante pour le bon suivi du fonctionnement du procédé. Si on considère, en effet, que le modèle et la commande ne sont plus valables à partir de la quatrième valeur inférieure à ce seuil, la dérive est détectée à 10 h pour un seuil de

0,5 alors qu'elle l'est dès 6 h pour un seuil de 0,6. Ce dernier seuil représente une détection précoce qui permettrait à l'expert humain de remédier à l'anomalie alors que 0,5 correspond ici à la détection d'un dysfonctionnement difficilement rattrapable.

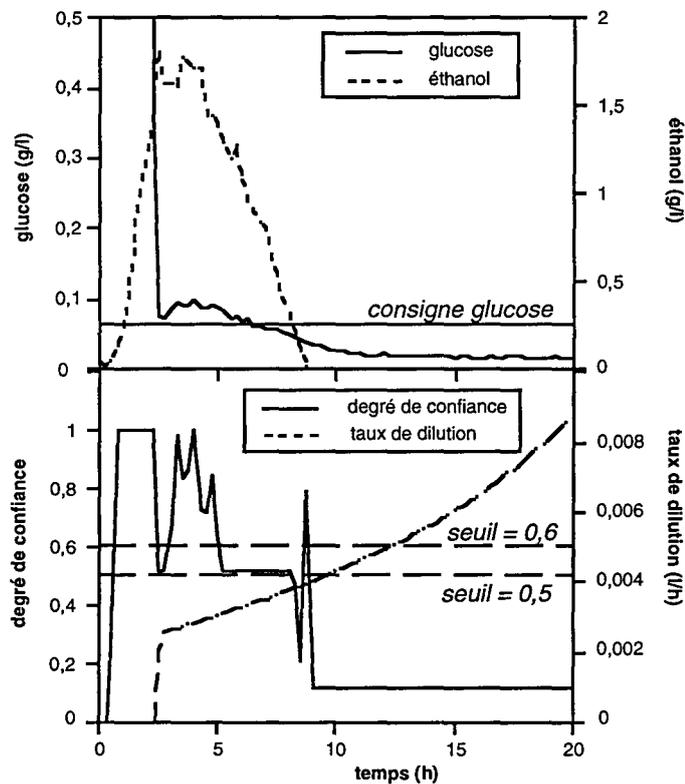


Figure 8. Suivi de la concentration de glucose, d'éthanol et du taux de dilution lors d'une production semi-continue de levures. Evolution du degré de confiance accordé aux valeurs de la commande.

4. Discussion - Conclusions.

Les résultats décrits ci-dessus peuvent paraître évidents au regard des expériences présentées. Les phénomènes étudiés (croissance des microorganismes, consommation d'un substrat et production d'un métabolite principal) sont bien

connus, et le domaine de validité expérimental du modèle peut aisément se déduire des courbes expérimentales et/ou simulées. Cependant, ces conclusions ne pourront être que qualitatives. La méthode proposée permet, au contraire, une quantification du degré de couverture de l'espace expérimental par l'expérience dynamique. Ceci autorise des développements à base de calculs mathématiques. D'autre part, les phénomènes étudiés ne sont pas toujours aussi bien connus et cette technique montre alors tout son intérêt, comme en formulation [FON 94b]. Elle présente cependant certaines limitations. Elle requiert tout d'abord un minimum de connaissances et d'expertise sur le processus étudié afin de définir les variables, les qualificatifs et les différentes fonctions d'appartenance. La seconde limitation concerne la finesse de l'image floue. Même si la théorie autorise le traitement d'un grand nombre de variables et de qualificatifs, celui-ci est limité par la quantité d'information disponible, c'est-à-dire le nombre de points expérimentaux. L'étude pratique des résultats montre les effets de différents paramètres. Tout d'abord, l'erreur de mesure expérimentale constitue une incertitude introduite dans les calculs qui entraîne une augmentation des r_j . Mais cette extension de validité ou de couverture du domaine expérimental n'est, en fait, qu'un artéfact dû à une imprécision. Le second paramètre est l'intervention du modèle. Au contraire de l'erreur de mesure, le modèle ne peut que restreindre le domaine de validité. Pour un modèle parfait, les mesures sont égales aux simulations et le domaine est inchangé. En revanche, si les mesures et les simulations diffèrent localement, la valeur la plus faible des fonctions d'appartenance respectives sera conservée, conduisant généralement à une diminution des r_j dans ces zones. Ceci traduit le désaccord modèle-simulation, et le domaine de validité s'en trouve restreint. La détermination du domaine de validité expérimental d'un modèle permet le calcul d'un degré de certitude de la validité d'une prédiction. Il paraît évident qu'une simulation ne peut être fiable que si elle résulte d'une information contenue dans le modèle et fondée expérimentalement. Ainsi, cette technique protège contre les extrapolations hasardeuses, voire erronées.

Les applications d'une telle technique peuvent se subdiviser en deux parties : la modélisation et l'utilisation du modèle. Dans le premier cas, il s'agit de valider la

couverture du domaine expérimental possible, définir une nouvelle expérience si nécessaire et déterminer le domaine de validité du modèle. Dans le second cas, il s'agit de valider une prédiction ou de détecter une rupture de modèle. Ceci est utile en optimisation, en supervision de procédé, en estimation ou observation d'état et en commande non-linéaire. Les exemples traités montrent surtout la simplicité, la grande souplesse et la généralité de la méthode : tous types de variables sont envisageables avec, éventuellement, un nombre de qualificatifs différent pour chaque variable.

Références

- [ABI 93] Abidi K., Corriou J.P., Fonteix C., "Commande non linéaire d'un réacteur biologique : fermentation semi-continue de levure". Récents Progrès en Génie des Procédés. "Conduite et commande des procédés". 1993, Lavoisier, Paris, 7, 29, 57-62.
- [ALB 93] Albiol J., Robuste J., Casas C., Poch M. (1993). "Biomass estimation in plant cell cultures using an extended Kalman filter". Biotechnol. Prog., 1993, 9, 174-178.
- [AND 93] Andrews G.F., "The yield equations in the modelling and control of bioprocesses". Biotech. and Bioeng., 1993, 42, 401-409.
- [BAS 90] Bastin G., Dochain D., "On-line estimation and adaptative control of bioreactors". 1990, Elsevier, 116-145.
- [BEL 91] Bellgardt K.H., "Cell models" dans "Biotechnology. Measuring, modelling and control". 1991, Schügerl K Ed., VCH., 4, 267-298.
- [DIA 89] Diamond W.J., "Practical experiments designs for engineers and scientists". 1989, Van Nostrand Reinhold, New York.
- [DUB 87] Dubois D., Prade H., "Théorie des possibilités, applications à la représentation des connaissances en informatique". 1987, Masson, Paris. 2^{ème} Ed.
- [FAR 91] Farza M., Cheruy A., "Cambio : a software for modelling and simulation of bioprocesses". Computer Applications in Biosciences, 1991, 7, 3, 327-336.
- [FON 93] Fonteix C., Engasser J.M., Garrido-Sanchez L., "SAM, Système d'Aide à la Modélisation de bioprocédés basé sur un système expert couplé à des réseaux de neurones". Récents Progrès en Génie des Procédés. "Du transfert de matière à la modélisation". 1993, Lavoisier, Paris, 7, 31, 57-62.
- [FON 94a] Fonteix C., Kuehm N., Marc I., Engasser J.M., "Fuzzy dynamic experimental design : a new methodology for experimental validity field determination of knowledge model". 5^{ème} Congrès International IPMU, 1994, Paris, 2, 1087-1092.

[FON 94b] Fonteix C., Kuehm N., Viennet R., Marc I., "Les plans d'expériences dynamiques flous : intérêt et domaine d'application". Récents Progrès en Génie des Procédés. "Stratégie Expérimentale pour la Recherche en procédés Agro-alimentaires et Biotechnologiques". 1994, Lavoisier, Paris, **9**, 36. 87-92.

[GAR 93] Garrido-Sanchez L.E., Fonteix C., Lourenço A., Kuehm N., Engasser J.M., "SAM, an expert System for Automatic Modelling of bioprocess - Kinetic diagnosis by neural networks". MIM-S'93, Proceedings of IMACS-IFAC 2th International Symposium on Mathematical and Intelligent Models in System Simulation. Bruxelles. 1993, **1**, 1-9.

[GON 91] Gonçalves L.M.D., Xavier A., Almeida J., Carrondo M.J., "Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production". Enzyme and Microbial Technology. 1991, **13**, 314-319.

[JIT 92] Jitsufuchi T., Ishikawa H., Tanaka H., Matsushima K., "A simple method of fuzzy modeling for microorganism reaction". Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, **74**, 312-319.

[MAH 94] Mahjoub M., Mosrati R., Lamotte M., Fonteix C., Marc I., "Fuzzy control of baker's yeast fed-batch bioprocess : a robustness study". Food Research Int, 1994, **27**, 145-153.

[MOS 91] Mosrati R., Fonteix C., Marc I., "Recherche analytique des conditions de conduite optimale d'une fermentation semi-continue de levures". Récents Progrès en Génie des Procédés. "Mesures - Capteurs - Simulation - Commande". 1991, Lavoisier, Paris, **5**, 13. 275-280.

[NYT 93] Nyttle V.G., Chidambaram M., "Fuzzy logic control of a fed-batch fermentor". Bioprocess Engineering, 1993, **9**, 115-118.

[PER 93] Perrin E., Bicking F., Fonteix C., Marc I., Ruhaut L., Shingleton M., "Identification paramétrique d'un modèle hydrodynamique d'un bioréacteur à l'aide d'un algorithme de type génétique". Récents Progrès en Génie des Procédés. "Conduite et commande des procédés". Lavoisier, Paris, 1993, **7**, 29. 57-62.

[SIM 92] Simulis R., Havlik I., Lübbert A., "A fuzzy-supported Kalman filter : a new approach to state estimation and prediction exemplified by alcohol formation in beer brewing". Journal of Biotechnology, 1992, **24**, 211-234.

[ZAD 65] Zadeh L.A., "Fuzzy sets". Information and Control. 1965, **8**, 338-353.

Annexe 2 : Récapitulatif des réactions biochimiques
intégrées au réseau métabolique METAFUX :
(les numéros entre parenthèses renvoient à la numérotation des flux)

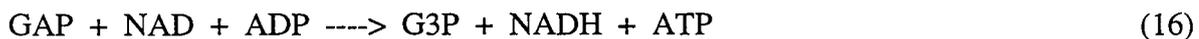
Transport par le système phosphotransférase :



Synthèse de tréhalose :



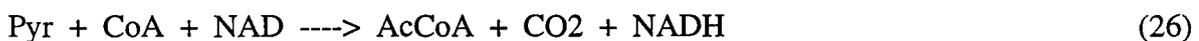
Glycolyse :



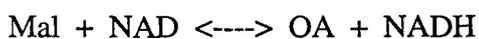
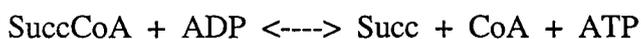
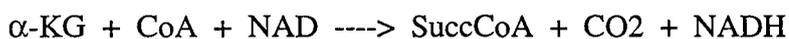
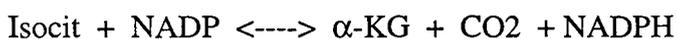
Réaction anaplerotique (Phospho-énol-pyruvate Carboxylase) :



Pyruvate déshydrogénase :

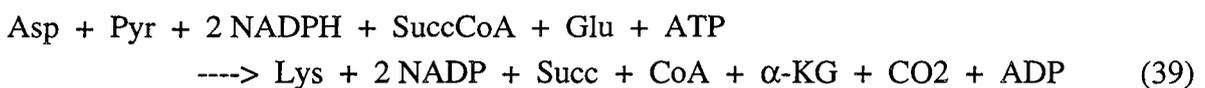
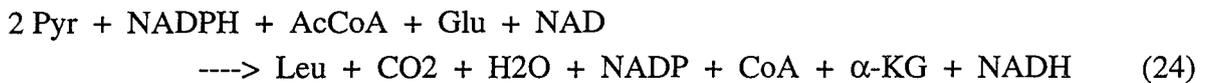
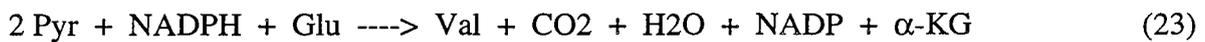


Cycle de Krebs :

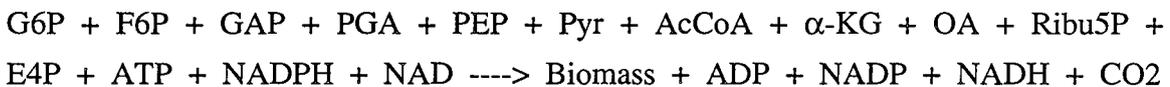
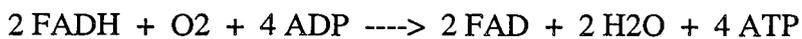
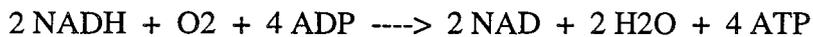


Cycle des pentoses phosphates :



Synthèse des acides aminés :**Synthèse de la biomasse :**

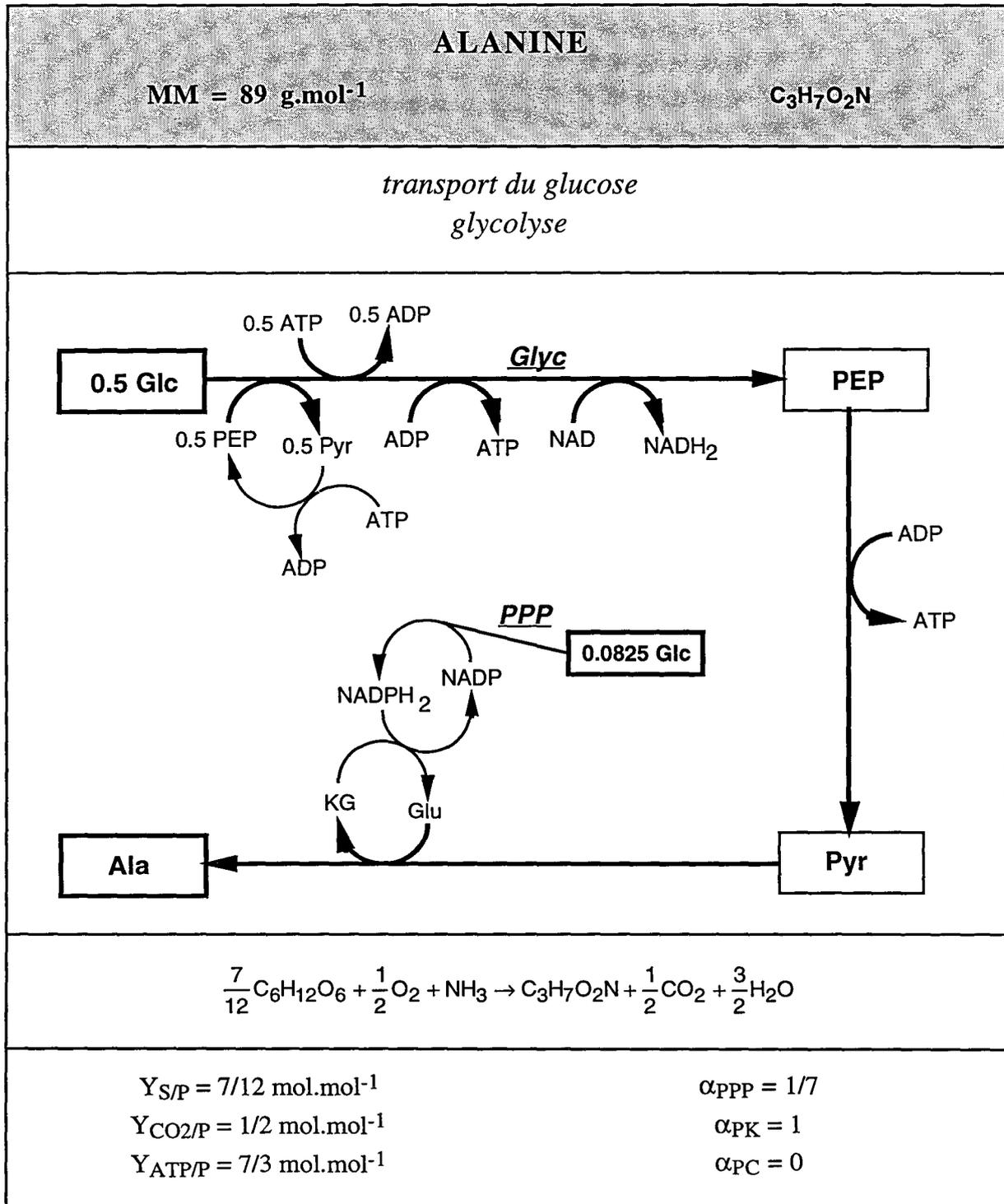
combinaison des réactions (4), (8), (11), (13), (15), (17), (21), (25), (27), (33), (41).

**Chaine respiratoire (rapport P/O=2) :****Dissipation de l'ATP :**

Annexe 3 : Analyse métabolique des voies de biosynthèse individuelle des métabolites pris en compte dans METAFLEX.

La méthode d'analyse d'une voie de biosynthèse individuelle est décrite en détail dans le projet de publication du chapitre V. *Glyc* : glycolyse ; *PPP* : voie des pentoses phosphates ; *AP* : voie anaplérotique (PEPC).

remarque : chaque équation stœchiométrique produit également de l'énergie sous forme d'ATP. Cette quantité d'énergie apparaît au travers du coefficient $Y_{ATP/P}$, exprimé en mol.mol^{-1} .

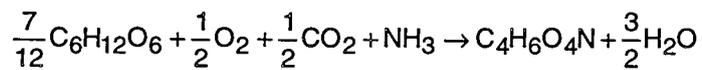
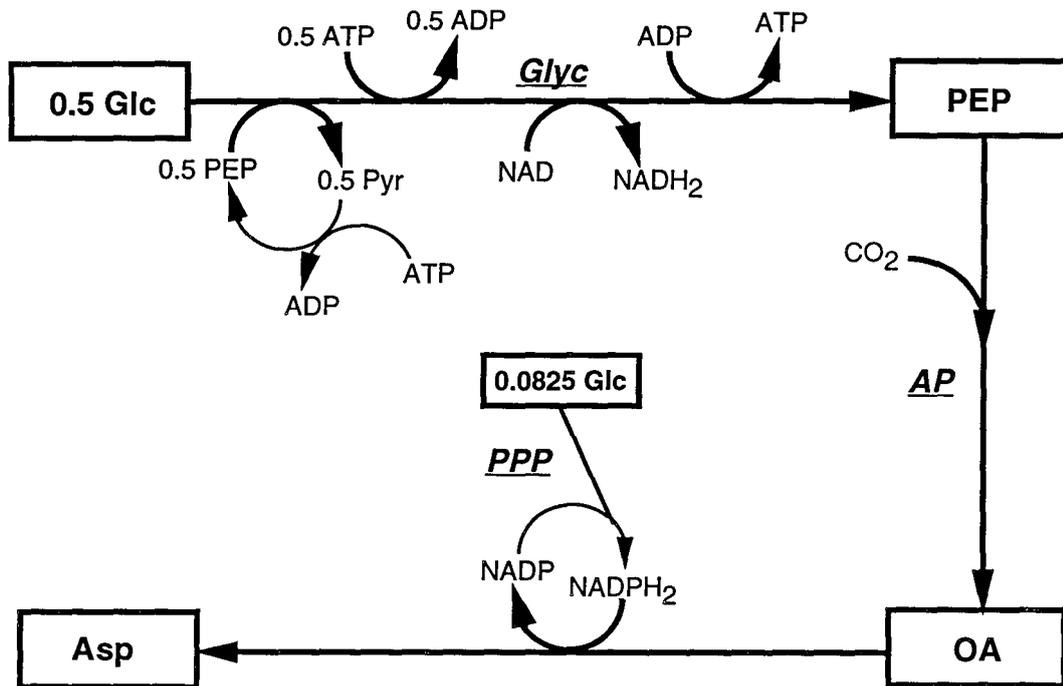


ASPARTATE

MM = 133 g.mol⁻¹

C₄H₆O₄N

*transport du glucose
glycolyse
voie anaplérotique*



$$Y_{S/P} = 7/12$$

$$Y_{\text{CO}_2/P} = -1/2$$

$$Y_{\text{ATP}/P} = 4/3$$

$$\alpha_{\text{PPP}} = 1/7$$

$$\alpha_{\text{PK}} = 0$$

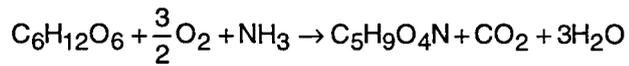
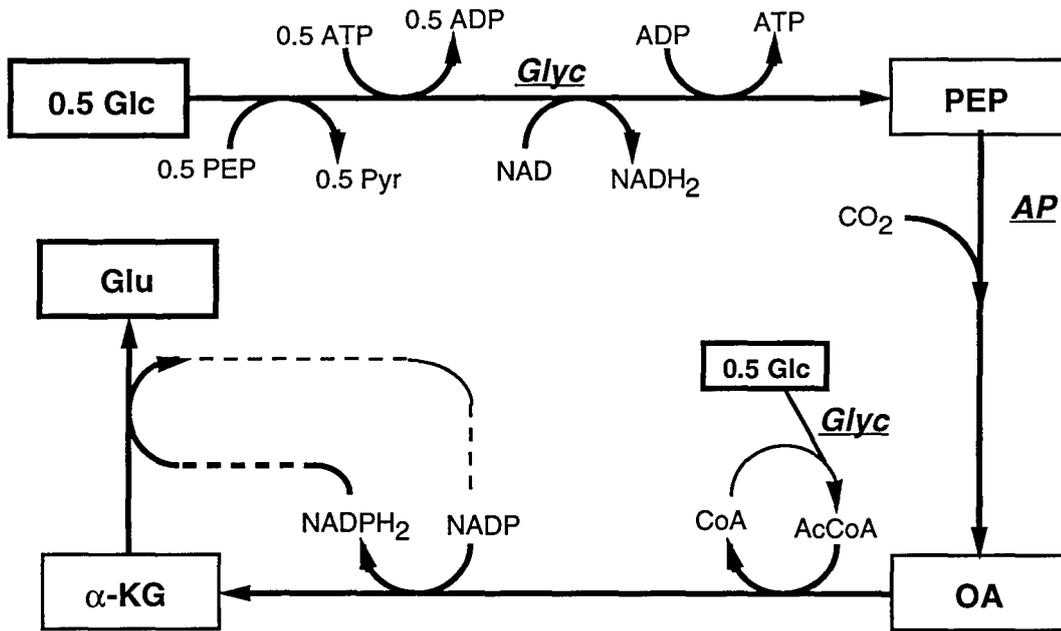
$$\alpha_{\text{PC}} = 1$$

GLUTAMATE

MM = 146 g.mol⁻¹

C₅H₉O₄N

*transport du glucose
glycolyse
voie anaplérotique
cycle de Krebs*



Y_{S/P} = 1
Y_{CO₂/P} = 1
Y_{ATP/P} = 2

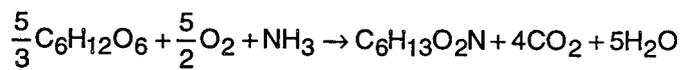
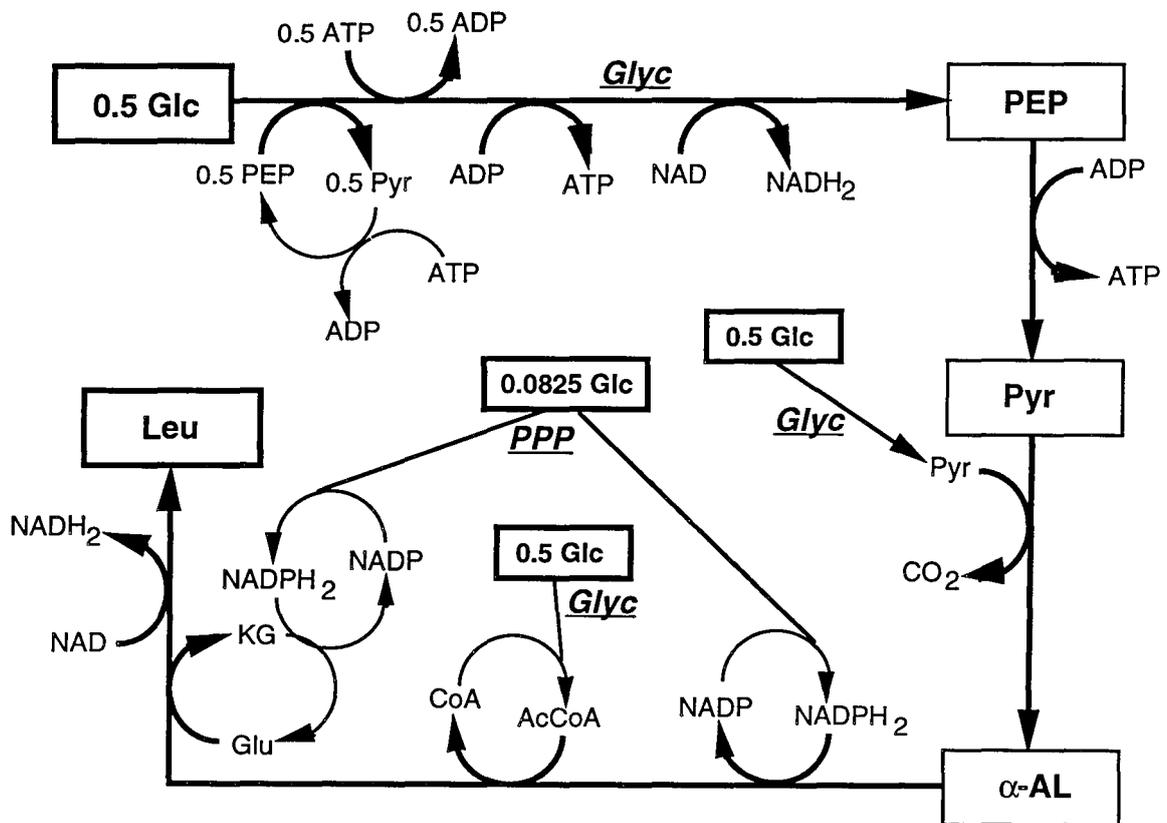
α_{PPP} = 0
α_{PK} = 1/2
α_{PC} = 1/2

LEUCINE

MM = 131 g.mol⁻¹

C₆H₁₃O₂N

*transport du glucose
glycolyse*



$$Y_{S/P} = 5/3$$

$$Y_{CO_2/P} = 4$$

$$Y_{ATP/P} = 67/6$$

$$\alpha_{PPP} = 1/10$$

$$\alpha_{PK} = 1$$

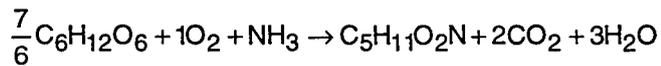
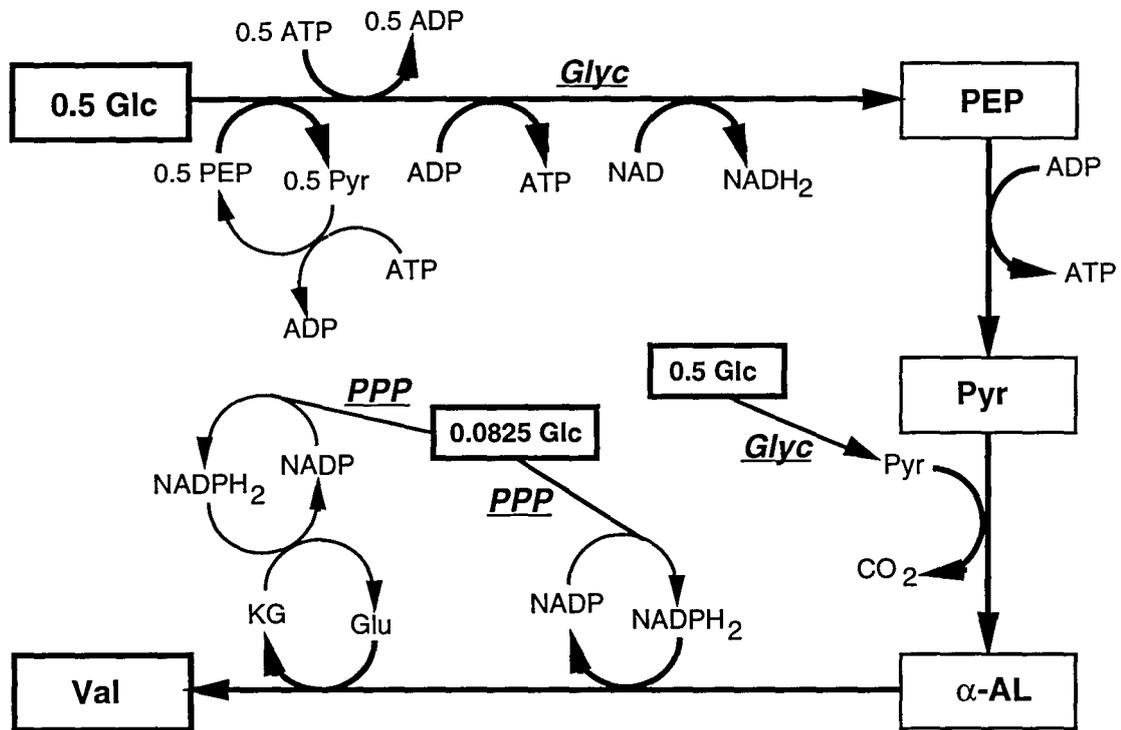
$$\alpha_{PC} = 0$$

VALINE

MM = 117 g.mol⁻¹

C₅H₁₁O₂N

*transport du glucose
glycolyse*



$$Y_{S/P} = 7/6$$

$$Y_{\text{CO}_2/P} = 2$$

$$Y_{\text{ATP/P}} = 14/3$$

$$\alpha_{\text{PPP}} = 1/7$$

$$\alpha_{\text{PK}} = 1$$

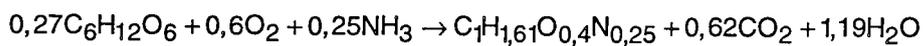
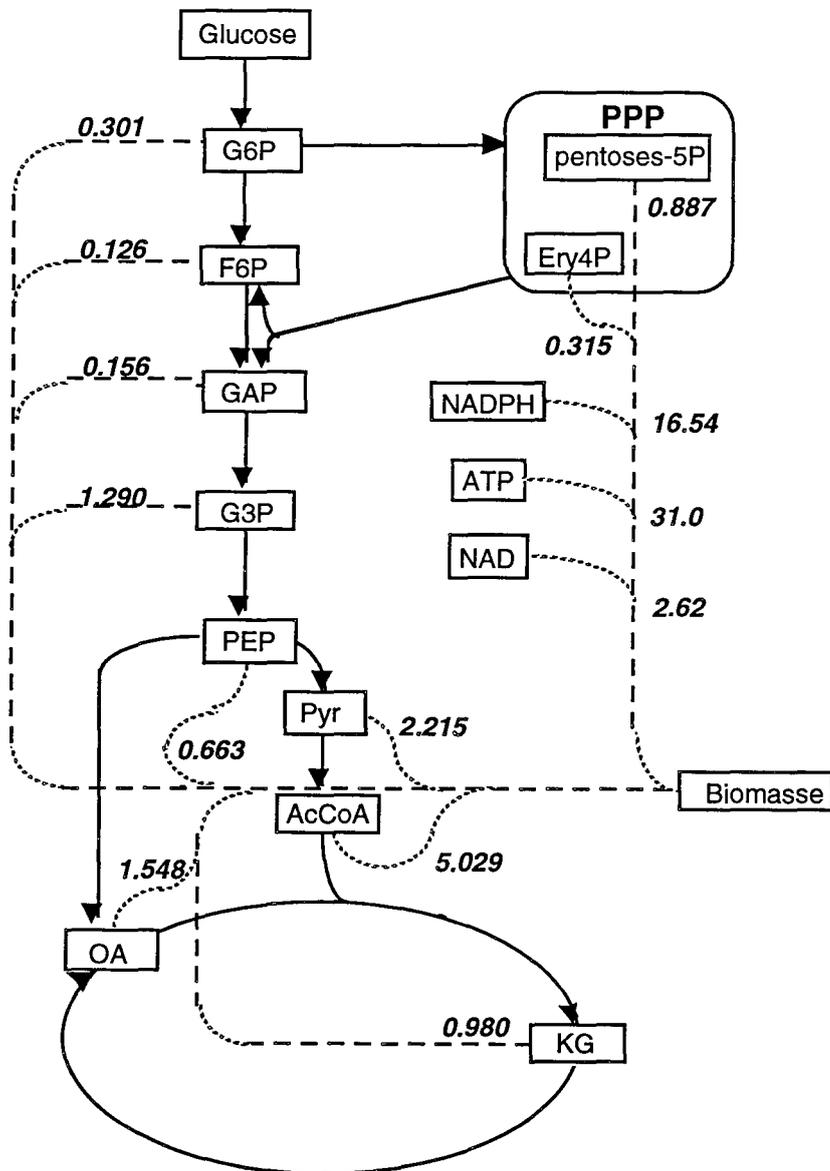
$$\alpha_{\text{PC}} = 0$$

BIOMASSE

MM = 26,4 g.mol⁻¹

C₁H_{1,61}O_{0,4}N_{0,25} (12,5% cendres)

*toutes voies
du métabolisme central*



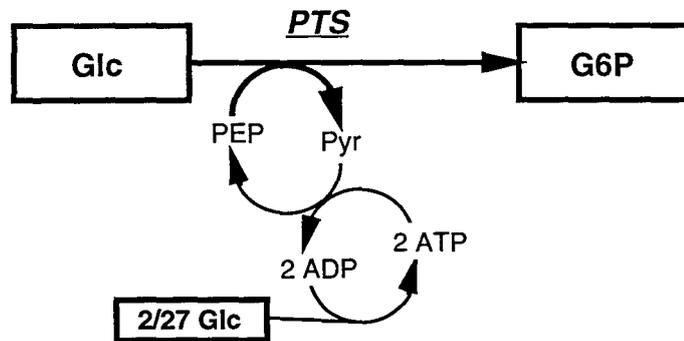
$Y_{S/P} = 0,01 \text{ mol Glc.g MS}^{-1}$
 $Y_{\text{CO}_2/P} = 0,023 \text{ mol CO}_2.\text{g MS}^{-1}$
 $Y_{\text{ATP}/P} = 0,026 \text{ mol ATP.g MS}^{-1}$

$\alpha_{\text{PPP}} = 0,11$
 $\alpha_{\text{PK}} = 0,82$
 $\alpha_{\text{PC}} = 0,18$

PRECURSEURS de la BIOMASSE

voies du métabolisme central

■ Glucose 6-phosphate :



$$Y_{S/P} = 29/27$$

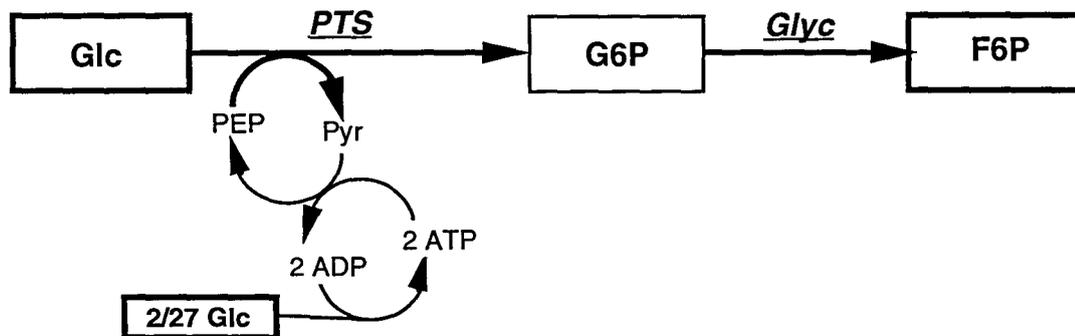
$$Y_{ATP/P} = 0$$

$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ Fructose 6-phosphate :



$$Y_{S/P} = 29/27$$

$$Y_{ATP/P} = 0$$

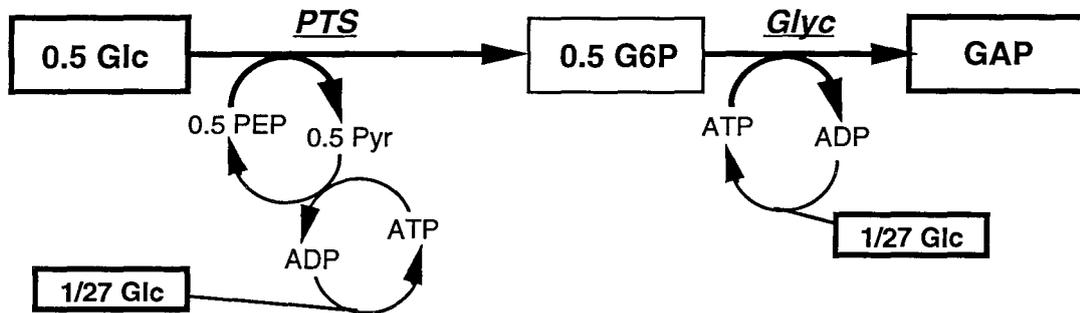
$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

PRECURSEURS de la BIOMASSE

■ Glyceraldéhyde 3-phosphate :



$$Y_{S/P} = 5/9$$

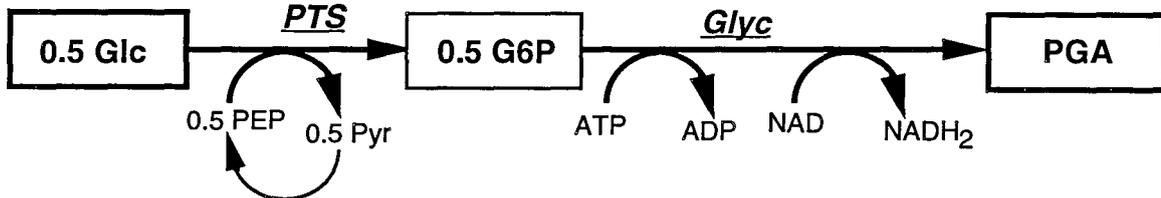
$$Y_{ATP/P} = 0$$

$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ 3-phosphoglycérate :



$$Y_{S/P} = 1/2$$

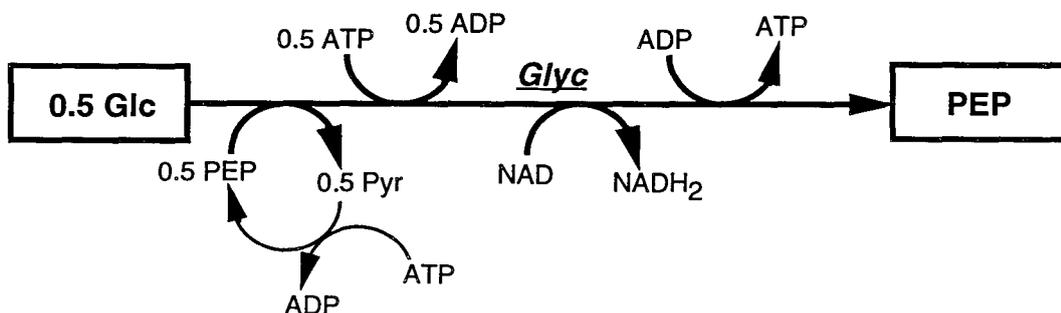
$$Y_{ATP/P} = 0$$

$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ Phospho-énol-pyruvate :



$$Y_{S/P} = 1/2$$

$$Y_{ATP/P} = 3/2$$

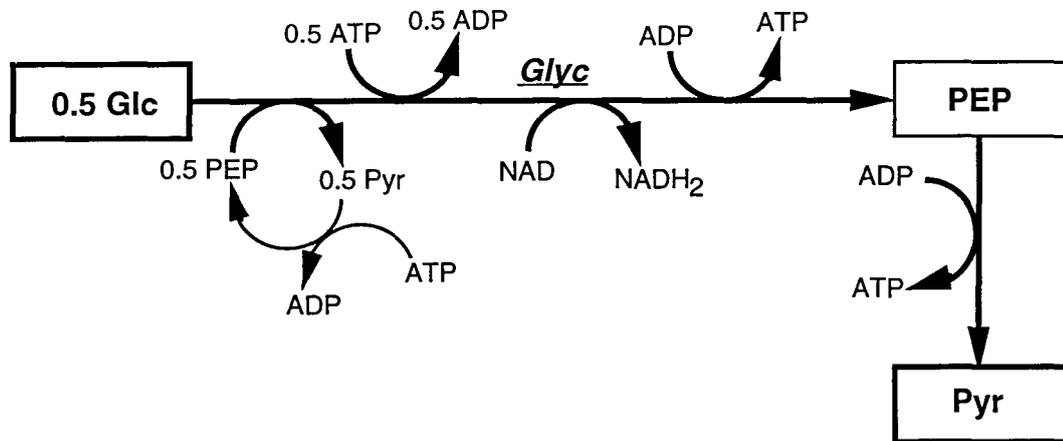
$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

PRECURSEURS de la BIOMASSE

■ Pyruvate :



$$Y_{S/P} = 1/2$$

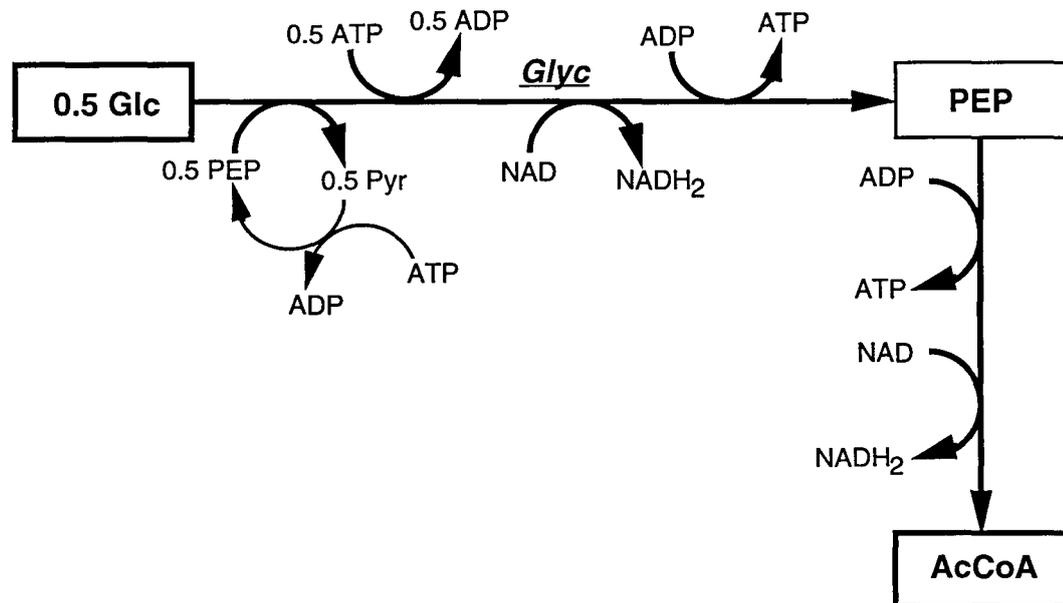
$$Y_{ATP/P} = 5/2$$

$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 1$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ Acétyl Coenzyme A :



$$Y_{S/P} = 1/2$$

$$Y_{ATP/P} = 1/2$$

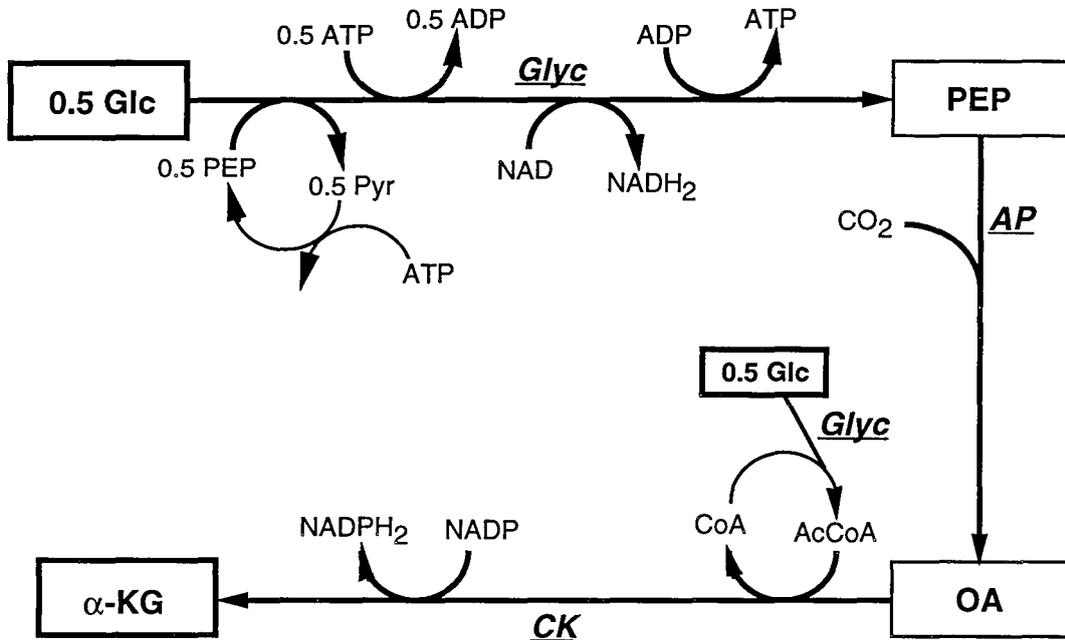
$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 1$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

PRECURSEURS de la BIOMASSE

■ α -cétoglutarate :



$$Y_{S/P} = 1$$

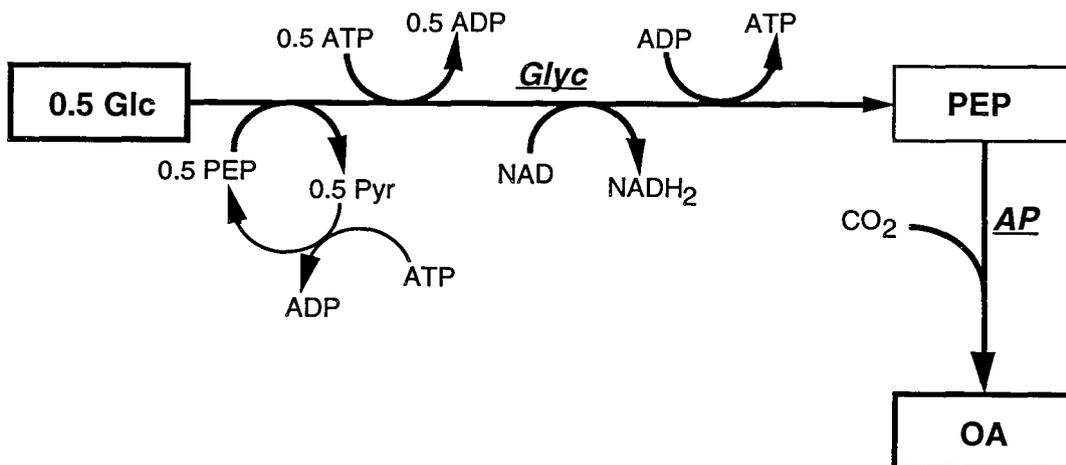
$$Y_{ATP/P} = 8$$

$$\alpha_{PPP} = 1/2$$

$$\alpha_{PK} = 1/2$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ Oxalo acétate :



$$Y_{S/P} = 1/2$$

$$Y_{ATP/P} = 3/2$$

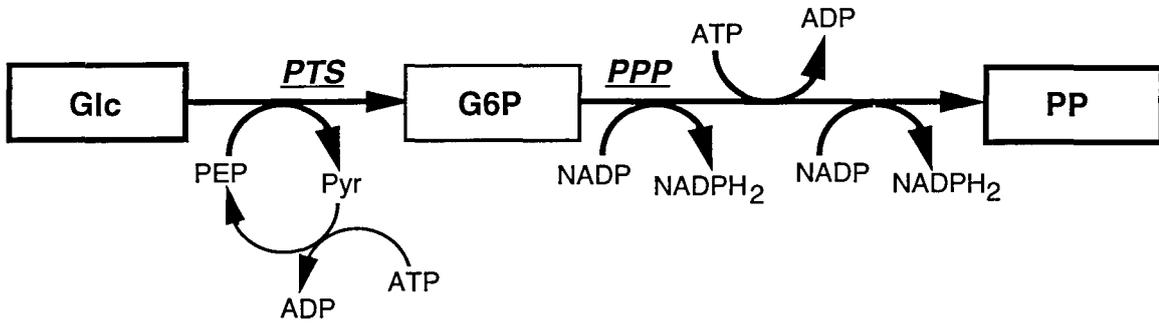
$$\alpha_{PPP} = 0$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 1$$

PRECURSEURS de la BIOMASSE

■ Pentoses 5-phosphates :



$$Y_{S/P} = 1$$

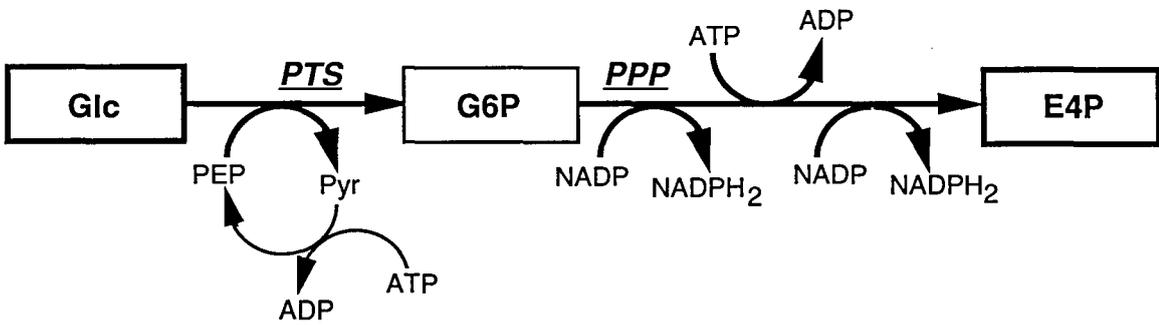
$$Y_{ATP/P} = 0$$

$$\alpha_{PPP} = 1$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

■ Erythrose 4-phosphate :



$$Y_{S/P} = 1$$

$$Y_{ATP/P} = 0$$

$$\alpha_{PPP} = 1$$

$$\alpha_{PK} = 0$$

$$\alpha_{PC} = 0$$

Annexe 4 : Procédure de calcul pour la construction automatique des cartes individuelles

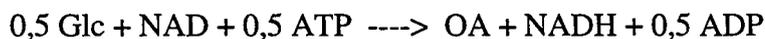
1. Codage des données et des résultats :

La matrice **RR** est la matrice des Réactions (ou règles) de Régénération obtenues à partir de l'analyse du métabolisme microbien. La lecture de cette matrice se fait en colonne, les composés affectés d'un signe négatif étant des substrats et ceux affectés d'un signe positif étant des produits.

matrice **RR** :

	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	r10
OA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyr	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0
AcCoA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SuccCoA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
NAD	-1	0	-1	-2	0	0	1	0	0	0
FAD	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NADPH	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0
NADPH'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ATP	-0,5	-2	0,5	0,5	0	-1	2	2	-0,167	11,5
Glc	-0,5	0	-0,5	-0,5	0	0	0	0	-0,083	-0,5

La réaction r1 est donc la suivante : $0,5 \text{ Glc} + \text{NAD} + 0,5 \text{ ATP} \text{ ----> OA}$
qui doit être équilibrée avec les composés manquants, soit



Nous avons artificiellement divisé le NADPH en deux composés suivant qu'il provient de la voie des pentoses (NADPH, réaction r9) ou du cycle de Krebs (NADPH', réaction r10) de manière à pouvoir calculer la participation de chacune de ces réactions et en déduire la part de voie des pentoses (voir ci-dessous, régénération du NADPH et de l'ATP). Cependant, il n'existe qu'un type de NADPH dans le fichier de données introduit par l'utilisateur, la différenciation s'effectue au niveau de la procédure de calcul. (remarque : la place attribuée au NADPH consommé au niveau de la réaction r5 pour la régénération du glutamate n'a aucune incidence sur le résultat final)

Le fichier de données est constitué par le "fichier bilan" des intermédiaires consommés et produits dans une voie individuelle de biosynthèse. Il se présente sous la forme d'un vecteur **VB** (Vecteur Bilan), dont l'ordre des composés est le même que celui des lignes de la matrice **RR**, le composé NADPH' ne devant pas être pris en compte, soit :

$$[y_{OA} \quad y_{PEP} \quad y_{Pyr} \quad y_{AcCoA} \quad y_{Glu} \quad y_{SuccCoA} \quad y_{NAD} \quad y_{FAD} \quad y_{NADPH} \quad y_{ATP} \quad y_{Glc}]$$

Le résultat de la procédure de calcul sera le vecteur **VC** (Vecteur des Coefficients), qui regroupe les coefficients stoechiométriques de chaque réaction de régénération :

$$[\rho_1 \quad \rho_2 \quad \rho_3 \quad \rho_4 \quad \rho_5 \quad \rho_6 \quad \rho_7 \quad \rho_8 \quad \rho_9 \quad \rho_{10}]$$

2. Méthode de calcul :

Le calcul ne s'effectue pas à proprement parler de façon matricielle, mais séquentiellement, ligne par ligne, avec une étape bilan entre chaque nouveau calcul.

$$\text{Ainsi : } \rho_1 = \frac{y_{OA}}{RR_{(1,1)}}$$

puis $VB'_{(i)} = VB_{(i)} + \rho_1 \cdot RR_{(1,i)}$ où $VB'_{(i)}$ représente le nouveau vecteur bilan ayant intégré les consommations et productions dues à la régénération de l'OA, c'est à dire à l'emploi ρ_1 fois de la réaction r1.

$$\text{On passe ensuite à } \rho_2 : \quad \rho_2 = \frac{y'_{PEP}}{RR_{(2,2)}}$$

et $VB''_{(i)} = VB'_{(i)} + \rho_2 \cdot RR_{(2,i)}$ avec VB'' le nouveau vecteur bilan.

Ainsi de suite jusqu'à atteindre les réactions de régénération du NADPH et de l'ATP. Si y_{ATP}^n est négatif, c'est à dire si l'ATP est produit en excès et qu'il n'est donc pas nécessaire d'en régénérer, la même procédure continue. Si en revanche y_{ATP}^n est positif, c'est à dire si l'ATP est consommé et qu'il faut donc en régénérer, alors on traite les 2 dernières réactions de régénération simultanément. Une vraie procédure matricielle intervient pour résoudre le système de 2 équations à 2 inconnues défini par

$$\begin{cases} y_{NADPH}^n = 12 \cdot \rho_9 + 2 \cdot \rho_{10} \\ y_{ATP}^n = 23 \cdot \rho_{10} - \rho_9 \end{cases}$$

et traduit matriciellement par

$$\begin{bmatrix} y_{NADPH}^n \\ y_{ATP}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 12 & 2 \\ -1 & 23 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \rho_9 \\ \rho_{10} \end{bmatrix} \quad \text{soit} \quad \begin{bmatrix} \rho_9 \\ \rho_{10} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 12 & 2 \\ -1 & 23 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} y_{NADPH}^n \\ y_{ATP}^n \end{bmatrix}$$

Remarque : On retrouve les relations présentées dans le projet de publication du chapitre V, soit :

$$\rho_9 = \frac{23 \cdot y_{\text{NADPH}}^n - 2 \cdot y_{\text{ATP}}^n}{280} \quad \text{et} \quad \rho_{10} = \frac{y_{\text{NADPH}}^n + 6 \cdot y_{\text{ATP}}^n}{140}$$

3. Paramètres de la voie individuelle de biosynthèse

Le dernier bilan sur la dernière ligne permet d'accéder à y_{Glc}^{n+1} , c'est à dire au besoin total en glucose $Y_{S/P}$.

α_{PPP} est ensuite calculé selon une formule équivalente à celle donnée dans la publication :

$$\alpha_{\text{PPP}} = \frac{\rho_9}{y_{\text{Glc}}^{n+1}}$$

α_{PK} et α_{PC} sont obtenus selon les relations suivantes :

$$\alpha_{\text{PK}} = \frac{\sum_i (\text{VPK}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)})}{\sum_i (\text{VPK}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)} + \text{VPC}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)})} \quad \text{et} \quad \alpha_{\text{PC}} = \frac{\sum_i (\text{VPC}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)})}{\sum_i (\text{VPK}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)} + \text{VPC}_{(i)} \cdot \text{VC}_{(i)})}$$

avec **VPK** et **VPC** deux vecteurs qui décrivent la part de flux passant respectivement dans les voies PK et PC pour chaque réaction de régénération. Au début de l'exécution de la procédure informatique, il faudra préciser laquelle de ces deux voies est utilisée pour le glucose initialement requis dans voie de biosynthèse étudiée afin qu'il soit pris en compte dans le bilan final. Les vecteurs **VPK** et **VPC** sont les suivants :

$$\text{VPK} = [0 \ 0 \ 1 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1] \quad \text{et} \quad \text{VPC} = [1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0]$$

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allison S.M., Small J.R., Kacser H. et Prosser J.I., (1993), "Control analysis of microbial interactions in continuous culture : a simulation study", *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2309-2317.
- Ankri S., (1991), "Structure et regulation de la glutamate deshydrogénase codée par le gène *gdh A* chez *Corynebacterium glutamicum*", DEA CUST, Clermont-Ferrand, France.
- Bailey J.E., (1986), "MPS : an algorithm and data base for metabolic pathway synthesis", *Biotech. Letts.*, 8, 837-842.
- Bailey J.E., (1991), "Toward a science of metabolic engineering", *Science*, 252, 1668-1681.
- Börmann El Kholly E., Eikmanns B.J., Gutmann M., Sahn H., (1993), "Glutamate dehydrogenase is not essential for Glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2329-2331.
- Botsford J.L., Alvarez M., Hernandez R., Nichols R., (1994), "Accumulation of Glutamate by *Salmonella typhimurium* in response to osmotic stress", *Appl. Environ. 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, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Brenchley J.E., (1972), "Effect of methionine sulfoximine and methionine sulfone on glutamate synthesis in *Klebsiella aerogenes*", *J. Bacteriol.*, 114, 666-673.
- Bröer S., Eggeling L., Krämer R., (1993), "Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different Lysine productivities may have different Lysine excretion systems", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 316-321.
- Bröer S., Krämer R., (1991a), "Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, 1. Identification of a specific secretion carrier system", *Eur. J. Biochem.*, 202, 131-135.
- Bröer S., Krämer R., (1991b), "Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, 2. Energetics and mechanism of the transport system", *Eur. J. Biochem.*, 202, 137-143.
- Chao Y.P., Liao J.C., (1993), "Alteration of growth yield by overexpression of PEP carboxylase and PEP carboxykinase in *Escherichia coli*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (12), 4261-4265.
- Chen R., Bailey J.E., (1993), "Observations of aerobic, growing *Escherichia coli* metabolism using an on line NMR spectroscopy system", *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 215-221.
- Cocaign M., (1992), "Croissance de *Corynebacterium glutamicum* sur divers substrats et répartition des flux dans les voies du métabolisme central", Thèse INSA, Toulouse.
- Cocaign M., Monnet C., Lindley N.D., (1993), "Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates : use of substrates mixtures to localise metabolic bottlenecks", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 526-530.
- Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A., Lindley N.D., (1996), "Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, xx-xx.

- Cocaign-Bousquet M., Lindley N.D.**, (1995), "Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate", *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 260-267.
- Cortassa S., Aon M.**, (1994), "Metabolic control analysis of glycolysis and branching to ethanol production in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon, nitrogen, or phosphate limitations", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 761-770.
- Cremer J., Treptow C., Eggeling L., Sahm H.**, (1988), "Regulation of enzymes of Lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*", *J. Gen. Microbiol.*, 134, 3221-3229.
- Csonka L.N.**, (1977), "Use of ³H and ¹⁴C double-labeled glucose to assess *in vivo* pathways of amino acid biosynthesis in *Escherichia coli*", *J. Biological Chem.*, 252 (10), 3392-3398.
- Csonka L.N., Baich A.**, (1983), "Proline synthesis" dans "Amino acids : biosynthesis and genetic regulation", Herrmann K.M., Someville R.L., Eds, Addison Wesley publishing company, Reading, pp 35-49.
- Csonka L.N., Fraenkel D.G.**, (1977), "Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*", *J. Biological Chem.*, 252 (10), 3382-3391.
- Daridon B.**, (1988), "Etudes nutritionnelle, physiologique et cinétique de *Corynebacterium glutamicum* producteur de lysine. Sélection de mutants en réacteur continu.", Thèse INPL, Nancy, France.
- Dawes E.A., Holms W.H.**, (1958), "Metabolism of *Sarcina lutea*, II. Isotopic evaluation of the routes of glucose utilization", *Biochem. Biophys. Acta*, 29, 82-91.
- De Hollander J.A.**, (1994), "Potential metabolic limitations in Lysine production by *Corynebacterium glutamicum* as revealed by metabolic network analysis", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 508-515.
- Delaunay S.**, (1995), "Détermination d'activités enzymatiques influençant la production d'acides aminés chez *Corynebacterium glutamicum*.", DEA INPL, Nancy, France.
- Delgado J., Mervane J., Liao J.C.**, (1993), "Experimental determination of flux control distribution in biochemical systems : *in vitro* model to analyse transient metabolite concentrations", *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1121-1128.
- Diamond W.J.**, (1989), "Practical experiments designs for engineers and scientists.", Van Nostrand Reinhold, New York.
- Dietrich J., Henning U.**, (1970), "Regulation of pyruvate dehydrogenase complex synthesis in *Escherichia coli* K12. Identification of the inducing metabolite", *Eur. J. Biochem.*, 14, 258-269.
- Dominguez H.**, (1994), "Croissance et flux métaboliques de *Corynebacterium glutamicum* sur divers sucres : interactions entre transporteurs PTS et voies métaboliques.", Thèse INSA, Toulouse.
- Dominguez H., Nezondet C., Cocaign M., Lindley N.D.**, (1993), Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acids overproduction, *Biotechnol. Lett.*, 15, 449-454.
- Duperray F., Jezequel D., Ghazi A., Letellier L., Shechter E.**, (1992), "Excretion of Glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1103, 250-258.
- Erdmann A., Weil B., Krämer R.**, (1993), "Lysine secretion by wild type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake", *J. Gen. Microbiol.*, 139, 3115-3122.

- Erdmann A., Weil B., Krämer R.**, (1994), "Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* wild type : regulation of secretion carrier activity", *Appl. Microb. Biotechnol.*, 42, 604-610.
- Ertan H.**, (1992), "Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*", *Arch. Microbiol.*, 158, 35-41.
- Fell D. A., Sauro H.M.**, (1985), "Metabolic control and its analysis. Additional relationships between elasticities and control coefficients", *Eur. J. Biochem.*, 148, 555-561.
- Fell D.A.**, (1992), "MCA : a survey of its theoretical and experimental development", *Biochem. J.*, 286, 313-330.
- Fell D.A., Sauro H.M., Small J.R.**, (1987), "Le calcul des coefficients de contrôle par l'algèbre matricielle", dans "Contrôle du métabolisme cellulaire", Colloque de Bordeaux, 16 et 17 Octobre 1987, (Mazat J.P. et Reder C. ed.), Université de Bordeaux I et II, 15-26.
- Galazzo J.L., Bailey J.E.**, (1990), "Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*", *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 162-172.
- Gottschalk G.**, (1986), "Bacterial metabolism", 2nd edition, Springer Verlag New York Inc.
- Gubler M., Jetten M., Lee S.H., Sinskey A.J.**, (1994a), "Cloning of pyruvate gene (pyk) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of pyk in a Lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (7), 2494-2500.
- Gubler M., Park S.M., Jetten M., Stephanopoulos G., Sinskey A.J.**, (1994b), "Effect of PEP carboxylase deficiency on metabolism and Lysine production in *Corynebacterium glutamicum*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 857-863.
- Guillouet S.**, (1996), "Etudes cinétiques et physiologiques de *Corynebacterium glutamicum* sous stress osmotique", Thèse INPL, Nancy, France.
- Hansen R.G., Henning U.**, (1966), "Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12", *Biochim. Biophys. Acta*, 122, 355-358.
- Heinrich R., Rapoport S.M., Rapoport T.A.**, (1977), "Metabolic regulation and mathematical nodes", *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 32, 1-82.
- Heinrich R., Rapoport T.A.**, (1974), "A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effectors strength", *Eur. J. Biochem.*, 42, 89-95.
- Hoischen C., Krämer R.**, (1989), "Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of Glutamate by *Corynebacterium glutamicum*", *Arch. Microbiol.*, 151, 342-347.
- Holms W.H.**, (1986), "The central metabolic pathway of *E.coli* : relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate", *Curr. Top. Cell. Reg.*, 28, 69-105.
- Ingraham J.L., Maaloe O., Neidhardt F.C.**, (1983), "Chemical synthesis of the bacterial cell : polymerization, biosynthesis, fueling reactions and transport", *Growth of bacterial cell*, chapitre 3.
- Ishino S., Shimomura-Nishimuta J., Yamaguchi K., Shirahata K., Araki K.**, (1991), "¹³C nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in L-Glutamic acid and L-Lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37, 157-165.
- Jangaard N.O., Unkeless J. et Atkinson D.E.**, (1968), "The inhibition of citrate synthase by adenosine triphosphate", *Biochimica and Biophysica Acta*, 151, 225-235.

- Jetten M.S.M., Gubler M.E., Lee S.H., Sinskey A.J.**, (1994a), "Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (7), 2501-2507.
- Jetten M.S.M., Folettie M.T., Sinskey A.J.**, (1995), "Effect of different levels of aspartokinase on the Lysine production by *Corynebacterium lactofermentum*", *Appl. Environ. Biotechnol.*, 43, 76-82.
- Jetten M.S.M., Pitoc G.A., Follettie M.T., Sinskey A.J.**, (1994b), "Regulation of phospho enol-pyruvate and oxalo acetate converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 111, 183-188.
- Jetten M.S.M., Sinskey A.J.**, (1993), "Characterization of phospho enol-pyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*.", *FEMS Microbiol. Lett.*, 111, 183-188.
- Jitsufuchi T., Ishikawa H., Tanaka H., Matsushima K.**, (1992), "A simple method of fuzzy modeling for a microorganism reaction.", *J. Ferm. bioeng.*, 74, 5, 312-319.
- Jørgensen H., Nielsen J., Villadsen J. et Møllgaard H.**, (1995), "Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations", *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 117-131.
- Kacser H.**, (1983), "The control of enzyme *in vivo* : elasticity analysis of the steady state", *Biochem. Soc. Trans.*, 11, 35-40.
- Kacser H., Burns J.A.**, (1973), "The control of flux", in *Rate control of biological processes*, Symp. Soc. Exp. Biol., 27, (Davies D.D. ed.), 65-104, Cambridge University Press : Cambridge.
- Kimura K.**, (1962), "The significance of glutamic dehydrogenase in glutamic acid fermentation", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 8, 253-260.
- Kiss R.D., Stephanopoulos G.**, (1992), "Metabolic characterization of a L-lysine producing strain by continuous culture", *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 565-574.
- Ko Y.F., Bentley W.E., Weigand W.A.**, (1993), "An integrated metabolic modeling approach to describe the energy efficiency of *E. coli* fermentations under oxygen limited conditions : cellular energetics, carbon flux and acetate production", *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 843-853.
- Ko Y.F., Bentley W.E., Weigand W.A.**, (1994), "A metabolic model of cellular energetics and carbon flux during aerobic *E. coli* fermentation", *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 847-855.
- Kornberg H.L.**, (1981), "Formation and utilization of PEP in microbial carbohydrate transport", *Curr. Top. Cell. Reg.*, 18, 313-327.
- Kornberg H.L.**, (1992), "How carbohydrates cross the lipid membrane of bacterial cell", *Curr. Top. Cell. Reg.*, 33, 49-63.
- Krämer R.**, (1994), "Secretion of amino acids by bacteria : physiology and mechanisms", *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 75-94.
- Letellier T., Reder C., et Mazat J.P.**, (1991), "CONTROL : software for the analysis of the control of metabolic networks", *CABIOS*, 7, 3 : 383-390.
- Liao J.C. et Delgado J.**, (1993), "Advances in Metabolic Control Analysis", *Biotechnol. Prog.*, 9, 221-233.

- Liebl W., Klammer R., Schleifer K.H.**, (1989), "Requirement of quelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media", *Appl. Microbiol. Technol.*, 32, 205-210.
- Liew C.K.**, (1976), "Inequality Constrained least-squares estimation", *J. Am. Stat. Assoc.*, 71, 746.
- Mancuso A., Sharfstein S.T., Tucker S.N., Clark D.S., Blanch H.W.**, (1994), "Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with ¹³C NMR spectroscopy", *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 563-585.
- Marx A., A. de Graaf A., Wiechert W., Eggeling L., Sahl H.**, (1996), "Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing", *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 111-129.
- Mavrouniotis M.L., Stephanopoulos G., Stephanopoulos G.**, (1990), "Computer-aided synthesis of biochemical pathways", [CASBP], *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1119-1132.
- Medina V., Pontarollo R., Glaeske D., Tabel H., Goldie H.**, (1990), "Sequence of the *pckA* gene of *Escherichia coli* K-12 : Relevance to genetic and allosteric regulation and homology of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase with the enzymes from *Trypanosoma brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Bacteriol.*, 172 (12), 7151-7156.
- Meers J.L., Tempest D.W., Brown C.M.**, (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.
- Mori M., Shiiro I.**, (1987a), "Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid producing bacterium, *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 51, 129-138.
- Mori M., Shiiro I.**, (1987b), "Phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2671-2678.
- Mori M., Shiiro I.**, (1985), "Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*", *J. Biochem.*, 98, 1621-1630.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M. et Umberger H.E.**, (1987), "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology", American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- Nezondet C.**, (1992), "Contribution à l'optimisation d'un procédé de surproduction de glutamine par *Corynebacterium glutamicum* par une approche intégrée : physiologie, nutrition et génie microbien", Thèse. INSA, Toulouse.
- Oshima K., Tanaka K., Konishita S.**, (1964), "Studies on L-glutamic acid fermentation. XI. Purification and properties of L-glutamic dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*", *Agric. Biol. Chem.*, 28, 714-722.
- Ozaki H., Shiiro I.**, (1968), "Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition of isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase by organic acids related to the TCA and glyoxylate cycles", *J. Biochem.*, 64, 355-363.
- Ozaki H., Shiiro I.**, (1969), "Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase", *J. Biochem.*, 66, 297-311.
- Ozaki H., Shiiro I.**, (1983), "Production of lysine by pyruvate kinase mutants of *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1569-1576.

- Péquignot C.**, (1995), "Caractérisation de la croissance de *Corynebacterium glutamicum melassecola* ATCC 17965 en cuve agitée aérée sur différents milieux de culture - Détermination des flux métaboliques", Thèse de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Peters-Wendisch P.G., Eikmanns B.J., Thierbach G., Bachmann B., Sahl H.**, (1993), "Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production", FEMS Microbiol. Lett., 112, 269-274.
- Reinscheid D.J., Eikmanns B.J., Sahl H.**, (1994), Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme, J. Bacteriol., 176 (12), 3474-3483.
- Rollin C., Morgan V., Guyonvarch A., Guerquin-Kern J.L.**, (1995), "¹³C NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways", Eur. J. Biochem., 227, 488-493.
- Rosenberg S.A., Brenchley J.E.**, (1983), "Regulation of glutamate and glutamine biosynthesis", in "Amino acids : biosynthesis and genetic regulation", (Herrman K.M., Someville R.L.), Addison Wesley Publishing Company, Reading, 1-15.
- Rouxel T.**, (1992), "Conception et exploitation d'une base de données associant les connaissances du métabolisme et du génôme", Thèse de doctorat de l'Université Paris 6, Paris.
- Ruklish M.P.**, (1987), "Kinetic characteristics of glucose transport in *Brevibacterium flavum*", Mikrobiol., 56, 21-26.
- Ruklish M.P., Duntse M.E., Levane V.A., Kalninya R.V.**, (1987), "Characteristics of the operation of the tricarboxylic acid cycle in *Brevibacterium flavum* and *Micrococcus glutamicus*", Mikrobiol., 56, 759-763.
- Sahl H., Eggeling L., Eikmanns B., Krämer R.**, (1995), "Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*", FEMS Microbiol. Rev., 16, 243-252.
- Sano K., Ito K., Miwa K., Nakamori S.**, (1987), "Amplification of the phosphoenol pyruvate carboxylase gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production", Agric. Biol. Chem., 51 (2), 597-599.
- Sanwal B.D.**, (1970), "Regulatory Characteristics of the Diphosphopyridine Nucleotide-specific Malic Enzyme of *Escherichia coli*", J. Biol. Chem., 245, 1212-1216.
- Sanwal B.D., Smando R.**, (1969), "Malic enzyme of *Escherichia coli*", J. Biol. Chem., 244, 1817-1823.
- Sanwal B.D., Wright J.A., Smando R.**, (1968), "Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*", Bioch. Biophys. Res. Commun., 31, 623-627.
- Sauro H.M., Small J.R., Fell D. A.**, (1987), "Metabolic control and its analysis. Extension to the theory and matrix method", Eur. J. Biochem., 165, 215-221.
- Savageau M.A.**, (1976), "Biochemical System Anaysis : a study of function and design in molecular biology", Addison-Wesley.
- Schlosser P.M., Holcomb T., Bailey J.E.**, (1993), "Determining metabolic sensitivity coefficients directly from experimental data", Biotechnol. Bioeng., 41, 1027-1038.
- Schrumpf B., Eggeling L., Sahl H.**, (1992), "Isolation and prominent characteristics of an L-Lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 566-571.

- Schrumpf B., Schwartzer A., Kalinowski J., Pühler A., Eggeling L., Sahm H., (1991), "A functionally split pathway for Lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*", J. Bacteriol., 173 (14), 4510-4516.
- Serebrijski I., Wojcik F., Reyes O. et Leblon G., (1995), "*pro* A mutants : multicopy suppression by *asd* gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous *pro* A", J. Bact., sous presse.
- Seressiotis A., Bailey J.E., (1988), "MPS : an artificially intelligent software system for the analysis and synthesis of metabolic pathways", Biotechnol. Bioeng., 31, 587-602.
- Sharfstein S.T., Tucker S.N., Mancuso A., Blanch H.W., Clark D.S., (1994), "Quantitative *in vivo* NMR studies of hybridoma metabolism", Biotechnol. Bioeng., 43, 1059-1074.
- Shen L.C., Atkinson D.E., (1970), "Regulation of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Interactions of adenylate energy charge and other regulatory parameters", J. Biol. Chem., 245, 5974-5978.
- Shiio I., Mori M., Ozaki H., (1982), "Amino acid aminotransferases in an amino acid-producing bacterium", *Brevibacterium flavum*, Agric. Biol. Chem., 46 (12), 2967-2977.
- Shiio I., Otsuka S.I., Takahashi M., (1961), "Effect of growth substrates on levels of glyoxylate by-pass enzymes in a glutamate forming bacterium, *Brevibacterium flavum* No. 2247", J. Biochem., 49, 262-263.
- Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T., (1960a), "Glutamic acid formation from glucose by bacteria. III. On the pathway of pyruvate formation in *Brevibacterium flavum* No. 2247", J. Biochem., 47, 414-421.
- Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T., (1960b), "Glutamic acid formation from glucose by bacteria. IV. Carbon dioxide fixation and glutamate formation in *Brevibacterium flavum* No. 2247", J. Biochem., 48, 110-120.
- Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T., (1959), "Glutamic acid formation from glucose by bacteria. I. Enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs cycle, and the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* No. 2247", J. Biochem., 46, 1303-1311.
- Shiio I., Ozaki H., (1968), "Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate", J. Biochem., 64, 45-53.
- Shiio I., Ozaki H., (1970), "Regulation of NADP specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium", J. Biochem., 68, 633-647.
- Shiio I., Ozaki H., Ujigawa K., (1977), "Regulation of citrate synthase in *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium", J. Biochem., 82, 395-405.
- Shiio I., Sugimoto S.I., Kawamura K., (1990), "Effects of carbon source sugars on the yield of amino acid production and sucrose metabolism in *Brevibacterium flavum*", Agric. Biol. Chem., 54, 1513-1519.
- Shiio I., Ujigawa K., (1978), "Enzymes of the Glutamate and Aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*", J. Biochem., 84, 647-657.
- Shiio I., Ujigawa-Takeda K., (1980), "Presence and regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*", Agric. Biol. Chem., 44, 1897-1904.

- Simon J.L.**, (1985), "Etudes physiologiques et cinétiques de la production de lysine par deux Corynébactéries", Thèse INPL, Nancy, France.
- Sonntag K., Eggeling L., De Graaf A.A., Sahm H.**, (1993), "Flux partitioning in the split pathway of Lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* quantification by ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy", *Eur. J. Biochem.*, 213, 1325-1331.
- Sonntag K., Schwinde J., A. de Graaf A., Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W., Sahm H.**, (1995), " ^{13}C -NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 489-495.
- Stephanopoulos G., Sinskey A.J.**, (1993), "Metabolic engineering - methodologies and future prospects", *Tibtech*, 11, 392-396.
- Stephanopoulos G., Vallino J.J.**, (1991), "Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproductions", *Science*, 252, 1675-1681.
- Sugimoto S.I., Shiio I.**, (1987a), "Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 51, 101-108.
- Sugimoto S.I., Shiio I.**, (1987b), "Regulation of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1257-1263.
- Sugimoto S.I., Shiio I.**, (1989), "Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*", *Agric. Biol. Chem.*, 53 (5), 1261-1268.
- Sung H.C., Tachiki T., Tochikura T.**, (1984), "Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*", *J. Ferm. Technol.*, 62, 371-376.
- Tempest D.W., Neijssel D.M.**, (1992), "Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction", *FEMS Biotech. Lett.*, 100, 169-176.
- Torres N.V.**, (1994), "Application of the transition time of metabolic systems as a criterion for optimization of metabolic processes", *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 291-296.
- Torres N.V., Mateo F., Melendez-Hevia E., Kacser H.**, (1986), "Kinetics of metabolic pathways. A system *in vitro* to study the control of flux", *Biochem. J.*, 234, 169-174.
- Vallino J.J., Stephanopoulos G.**, (1994a), "Carbon flux distributions at the Glucose-6P branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction", *Biotechnol. Prog.*, 10, 327-334.
- Vallino J.J., Stephanopoulos G.**, (1994b), "Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction", *Biotechnol. Prog.*, 10, 320-326.
- Vallino J.J., Stephanopoulos G.**, (1990), "Flux determination in cellular bioreaction networks : applications to lysine fermentations", *Frontiers in bioprocessing*, chapitre 18, Sikdar S.K., Bier M., Todd P. eds, CRC Press (Boca Raton, FL), 205.
- Vallino J.J., Stephanopoulos G.**, (1993), "Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction", *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 633-646.
- Walker T.E., Han C.H., Kollman V.H., London R.E., Matwiyoff N.A.**, (1982), " ^{13}C NMR studies of the biosynthesis by *Microbacterium ammoniaphilum* of L-glutamate selectively enriched with ^{13}C ", *J. Biol. Chem.*, 257, 1189-1195.

- Wang N.S. and Stephanopoulos G.**, (1983), "Applications of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors", *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2177.
- Wojcik F.**, (1992), "Réponse osmotique chez *Corynebacterium glutamicum* : aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires", Thèse de l'Université d'Orsay, Paris, France.
- Yamagushi K., Ishino S., Araki K., Shiharata K.**, (1986), "¹³C-NMR studies of lysine fermentation with a *Corynebacterium glutamicum* mutant", *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2453-2459.
- Yong Soo P., Zhong Ping S., Sumihisa S., Cayuela C., Shinji I., Takeshi K.**, (1993), "Application of fuzzy reasoning to the control of glucose and ethanol concentration in baker's yeast culture.", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 649-655.
- Zadeh L.**, (1965), "Fuzzy sets", *Information and control*, 8, 338-353.
- Zupke C., Stephanopoulos G.**, (1994), "Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices", *Biotechnol. Prog.*, 10, 489-498.
- Zupke C., Stephanopoulos G.**, (1995), "Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and *in vitro* ¹³C NMR", *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 292-303.

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DUSSAP, Professeur, Université Blaise Pascal Aubière,
Monsieur LINDLEY, Chargé de Recherche CNRS (HDR),
INSA/CTBM Toulouse..**

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

Monsieur KUEHM Nicolas

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

**"Modélisation cinétique et métabolique de Corynebacterium
glutamicum : croissance et production du glutamate sous stress
osmotique."**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"

Fait à Vandoeuvre le, **11 Avril 1996**

Le Président de l'IN.P.L.,

NANCY BR
2, AVENUE
FORET-DE
BOITE POS
F - 5 4
VANDOEUVRE

Résumé :

Au cours de ce travail, nous avons cherché à mettre en œuvre et à développer des moyens pour l'analyse cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* en croissance sous stress osmotique et en procédé de production de glutamate.

Dans une première partie, les études cinétiques menées en cultures discontinues ont permis de montrer une diminution de la vitesse spécifique de croissance et du rendement de croissance, une augmentation du niveau intracellulaire de proline et de la production de gaz carbonique lorsque l'osmolarité du milieu de culture augmente. Les cultures en mode semi-continu présentent une phase de croissance puis une phase de production intense de glutamate, caractérisée par une faible croissance, et une augmentation de la production de CO₂. Une deuxième partie, consacrée à la modélisation, nous a permis de structurer les informations collectées par l'expérience dans un modèle cinétique simulant l'effet de la pression osmotique sur la croissance bactérienne. Nous avons ensuite développé un modèle métabolique, dont la méthodologie repose sur un concept original de voies de biosynthèse indépendantes pour chaque métabolite. Elle conduit à l'évaluation et à la répartition des flux carbonés uniquement à partir des données cinétiques extracellulaires. Dans une dernière partie, l'application de cette méthode pour l'analyse métabolique des expériences précédentes a permis de visualiser la répartition du flux dans les différentes voies du métabolisme, en croissance et au cours de la synthèse de glutamate. Il apparaît que la production de cet acide aminé n'est pas limitée par la voie des pentoses phosphates, mais que l'étranglement se situe plutôt au niveau du phosphoénolpyruvate (PEP) et des voies anaplerotiques qui en dépendent, comme la PEP Carboxylase par exemple.

Abstract :

The aim of this work was to develop kinetic and metabolic analysis for the study of *Corynebacterium glutamicum* growth under osmotic upshocks and during glutamate production.

In a first part, kinetic studies were performed in batch cultures. We observed a decrease of the specific growth rate and of the growth yield, and an increase of the proline intracellular pool and of the CO₂ production yield. Fed batch cultures consist of a growth phase and a production one. This latter compared to the growth phase exhibited a slower growth rate and an increase in the CO₂ production yield. In a second part, we organized the experimental data in a structured kinetic model to simulate the effect of osmotic pressure on the bacterial growth. Then we developed a new methodology to evaluate metabolic fluxes through the central metabolism of the *Corynebacteria* on glucose. This methodology is based on the principle of independent synthesis pathway for each metabolite. Applied to our experimental studies in a third part, we were able to visualize carbon distribution within the different metabolic pathways. It appeared that glutamate production is not limited by the pentoses phosphates pathway. We proposed that the bottleneck is located at the phosphoenolpyruvate (PEP) level, and at the depending anaplerotic pathways as PEP Carboxylase for example.