UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE DE METZ

mention microbiologie des eaux

présentée par

JOHAN T'SEYEN

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ

N° inv	19860645
Cote	S/M3 86/30
Loc	Magasin

ELIMINATION DU PHOSPHORE DES EAUX RESIDUAIRES PAR VOIE BIOLOGIQUE

- **Activité de la polyphosphate-kinase;**
- **Utilisation d'une phase acidogène en amont d'un système de type "Phoredox modifié".**

soutenue le 16 décembre 1986 devant le jury composé de:

MM. **J.C. BLOCK**, professeur de l'Université de Metz.

A.F. BOSCHET, chef du département Eaux résiduaires industrielles de l'Agence Financière du Bassin Loire-Bretagne.

B. CAPDEVILLE, Maître Assistant de l'Institut National de Sciences Appliquées à Toulouse.

G.M. FAUP, directeur du département Eaux résiduaires et déchets du Centre de Recherche de la Lyonnaise des Eaux - Degrémont.

Mme. **P. VASSEUR**, professeur de l'Université de Metz.

M. **H. VERACHTERT**, professeur de la Katholieke Universiteit Leuven, Belgique

RESUME.

La lutte contre l'eutrophisation des eaux nécessite l'épuration des eaux résiduaires avant leur rejet dans le milieu naturel. Cette thèse s'inscrit dans une recherche qui a pour but d'améliorer la fiabilité de l'élimination par voie biologique des pollutions carbonées, azotées et phosphorées des eaux résiduaires urbaines. Deux sujets ont été approfondis; le métabolisme bactérien du phosphore et la production de l'acétate (acidogénèse).

L'étude du métabolisme bactérien du phosphore était focalisée sur l'activité de l'enzyme polyphosphate-kinase (ATP- polyphosphate phosphotransférase). Une methode de dosage de l'activité polyphosphate-kinasique a été mise au point pour *Acinetobacter calcoaceticus*. Elle est basée sur la réaction:

$$\text{poly-(P)}_n + \text{AT}^{32}\text{P} \longrightarrow \text{poly-(}^{32}\text{P)}_{n+1} + \text{ADP}.$$

Cette même méthode a été appliquée sur différentes souches bactériennes pures et sur des boues activées.

Certaines souches présentent une activité polyphosphate-kinasique constitutive (entre 0,36 et 4,8 nmoles P .min^{-1}.mg^{-1}prot.). Dans certains cas la polyphosphate-kinase peut être induite par anaérobiose. L'activité polyphosphate-kinasique mesurée dans les boues est toujours faible ($<$ 0,1 nmoles P .min^{-1}.mg^{-1}prot.).

Une installation pilote de laboratoire a permis d'étudier le fonctionnement d'un réacteur acidogène et l'influence de sa présence sur le rendement de l'élimination du phosphore d'une installation de type "Phoredox modifié".

Les essais réalisés sur le réacteur acidogène séparé ont permis d'en caractériser le fonctionnement. Le temps de séjour hydraulique se situe entre 1 et 2,5 heures. La flore de la boue du réacteur acidogène est aérobie-anaérobie facultative. Le seul acide gras volatil produit en quantité mesurable est l'acétate. La quantité d'acétate produite dépend principalement de la quantité de substrat carboné contenue dans l'eau résiduaire.

La cinétique de production d'acétate à partir d'une eau résiduaire urbaine, mesurée lors des essais en discontinu, est de l'ordre de 0,2 mg d'acétate . g^{-1} MS . min^{-1}.

Les essais de couplage du réacteur acidogène au pilote "Phoredox modifié" ont montré que le gain d'élimination de phosphore est faible. Le réacteur acidogène rend l'acidogénèse indépendante de la dénitrification et des paramètres opératoires du système "Phoredox modifié". Il faut cependant souligner qu'un réacteur acidogène ne modifie pas le bilan global de l'utilisation du carbone du système "Phoredox modifié".

MOTS CLEFS:

déphosphatation biologique;
élimination biologique du phosphore;
Acinetobacter calcoaceticus ;
polyphosphate-kinase ;
ATP-polyphosphate phosphotransférase ;
acidogénèse ;
réacteur anaérobie ;
Phoredox modifié.

ABSTRACT (Résumé en anglais).

To control eutrophication in the natural water bodies implies purifying waste waters before they are released into the environment. This thesis contributes to the research on the removal by bacteria of carbon, nitrogen and phosphorus from municipal waste waters. Two points have been studied. In the first part of this work, the phosphorus metabolism of bacteria was investigated, and the activity of the enzyme polyphosphate kinase was measured. In the second part, an acidogenic reactor was studied, and its influence on the phosphorus removal in a Modified Phoredox-type bench scale pilot plant was determined.

A method for measuring polyphosphate kinase activity has been developed for *Acinetobacter calcoaceticus*. The measurements were based on the following reaction:

$$\text{poly-(P)}_n + \text{AT}^{32}\text{P} \longrightarrow \text{poly-(}^{32}\text{P)}_{n+1} + \text{ADP}.$$

The method was applied to a number of bacterial strains and to activated sludge samples. A constitutive polyphosphate kinase activity (between 0.36 and 4.8 nmol $P.min^{-1}.mg^{-1}$prot.) was found in some bacterial strains. In some cases, polyphosphate kinase activity was induced by anaerobiosis. The polyphosphate kinase activity of all activated sludges examined was low (< 0.1 nmoles $P.min^{-1}.mg^{-1}$prot.).

Experiments on a bench scale acidogenic system showed that acetate was the only volatile fatty acid produced in measurable quantities. The quantity of acetate produced mainly depends on the quantity of organic carbon in the influent.

Acetate production kinetics were measured during batch experiments. The initial production rate was about 0.2 mg acetate . g^{-1} SS . min^{-1}.

Improvement in efficiency of phosphorus removal in a Modified Phoredox pilot plant upon coupling after the acidogenic reactor (1 to 2.5 h hydraulic retention time) was minimal. However, the acidogenic reactor makes the acidogenesis independent of the operating conditions of the Modified Phoredox plant.

KEY WORDS :

Biological phosphorus removal;
Acinetobacter calcoaceticus;
Polyphosphatekinase ;
ATP-polyphosphate phosphotransferase ;
Acidogenesis ;
Anaerobic reactor;
Modified Phoredox.

SAMENVATTING (Résumé en néerlandais).

Eén van de belangrijkste middelen ter bestrijding van de eutrofiëring van meren en waterlopen is het zuiveren van afvalwaters alvorens ze te lozen. Deze doktoraatsthesis past in het kader van het onderzoek op de biologische verwijdering van organische stoffen, stikstof en fosfor uit huishoudelijk afvalwater. Twee onderwerpen werden behandeld: in het eerst deel werd de fosforhuishouding bij bacteriën bestudeerd; hiertoe werd de activiteit van het enzyme polyfosfaatkinase (ATP- polyfosfaat fosfotransferase) gemeten. In het tweede deel werd de werking van een acidogeen systeem onderzocht en werd de invloed nagegaan van de aanwezigheid een acidogeen systeem op het rendement van de fosforverwijdering van een piloot van het type "Modified Phoredox".

De methode die ontwikkeld werd om de activiteit van het polyfosfaatkinase te meten maakt gebruik van de volgende reaktie:

$$\text{poly-(P)}_n + \text{AT}^{32}\text{P} \longrightarrow \text{poly-(}^{32}\text{P)}_{n+1} + \text{ADP.}$$

De methode, ontwikkeld voor *Acinetobacter calcoaceticus*, werd toegepast op enkele andere zuivere lijnen van bacteriën en op aktief slib-monsters. Bij enkele bacteriën werd een constitutive activiteit gevonden (van 0,36 tot 4,8 nmol P $.min^{-1}.mg^{-1}$prot.). Bij sommige bacteriën kan het polyfosfaatkinase geïnduceerd worden door een anaërobe periode. De polyfosfaatkinase-aktiviteit van alle slibmonsters was zwak (< 0,1 nmol P $.min^{-1}$ $.mg^{-1}$prot.).

De werking van het acidogeen systeem kan als volgt gekenschetst worden: de hydraulische verblijftijd in de acidogene reactor bedroeg 1 tot 2,5 uur. De flora van de acidogene reactor bestaat uit facultatief aërobe-anaërobe bacteriën. Het enige vluchtige vetzuur dat in belangrijke mate gevormd wordt is acetaat. De hoeveelheid acetaat die gevormd wordt hangt voornamelijk af van de hoeveelheid organische koolstof in het influent.

De kinetische parameters van de acidogenese werden gemeten tijdens batchproeven. De initiële produktiesnelheid van het acetaat bedroeg ongeveer 0,2 mg acetaat . g^{-1} droge stof . min^{-1}.

De proeven waarin de acidogene reactor aan de "Modified Phoredox"-piloot gekoppeld werd tonen aan dat de winst aan fosforverwijdering klein is. In tegenstelling tot de acetaat-produktie in de anaërobe zone van het "Modified Phoredox"-systeem, wordt de produktie van het acetaat in de acidogene reactor niet beïnvloed door de werking van het "Modified Phoredox"-systeem.

SLEUTELWOORDEN :

biologische fosforverwijdering ;
Acinetobacter calcoaceticus;
polyfosfaatkinase ;
ATP-polyfosfaat fosfotransferase ;
acidogenese ;
anaërobe reactor;
Modified Phoredox .

REMERCIEMENTS.

INTRODUCTION GENERALE. 8

PREMIERE PARTIE :
ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE. 11

1.1. INTRODUCTION. 12

1.2. ABSORPTION ET LE TRANSPORT MEMBRANAIRE DU PHOSPHORE. 12

1.3. PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES POLYPHOSPHATES ET LEUR LOCALISATION CELLULAIRE. 16

1.4. BIOCHIMIE DES POLYPHOSPHATES. 18

1.5. REGULATION DU METABOLISME DES POLYPHOSPHATES. 26

1.6. ROLE DES CATIONS DANS LE TRANSPORT ET LE METABOLISME DU PHOSPHORE. 29

1.7. BIOCHIMIE DU POLY-β-HYDROXYBUTYRATE ET LOCALISATION CELLULAIRE. 32

1.8. ROLE PHYSIOLOGIQUE DES POLYPHOSPHATES ET DU POLY-β-HYDROXYBUTYRATE. 35

1.9. TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE. 40

2. MATERIELS ET METHODES. 48

2.1. SOUCHES EMPLOYEES. 49

2.2. BOUES UTILISEES. 49

2.3. CONDITIONS DE CULTURE. 51

2.4. PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE. 51

2.5. DOSAGE *IN VITRO* DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE. 52

2.6. DOSAGE DES PHOSPHATES. 53

2.7. DOSAGE DES PROTEINES. 53

2.8. DOSAGE DES SUCRES. 53

3. MISE AU POINT DE LA METHODE DE DOSAGE. 54

3.1. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN ATP DANS LE MILIEU DE REACTION. 55

3.2. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN POLY-P DANS LE MILIEU DE REACTION. 58

3.3. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CREATINE PHOSPHATE DANS LE MILIEU DE REACTION. 60

3.4. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN ATP DANS LE MILIEU DE REACTION POUR LES ESSAIS AVEC LES BOUES. 62

3.5. ESSAI DE PRETRAITEMENT D'UNE BOUE. 64

4. PROTOCOLES ET RESULTATS. 67

4.1. MESURE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE CONSTITUTIVE. 68

4.2. ESSAI D'INDUCTION DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE PAR UNE CARENCE EN PHOSPHATES. 69

4.3. ESSAI D'INDUCTION DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE PAR DES CONDITIONS ANAEROBIES. 71

4.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE DES EXTRAITS DE BOUES ACTIVEES SANS PRETRAITEMENT. 75

4.5. ESSAI DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE D'ECHANTILLONS AVEC UN "ETALON INTERNE". 77

5. DISCUSSION. 81

5.1. TECHNIQUE DE DOSAGE DE l'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE. 82

5.2. MODELE BIOCHIMIQUE. 84

5.3. ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE MESUREE DANS LES BOUES. 89

5.4. ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE MESUREE CHEZ LES SOUCHES PURES. 91

5.5. CONCLUSIONS. 94

DEUXIEME PARTIE :
UTILISATION D'UNE PHASE ACIDOGENE EN AMONT D'UN SYSTEME DE TYPE "PHOREDOX MODIFIE"

6. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE. 99

6.1. INTRODUCTION. 100

6.2. ALTERNANCE DE CONDITIONS ANAEROBIES/AEROBIES. 102

6.3. IMPORTANCE DU SUBSTRAT CARBONE. 103

6.4. CONTRAINTES IMPOSEES PAR LA NITRIFICATION. 114

6.5. INTERFERENCES DENITRIFICATION / DEPHOSPHATATION. 115

6.6. ZONE ANAEROBIE. 118

6.7. SYSTEMES ACIDOGENES. 125

6.8. BIOCHIMIE DE L'ACIDOGENESE. 127

6.8. ORGANISMES ACIDOGENES. 129

6.10. PRODUITS DE FERMENTATION. 132

7. MATERIELS ET METHODES. 137

7.1. INSTALLATIONS PILOTES. 138

7.2. ALIMENTATION DES PILOTES. 141

7.3. PRISE DES ECHANTILLONS. 144

7.4. TECHNIQUES ANALYTIQUES. 146

7.5. INTERPRETATION DES RESULTATS. 147

8. PROTOCOLES ET RESULTATS. 148

8.1. REACTEUR ACIDOGENE. 148

8.2. PILOTE DE TYPE "PHOREDOX MODIFIE". 156

8.3. ESSAIS EN DISCONTINU. 181

9. DISCUSSION. 193

9.1. SYSTEME DE TYPE "PHOREDOX MODIFIE". 194

9.2. SYSTEME ACIDOGENE. 203

9.3. CONCLUSIONS. 208

CONCLUSIONS GENERALES. 210

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. 214

ANNEXES. 229

1. GLOSSAIRE. 230

2. LISTE DES ABREVIATIONS. 232

3. INTRODUCTION A L'ELIMINATION BIOLOGIQUE DU PHOSPHORE. 234

4. NITRIFICATION: DIMENSIONNEMENT. 239

5. DENITRIFICATION: DIMENSIONNEMENT. 242

6. RESULTATS DES ANALYSES: PILOTE DE TYPE "PHOREDOX MODIFIE". 246

7. RESULTATS DES ANALYSES: "REACTEUR ACIDOGENE". 251

8. DOSAGE DES PROTEINES SELON BRADFORD (1976): GAMMES ETALON. 256

9. FRACTION FACILEMENT BIODEGRADABLE DE LA POLLUTION CARBONEE D'UNE EAU RESIDUAIRE. 257

10. SCHEMAS DES DIFFERENTS PROCEDES D'ELIMINATION DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE PAR VOIE BIOLOGIQUE 259

REMERCIEMENTS.

Je remercie sincèrement M. le Professeur J.C. BLOCK de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être mon directeur de thèse et de l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail.

Je remercie M. G.M. FAUP de l' accueil dans son laboratoire, de ses précieux conseils, et de sa participation au jury de thèse.

Je prie Mme. le Professeur P. VASSEUR, M. A.F. BOSCHET, M. B. CAPDEVILLE, M. le Professeur H. VERACHTERT d'agréer l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Je suis reconnaissant à M. F. FIESSINGER, Directeur de la Recherche et de la Technique à la Lyonnaise des Eaux, et à M. J. BEBIN, Directeur du Centre de Recherche Lyonnaise - Degrémont, d'avoir financé cette thèse.

Mes remerciements sont également adressés à M. H. ANDREARCZYK, qui a initié la recherche sur la polyphosphate-kinase au Centre des Sciences de l'Environnement.

Je remercie Mlle. O. BURLET, Mlle. P. Le FLOHIC, Mlle. D. MALNOU, M. J.M. AUDIC, et M. M. MEGANCK pour leur coopération et pour les discussions fructueuses que nous avons eues.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toutes les personnes du Centre des Sciences de l'Evironnement et du Centre de Recherche de la Lyonnaise des Eaux - Degrémont, qui par leur sympathie, par leur aide pratique ou par leurs conseils m'ont permis d'effectuer mon travail dans les conditions les meilleures.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE.

Les procédés de traitement des eaux résiduaires ont évolué vers une épuration de plus en plus affinée. A l'origine, seule l'élimination de la matière organique et des matières en suspension était visée, puis ont été développées les techniques de l'élimination de l'ammoniaque par nitrification, et celle des nitrates par dénitrification. L'élimination du phosphore par son accumulation dans les boues activées, soit par voie physico-chimique, soit par voie biologique, constitue le terme actuel de cette évolution.

Les procédés de dephosphatation par voie biologique manquent encore de fiabilité. Bien que la technique par voie physico-chimique soit mieux maîtrisée, elle présente deux inconvénients majeurs par rapport à l'élimination biologique: une consommation importante de réactifs et une production de boue supérieure de 25 à 40 % (SCHMIDTKE, 1985). Par conséquent, l'elimination du phosphore par voie biologique suscite actuellement un grand intérêt. Le point commun de tous les procédés de déphosphatation biologique est la succession de phases aérées et de phases non-aérées au cours du traitement. La biomasse séjourne ainsi temporairement dans des conditions anaérobies. La disponibilité de substrat organique pour les bactéries déphosphatantes, en particulier au cours de cette phase anaérobie, est un des facteurs clef du processus de déphosphatation biologique (NICHOLLS, 1979; SIEBRITZ *et al.*, 1983).

Dans le cadre de notre recherche sur la phase anaérobie du traitement, deux sujets ont été approfondis: d'une part l'influence de l'anaérobiose sur le métabolisme du phosphore, et en particulier sur l'activité de l'enzyme polyphosphate-kinase (ATP-polyphosphate phosphotransferase), et d'autre part le fonctionnement d'un réacteur acidogène et son effet sur le rendement d'élimination du phosphore dans une installation pilote de déphosphatation.

Dans la première partie, le métabolisme du phosphore et des polyphosphates au cours d'un traitement de déphosphatation par voie biologique est considéré. Une meilleure maîtrise du conditionnement du métabolisme du phosphore chez les bactéries permettrait d'améliorer le rendement d'élimination du phosphore. L'étude bibliographique traite un sujet un peu plus vaste que la recherche expérimentale; notamment la biochimie des phénomènes de relargage et de réabsorption du phosphore, propres aux procédés d'élimination biologique du phosphore.

La partie expérimentale de cette étude est focalisée sur la polyphosphate-kinase, une enzyme clef du métabolisme des polyphosphates (HAROLD,1966). L'activité de la polyphosphate-kinase est étudiée chez des souches bactériennes pures et dans des boues activées, en particulier lors d'une alternance de conditions anaérobies et aérobies.

La deuxième partie de ce travail est orientée vers la disponibilité et l'utilisation des substrats carbonés par la flore des boues activées déphosphatantes. Un réacteur non-aéré fut développé, et placé en tête d'une chaîne de traitement biologique des eaux résiduaires. Ce réacteur, appelé réacteur acidogène, est destiné à la production d'acétate, molécule facilement assimilable par les bactéries responsables de la déphosphatation. Une installation destinée à l'élimination simultanée des pollutions carbonées, azotées et phosphorées par voie biologique est un système complexe. L'étude bibliographique tend à mettre en évidence l'importance des différents composants qui constituent ce système.

La partie expérimentale de l'étude du réacteur acidogène regroupe les expériences en continu et des essais en discontinu. Les essais en continu, conduits sur une installation pilote, sont destinés à définir les paramètres opératoires du réacteur acidogène. En outre l'influence est étudiée de la présence d'un réacteur acidogène sur le rendement de l'élimination de phosphore d'une installation pilote de type "Phoredox modifié" située en aval. Les essais en discontinu permettent d'étudier la cinétique de l'acidogénèse.

PREMIERE PARTIE :

ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE - KINASE

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU METABOLISME DU PHOSPHORE ET DE L'ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE EN PARTICULIER.

1.1. INTRODUCTION. 12

1.2. ABSORPTION ET TRANSPORT MEMBRANAIRE DU PHOSPHORE. 12

1.3. PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES POLYPHOSPHATES ET LEUR LOCALISATION INTRACELLULAIRE.

1.3.1. La classification chimique des polyphosphates. 16
1.3.2. Les propriétés chimiques et physicochimiques des polyphosphates. 16
1.3.3. La localisation des polyphosphates dans la cellule bactérienne. 17

1.4. BIOCHIMIE DES POLYPHOSPHATES.

1.4.1. Les voies biochimiques menant à la synthèse des polyphosphates. 18
1.4.2. Les voies biochimiques menant à la dégradation des polyphosphates 21

1.5 REGULATION DU METABOLISME DES POLYPHOSPHATES. 26

1.6. ROLE DES CATIONS DANS LE TRANSPORT ET LE METABOLISME DU PHOSPHORE. 29

1.7. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES DU POLY-HYDROXYBUTYRATE ET SA LOCALISATION INTRACELLULAIRE. 32

1.8. ROLE PHYSIOLOGIQUE DES POLYPHOSPHATES ET DU POLY-HYDROXYBUTYRATE. 35

1.9. TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE.

1.9.1. La préparation de l'extrait. 40
1.9.2. La réaction *in vitro* 42

1.ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU METABOLISME DU PHOSPHORE ET DE L'ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE EN PARTICULIER.

1.1. INTRODUCTION.

L'étude portant sur l'activité de l'enzyme polyphosphate-kinase, ou encore ATP - polyphosphate phosphotransférase, s'inscrit dans une recherche plus large sur l'élimination biologique du phosphore des eaux résiduaires. L'étude bibliographique tente de situer le rôle de cette enzyme dans ce contexte plus large.

Seront abordés:

- l'absorption et le transport membranaire du phosphore;
- les propriétés chimiques et physicochimiques des polyphosphates (poly-P) et leur localisation intracellulaire;
- la biochimie des polyphosphates, et
- l'importance de certains cations (K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}) dans le transport et le métabolisme du phosphore.

Puisque certaines données suggèrent une relation entre le métabolisme des polyphosphates et celui du poly-hydroxybutyrate (pHB), les points suivants seront traités:

- les propriétés chimiques et physico-chimiques du poly-hydroxybutyrate et leur localisation intracellulaire;
- la biochimie du poly-hydroxybutyrate, et
- les rôles physiologiques des polyphosphates et du poly-hydroxybutyrate.

Finalement, les aspects techniques seront abordés avec

- les méthodes de dosage de l'activité polyphosphate-kinasique.

1.2. ABSORPTION ET TRANSPORT MEMBRANAIRE DU PHOSPHORE.

Les ions orthophosphates constituent la source de phosphore la plus disponible pour les bactéries. D'autres composés phosphorés sont probablement dégradés avant leur absorption par la cellule. Les phosphatases, enzymes qui dégradent des composés phosphorés en libérant des orthophosphates, sont induites par une carence en orthophosphate. Les phosphatases sont alors partiellement relarguées dans le milieu environnant, où elles exercent leur fonction

(TORRIANI,1960).

Selon FINSTEIN *et* HUNTER (1976), 25 à 85 % du phosphore soluble à l'entrée des stations d'épuration se trouve sous forme d'orthophosphates, et 15 à 75 % sous forme de polyphosphates; la quantité de composés phosphorés solubles serait negligeable. A la sortie des stations de traitement secondaire conventionnel (boue activée ou filtre bactérien), les orthophosphates constituent 60 à 95 % du phosphore total, le reste étant des polyphosphates. Le temps de séjour de l'eau dans les station d'épuration n'a pas été précisé.

Préalablement à leur utilisation, les orthophosphates présents dans le milieu doivent traverser la membrane cellulaire pour pénétrer dans le cytoplasme bactérien. Les phosphates passent la membrane cellulaire par diffusion ou par différents types de transports actifs. Dans le cas d'une diffusion, les ions se déplacent suivant un gradient de concentration ou suivant un gradient électrique. Pour effectuer un transport actif, la cellule doit dépenser une certaine quantité d'énergie (COMEAU *et al.* ,1985; NICHOLLS, 1979).

Suite à une carence en phosphore, ou un séjour dans des conditions anaérobies, certaines bactéries absorbent des quantités importantes de phosphore. Une cinétique d'absorption en deux phases a été reconnue; une phase initiale rapide, l'autre plus lente (MEDVECZKY *et* ROSENBERG, 1971; NICHOLLS, 1979; RAE *et* STRICKLAND, 1976). Une cinétique en deux phases suggère un transport actif.

Le transport des phosphates chez *Micrococcus lysodeicticus* est énergie-dépendant, puisque FRIEDBERG (1977) a démontré sa sensibilité aux inhibiteurs et découplants.

L'existance de deux systèmes distincts pour le transport des phosphates a été démontrée chez *Pseudomonas aeruginosa* (LACOSTE *et al.*, 1981) et chez *Escherichia coli* (ROSENBERG *et al.*,1976; WILLSKY *et al.*,1973). Chez *Escherichia coli*, le premier système de transport est constitutif. La vitesse de transport dépend directement de la concentration en phosphates. Ce système est sensible à l'action de découplants (dinitrophénol, carbonylcyanide-m-chlorophényl-hydrazone (CCCP)). Le deuxième système est induit par une carence en phosphore. Ce système a une grande affinité pour les phosphates. Il met en oeuvre une protéine périplasmique pour le transport des phosphates du milieu extérieur vers le cytoplasme.

CARBERRY *et* TENNEY (1973) ont suggéré l'existence de deux systèmes de transport dans des boues activées. A partir d'un certain degré d'accumulation de phosphore, un système de cotransport K^+/ HPO_4^{2-} serait responsable de l'absorption supplémentaire. Peu de précisions sont données: ni le type de bactéries concernées, ni la concentration seuil en phosphore à laquelle le système de cotransport s'active ont été déterminés.

Dans d'autres cas, un seul système de transport a été décrit. HAROLD *et* SPITZ (1975) ont montré l'existance d'un système antiport $H_2PO_4^-$ / OH^- chez *Streptococcus faecalis*.

D'autres chercheurs ont une approche plus cinétique que mécanistique.

LEVIN *et* SHAPIRO (1965) ont reconnu deux phases dans la cinétique d'absorption du phosphore (Fig. 1.1). La phase initiale est rapide, et suivie d'une phase caractérisée par une vitesse décroissante. NICHOLLS (1979) considère également que l'absorption des phosphates en aération a lieu en deux phases: l'une initiale rapide, durant de 30 à 50 minutes, l'autre plus lente, durant au moins 100 minutes. L'auteur estime que la phase rapide représente l'absorption du phosphore relargué en anaérobie et la reconstitution du stock de poly-P par le mécanisme "overplus" (§ 1.5). La phase plus lente aurait lieu lors d'une synthèse ralentie d'acides nucléiques, et est considérée par NICHOLLS (1979) comme "luxury uptake" (§ 1.5).

MEDVECZKY *et* ROSENBERG (1971) attribuent la phase lente d'absorption au métabolisme normal en aération. Au cours de la phase initiale, cette absorption lente serait masquée par une absorption rapide. RAE *et* STRICKLAND (1976) décrivent également deux phases d'absorption de phosphates suite à une carence en phosphore. Les deux phases mettraient en oeuvre deux systèmes de transports différents. Cependant, les caractéristiques des systèmes de transport de RAE *et* STRICKLAND (1976) d'une part, et de ROSENBERG *et al.* (1976) et WILLSKY *et al.* (1973) d'autre part ne correspondent pas. En effet, la sensibilité pour certains découpleurs et inhibiteurs est différente; par exemple, des découpleurs comme le CCCP ou le dinitrophénol n'affectent qu'un des systèmes de transport décrit par ROSENBERG *et al.* (1976) et par WILLSKY (1973), mais affectent la cinétique des deux phases décrites par RAE *et* STRICKLAND (1976).

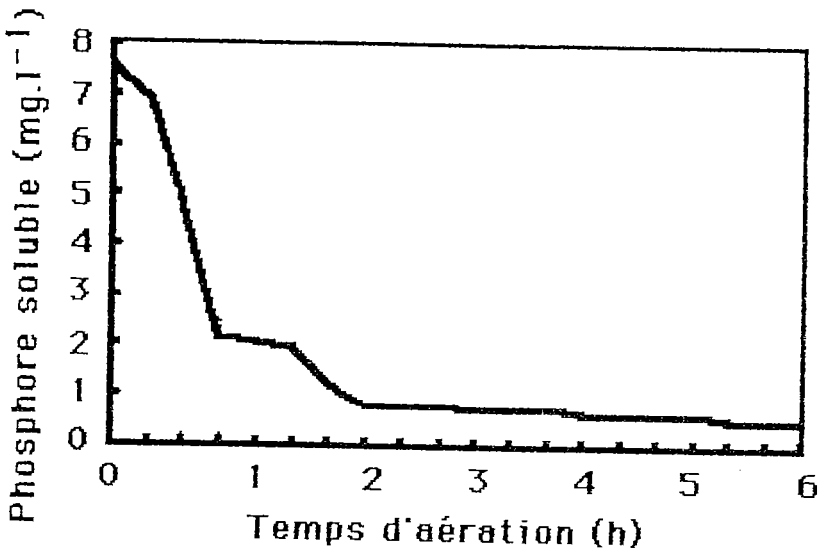


Fig. 1.1. Absorption du phosphore par une boue aérée en fonction du temps. La concentration en boues n'est pas précisée. D'après LEVIN *et* SHAPIRO (1965).

Une vitesse décroissante dans le temps de l'absorption de phosphore a également été décrite par HALL *et* ENGELBRECHT (1977), puis par FUHS *et* CHEN (1975), sans distinction de deux phases, cette fois. De même, l'existence de deux phases n'a pas été reconnue par MALNOU *et al.* (1983). Ces derniers ont travaillé sur un pilote du type "Phoredox modifié", et la présence d'une zone anoxique (§ 6.1) a pu perturber la cinétique d'absorption du phosphore.

Fréquemment, lors du transport des phosphates, simultanément un transport de cations (Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}) est observé. Ce phénomène est traité dans le § 1.6.

1.3. PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES POLYPHOSPHATES ET LEUR LOCALISATION INTRACELLULAIRE.

Les données relatives aux propriétés chimiques et biochimiques proviennent essentiellement des publications de DAWES *et* SENIOR (1973); EBEL *et al.* (1955); HAROLD (1966) et KULAEV *et al.* (1979).

1.3.1 La classification chimique des polyphosphates.

Les polyphosphates peuvent être classés en trois catégories: les métaphosphates, les polyphosphates linéaires et les ultraphosphates.

Les metaphosphates

A tort, tous les phosphates condensés ont été appelés "métaphosphates" (KORNBERG, 1957; MUHAMMED *et al.*, 1959). Les métaphosphates proprement dits sont des structures cycliques (HAROLD, 1966).

Les polyphosphates linéaires.

Il s'agit de chaînes de phosphates condensés. Le degré de polymérisation (le nombre de monomères condensés, n) peut aller de 2 à 10^6. Le dimère s'appelle pyrophosphate. Les polyphosphates linéaires seront appelés simplement "polyphosphates" ou "poly-P". Le "sel de Graham", utilisé au cours de la présente étude (§ 2.4) est un polyphosphate de sodium amorphe. C'est un mélange de polyphosphates de différentes longueurs de chaîne (n = 22). Le sel de Graham peut contenir en plus de très faibles quantités de métaphosphates (EBEL *et al.*, 1955).

Les ultraphosphates.

Les ultraphosphates sont des polymères ramifiés de phosphates. Les liaisons latérales sont très vite hydrolysées dans un milieu aqueux.

1.3.2. Les propriétés chimiques et physicochimiques des polyphosphates.

Le polyphosphate de sodium est bien soluble, mais les polyphosphates de Mg et d'autres ions divalents le sont moins.

Le poly-P s'hydrolyse lentement à température ambiante et à pH neutre; la demie-vie est supérieure à 25 ans. A une température plus élevée et à un pH acide, la vitesse d'hydrolyse est plus élévée (HAROLD, 1966). L'hydrolyse de la liaison anhydrique - P - O - P - libère entre 9 et 10 kcal par mole (DAWES *et* SENIOR, 1973; KULAEV *et al.*, 1979).

Retenons finalement les caractéristiques suivants des polyphosphates (HAROLD 1966):

- Les solutions aqueuses sont visqueuses; cette propriété impose des précautions au manipulateur pour l'homogéinisation du milieu d'essai;

- Les poly-P complexent très facilement d'autres polymères, et spécialement les protéines. En milieu acide, ces complexes peuvent précipiter à cause des interactions du genre polyanion - polyanion. A cause de cette propriéte le dosage des protéines peut être influencé par la présence de polyphosphates (§ 2.7);

- Les polyphosphates complexent des ions métalliques.

1.3.3. La localisation des polyphosphates dans la cellule bactérienne.

Les phosphates sont généralement stockés dans le cytoplasme sous forme de granules. Différents arguments démontrent que ces granules métachromatiques, ou volutine, ou encore granules de BABES-ERNST constituent la forme de stockage des poly-P.

- des bactéries qui n'accumulent pas de poly-P ne possèdent pas ces granules (HAROLD *et* HAROLD, 1963);

- L'accumulation et la disparition des granules observées en microscopie électronique sont corrèlées avec l'accumulation et la dégradation de poly-P mises en évidence par voie analytique (FLORENTZ *et al.*, 1983 ; FLORENTZ *et al.*, 1984);

- les granules peuvent être colorés de la même façon que les poly-P inorganiques (KULAEV 1979, EBEL *et* MÜLLER, 1958; WIDRA, 1959), mais certaines autres inclusions (par ex. le pHB) peuvent se colorer également (KULAEV, 1979; HAROLD,1966);

- BUCHAN (1981,1983) a démontré à l'aide d'analyses aux rayons X (EDAX: Analyse de la Dispertion d'Energie de rayons X) que les granules visibles en microscopie éléctronique constituent des régions à forte teneur en phosphore.

Chez les bactéries, les granules de polyphosphate ne sont pas séparés du cytoplasme par une membrane. Cependant, ils peuvent être entourés d'une couche lipidique (FRIEDBERG *et* AVIGAD, 1968; DEINEMA *et al.*, 1980). Dans certains cas, les granules semblent être associés à d'autres structures cytologiques comme le nucléoide (HAROLD, 1966).

Apparemment amorphes en microscopie électronique, l'organisation exacte des granules n'est pas tout à fait élucidée. Selon WIDRA (1959), les granules de poly-P contiendraient

en plus: de l'ARN, des lipides, des protéines et des cations. Puisque les poly-P sont des poly-anions, ils sont stabilisés par des cations comme Mg^{2}, K^{+} ou Ca^{2+} (BUCHAN, 1983). Les cations stabilisateurs peuvent être identifiés indirectement par leur transport avec le phosphore lors du processus de relargage et de réabsorption (§1.6).

1.4. LA BIOCHIMIE DES POLYPHOSPHATES

La biochimie des polyphosphates, objet d'importantes recherches dans les années soixante, n'est pas encore très bien connue. L'accumulation de poly-P a été observée dans un grand nombre de micro-organismes: bactéries, champignons, levures, algues; mais également dans certaines cellules de mammifères (KULAEV *et* YAGABOV, 1983). Cependant, l'unicité des voies biochimiques et leur régulations entre ces différents groupes n'est pas prouvée.

En raison de la prédominance des bactéries dans les boues d'une station d'épuration, nous nous limiterons principalement à la biochimie des polyphosphates chez les bactéries. Seront traitées successivement: les voies biochimiques de synthèse, puis celles de la dégradation des polyphosphates. Ensuite sera étudiée la régulation du métabolisme. Les fonctions présumées et démontrées des poly-P feront l'objet du § 1.9.

1.4.1. Les voies menant à la synthèse des polyphosphates.

Au moins deux réactions enzymatiques peuvent intervenir dans la synthèse des poly-P. La première est catalysée par la polyphosphate-kinase, la deuxième par la 1,3 - diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase. Les réactions de synthèse des polyphosphates, ainsi que l'organisme dans lequel la réaction a été détectée, sont rassemblés dans les tableaux 1.1 et 1.2.

(a) La poly-phosphate-kinase ou ATP-polyphosphate-phosphotransférase.

L'activité de cette enzyme a été mise en évidence par YOSHIDA *et* YAMATAL (1953). Elle catalyse la réaction:

$$\text{poly-(P)}_{n} + \text{ATP} \longrightarrow \text{poly-(P)}_{n+1} + \text{ADP}.$$

KORNBERG (1959), étudiant cette enzyme chez *Escherichia coli* a montré que son action est Mg^{2+} dépendante, et inhibée par l'ADP. Chez *E. coli*, comme chez *Corynebacterium* (KORNBERG, 1957), la réaction est réversible. HAROLD *et* HAROLD (1963) et HAROLD (1964) ont observé que des mutants d'*Enterobacter* polyphosphate-kinase - sont incapables de synthétiser le polymère, et en ont déduit que cette enzyme catalyse une voie de synthèse unique. L'enzyme extraite de *Salmonella*, purifiée par MÜLRADT (1971) a des propriétés semblables à l'enzyme d'*E. coli* décrite par KORNBERG (1959): réversible et inhibée par l'ADP. Le tableau 1.1 rassemble les travaux qui ont mis en évidence la synthèse des polyphosphates à partir de l'ATP.

Tableau 1.1. La synthèse des polyphosphates catalysée par l'ATP-polyphosphate-phosphotransférase (polyphosphate-kinase).

Référence	Organisme	Réaction
YOSHIDA *et* YAMATAKA, 1953	levure	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
HOFFMANN-OSTENHOF, 1954	levure	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
KORNBERG *et al.* 1956	*E. coli*	ATP $\rightleftharpoons$ ADP + poly-P
MUHAMMED, 1961	*Corynebacterium*	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
HAROLD *et* HAROLD, 1963	*Enterobacter*	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
SUZUKI *et al.*, 1972	*E. coli*; *Mycobacterium*	ATP $\rightleftharpoons$ ADP + poly-P
LI *et* BROWN, 1973	*E. coli*	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
LEVINSON *et al.*, 1975	*Arthrobacter*	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P
FELTER *et* STAHL, 1975	levure	ATP + poly-P_n $\longrightarrow$ ADP + poly-P_{n+1}
SHABALIN *et al.*, 1977	levure	ATP $\rightleftharpoons$ ADP + poly-P
VAILLANCOURT, 1978	*Anacystis*	ATP $\longrightarrow$ ADP + poly-P

$\rightleftharpoons$ réaction réversible; $\longrightarrow$ réversibilité non démontrée; ? réaction utilisée inconnue; ATP + poly-P_n : utilisation de poly-P synthétique.

(b) La 1,3 - diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase.

Une toute autre voie a été décrite par KULAEV (1975) et KULAEV *et* VAGABOV (1983) chez plusieurs autres organismes (tableau 1.2). Cette voie est caractérisée par la réaction:

$$\begin{array}{l} COO-P \\ CHOH \\ CH_2O-P \end{array} + \text{poly-}P_n \longrightarrow \begin{array}{l} COOH \\ CHOH \\ CH_2O-P \end{array} + \text{poly-}P_{n+1}$$

Cette enzyme est inhibée par l'ADP, l'ATP et par 2 mM de iodoacétate, mais le 2,4 - dinitrophénol reste sans effet. L'activité est stimulée par l'addition de fructose - 1,6 - diphosphate, aldolase, glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase et NAD.

Chez les organismes où les deux voies (polyphosphate-kinase et diphosphoglycérate - poly-P - phosphotransférase) sont présentes (notamment chez *E. coli, Micrococcus lysodeikticus* et *Propionibacterium shermanii*), l'activité polyphosphate-kinasique est supérieure. Dans la plupart des cas, la voie catalysée par le 1,3 - diphosphoglycérate - polyphosphate-phosphotransférase paraît de seconde importance.

Tableau 1.2. La voie de synthèse des polyphosphates catalysée par la 1,3 - diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase.

Référence	Organisme	Réaction
KULAEV (1975)	levure	1,3DPGA + $polyP_n$ $\longrightarrow$ 3PGA + $polyP_{n+1}$
KULAEV *et* VAGABOV (1983)	*Escherichia* *Micrococcus* *Propionibacterium* *Bdellovibrio*	1,3DPGA + $polyP_n$ $\rightleftharpoons$ 3PGA + $polyP_{n+1}$

1,3DPGA : acide 1,3-diphosphoglycérique ; 3PGA : acide 3-phosphoglycérique.

1.4.2. Les voies biochimiques menant à la dégradation des polyphosphates.

Les voies biochimiques de dégradation des polyphosphates sont nombreuses. Elles sont catalysées par une des enzymes suivantes: l'ATP-polyphosphate-phosphotransférase, la polyphosphate-AMP-phosphotransférase, une des polyphosphate-hexokinases ou une des hydrolases.

(a) L'ATP-polyphosphate-phosphotransférase.

La "réaction inverse" catalysée par la polyphosphate-kinase peut s'écrire:

$$\text{poly-(P)}_{n+1} + \text{ADP} \longrightarrow \text{poly-(P)}_{n} + \text{ATP}$$

En effet, la principale enzyme de synthèse des polyphosphates (HAROLD,1966) catalyse une réaction qui est réversible dans les conditions expérimentales décrites par certains auteurs (KORNBERG *et al* , 1956; SUZUKI *et al* , 1972; SHABALIN*et al* , 1977). Quelques auteurs ont mesuré uniquement la réaction de dégradation du poly-P (SURESH *et al* , 1984, SUZUKI *et al* ,1972). Le tableau 1.3 rassemble les organismes utilisés dans les expériences de plusieurs auteurs et les réactions mises en évidence.

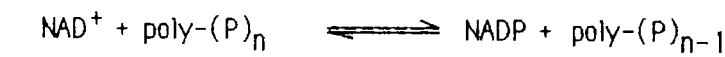
Tableau 1.3. La voie de dégradation des polyphosphates catalysée par la polyphosphate-kinase.

Référence	Organisme	Réaction
HOFFMANN-OSTENHOF, 1954	levure	ADP + poly-P $\longrightarrow$ ATP
KORNBERG *et al.* 1956	*E. coli*	ADP + poly-P $\rightleftharpoons$ ATP
HUGHES *et al.* , 1963	algue	ADP + poly-P $\longrightarrow$ ATP
HAROLD *et* HAROLD,1963	*Enterobacter*	ADP + poly-P $\longrightarrow$ ATP
SUZUKI *et al.* ,1972	*E. coli*	ADP + poly-P $\rightleftharpoons$ ATP
SURESH *et al.*, 1984	*Pseudomonas*	ADP + poly-P $\longrightarrow$ ATP

$\rightleftharpoons$ réaction réversible; $\longrightarrow$ réversibilité non prouvée

(b) La NAD^+-kinase polyphosphate dépendante.

MURATA *et al.* (1980), cité par KULAEV *et* VAGABOV (1983) ont mis en évidence la réaction suivante:

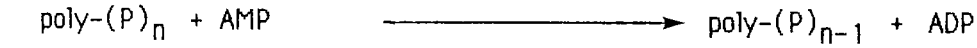


$$NAD^+ + poly\text{-}(P)_n \rightleftharpoons NADP + poly\text{-}(P)_{n-1}$$

Cette réaction est catalysée par la NAD^+-kinase polyphosphate dépendante. Il n'est pas clair si le substrat que MURATA *et al.* (1980) ont décrit comme "métaphosphate" consistait en polyphosphate linéaire ou en métaphosphate. La NAD^+-kinase polyphosphate (ou métaphosphate) dépendante a été détecté chez *Acetobacter, Achromobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Micrococcus*, mais on ne l'a pu détecter chez *Escherichia, Proteus* ou *Aerobacter*.

(c) La polyphosphate-AMP-phosphotransférase.

Cette enzyme catalyse la réaction:



$$poly\text{-}(P)_n + AMP \longrightarrow poly\text{-}(P)_{n-1} + ADP$$

Le transfert d'un groupement phosphate de poly-P à l'AMP a été observé dans certaines conditions expérimentales (DIRHEIMER *et* EBEL, 1965; SZYMONA, 1962; WINDER *et* DENNENY, 1957), mais le K_m élévé pour l'AMP (20 mM, DIRHEIMER *et* EBEL, 1965) suggère que cette voie ne joue qu'un rôle mineur dans des conditions physiologiques normales. Le tableau 1.4 rassemble les organismes employés dans les expériences des différents auteurs ainsi que les réactions mises en évidence.

(d) La 1,3 - diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase.

La réversibilité de la réaction de synthèse de polyphosphate par la 1,3-diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase n'avait pas été démontré pour une levure (KULAEV, 1975; Tab. 1.2), mais les enzymes des bactéries examinées (*Escherichia, Micrococcus, Propionibacterium* et *Bdellovibrio* ; Tab.1.2), semblent pouvoir catalyser la réaction de dégradation.

Tableau 1.4. Observations de l'activité du polyphosphate-AMP-phosphotransferase.

Référence	Organisme	Réaction
WINDER *et* DENNENY (1957)	*Mycobacterium*	poly-P + AMP ⇌ ADP
KULAEV (1983)	*Corynebacterium*	*id.*
DIRHEIMER *et* EBEL (1965)	*Mycobacterium*	*id.*

(e) Les polyphosphate-hexokinases.

La polyphosphate-glucokinase catalyse la réaction suivante (SZYMONA *et al.* ,1967; DIRHEIMER *et* EBEL, 1962):

$$\text{Glucose} + \text{poly-(P)}_n \longrightarrow \text{Glucose-6-(P)} + \text{poly-(P)}_{n-1}$$

Cette réaction nécessite le Mg^{2+} comme cofacteur.

Il est intéressant de noter que toutes les souches étudiées par SZYMONA *et al.* (1967) possédaient également l 'ATP - glucosekinase. Cette observation montre l'existence de deux voies parallèles de phosphorylation du glucose. Le tableau 1.5 présente les organismes employés dans les expériences des auteurs, ainsi que les réactions mises en évidence.

Tableau 1.5. Les voies de dégradation des polyphosphates menant à la phosphorylation des hexoses.

Référence	Organisme	Réaction
SZYMONA, 1962	*Corynebacterium*	G + poly-P → G-6-P
SZYMONA *et* OSTROWSKI, 1964	*Mycobacterium*	G + poly-P → G-6-P
SZYMONA *et* SZUMILO, 1966	*Mycobacterium*	F + poly-P → F-6-P
SZYMONA *et al., 1967*	*Proactinomyces* *Actinomyces*	G + poly-P → G-6-P
URYSON *et* KULAEV, 1968	*Micrococcus* *Staphylococcus* *Streptococcus* *Proprionibacterium*	G + poly-P → G-6-P *id.* *id.* *id.*
MURATA *et al.*, 1978	*Achromobacter*	G + poly-P → G-6-P

G : glucose; G-6-P : glucose - 6 - phosphate; F : fructose; F-6 -P : fructose - 6 - phosphate.

(f) Les hydrolases.

KULAEV *et* VAGABOV (1983) distinguent deux types d'hydrolases: les polyphosphate-phosphohydrolases et les polyphosphate-polyphosphohydrolases (Tab. 1.6).

Tableau 1.6. La dégradation des polyphosphates catalysée par les hydrolases.

Référence	Organisme	Réaction
MUHAMMED *et al.*, 1959	*Corynebacterium*	poly-P ⟶ P_i
LANGEN *et al.*, 1962	levure	poly-P ⟶ 2 poly-P
LISS *et* LANGEN, 1962	levure	poly-P ⟶ 2 poly-P
HAROLD *et* HAROLD, 1965	*Enterobacter*	poly-P ⟶ P_i

Les polyphosphate-phosphohydrolases ou polyphosphatases hydrolysent les poly-P en libérant des orthophosphates. Probablement, différentes enzymes existent, avec une plus ou moins grande spécificité en fonction de la longueur de la chaîne. La réaction générale s'écrit (KULAEV *et* VAGABOV , 1983) :

$$\text{poly-(P)}_n \longrightarrow \text{poly-(P)}_{n-1} + \text{(P)}$$

MUHAMMED *et al.* (1959) ont trouvé une enzyme qui hydrolyse spécifiquement des poly-(P) de hauts poids moléculaires (PM). Lors de la dégradation des poly-P, il n'y a pas de formation de chaînes de faible PM. Notons finalement que Mg^{2+} inhibe la réaction dans un cas (MUHAMMED *et al.* , 1959) et la stimule dans un autre (HAROLD *et* HAROLD, 1965).

Les polyphosphate-polyphosphohydrolases clivent les chaînes de poly-P de hauts PM en chaînes plus courtes (KULAEV *et* VAGABOV, 1983):

$$\text{poly-(P)}_n \longrightarrow \text{poly-(P)}_x + \text{poly-(P)}_{n-x}$$

Chez les levures les longues chaînes de poly-P semblent être formées à partir d'ATP. Ces longues chaînes seraient alors des précurseurs des chaînes plus courtes (KULAEV *et* VAGABOV, 1983) (Tab 1.6). Chez les bactéries, cette voie n'a jamais été mise en évidence. Les observations de MINO *et al.* (1984) indiquent également l'absence de cette voie. En effet, ils n'ont pu démontrer un échange isotopique entre les phosphates de hauts PM et ceux de faibles PM.

1.5. LA REGULATION DU METABOLISME DES POLYPHOSPHATES.

Notre connaissance de la régulation des voies de synthèse et de dégradation des poly-P est incomplète. Elle est principalement basée sur les travaux importants de l'équipe de HAROLD sur *Enterobacter aerogenes* (alors encore appelé *Aerobacter aerogenes* ; HAROLD, 1963; HAROLD *et* HAROLD, 1963, 1965). La régulation des trois enzymes - clé (phosphatase alkaline, polyphosphatase et polyphosphate-kinase) est résumée sur la figure 1.3 .

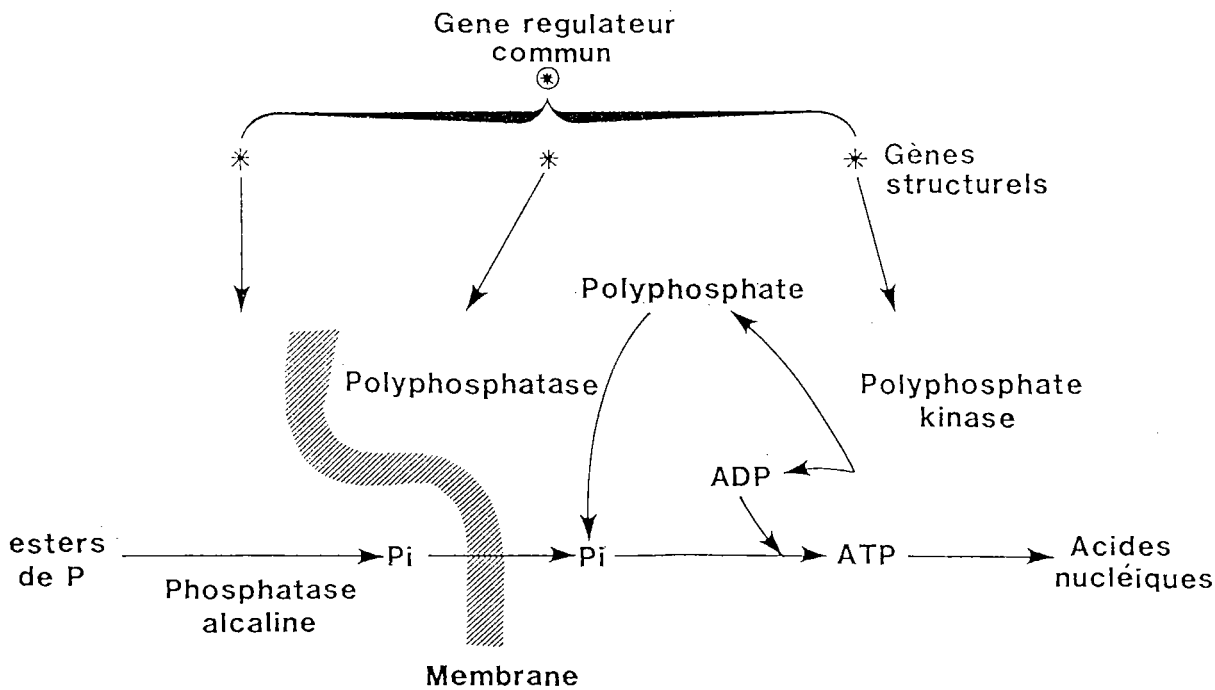


Fig 1.3. Schéma du métabolisme des polyphosphates chez *Enterobacter* et sa régulation génétique. D'après HAROLD *et* HAROLD (1965).

Selon HAROLD *et* HAROLD (1965), l'unique voie de synthèse de poly-P est catalysée par la polyphosphate-kinase. Le contrôle de la quantité de poly-P présente dans la cellule est exercé à la fois par la présence et par l'activité des enzymes. HAROLD *et* HAROLD (1965) avancent l'hypothèse que les synthèses des trois enzymes-clé (phosphatase alkaline, polyphosphatase et polyphosphate-kinase) sont controlées par le même gène

régulateur, mais que les gènes codant pour leur synthèse ne se trouveraient pas dans le même opéron.

La quantité de polyphosphate-kinase présente dans la cellule dépend de l'équilibre entre ses vitesses de synthèse et de dégradation.

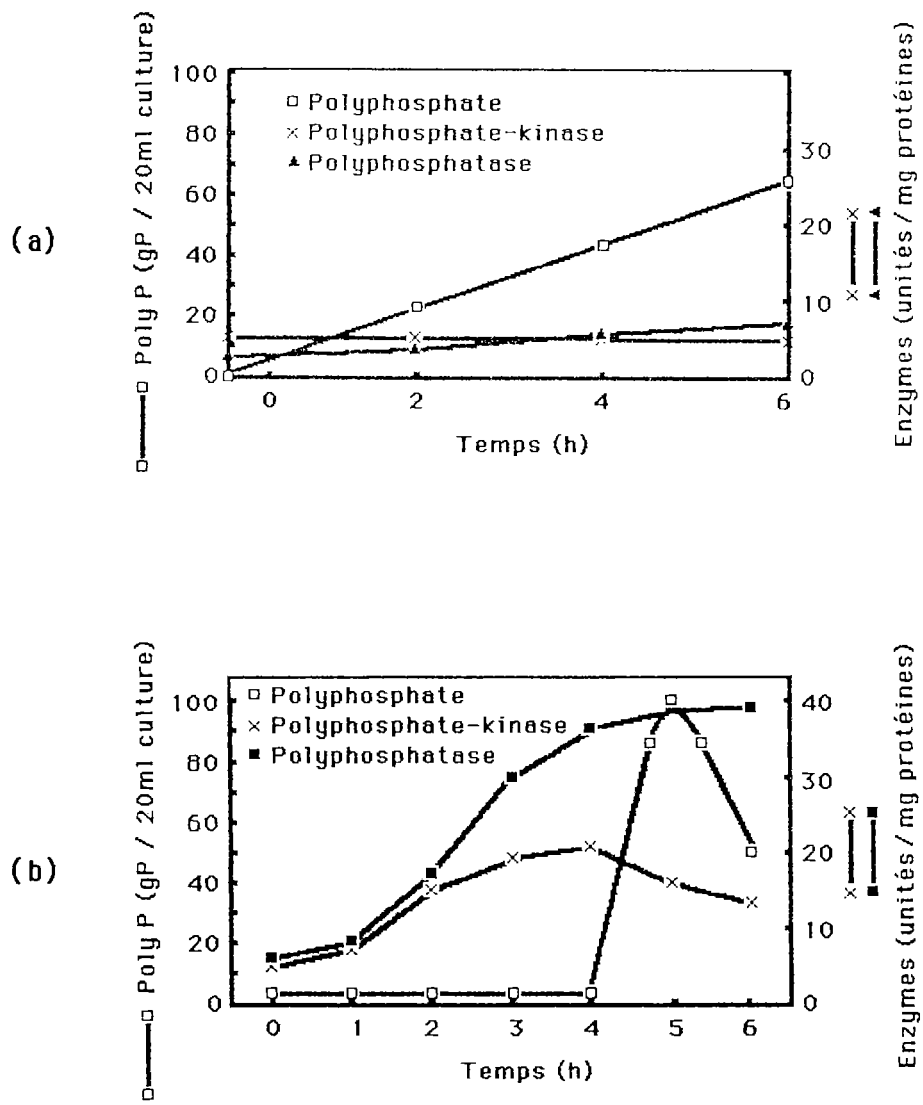


Fig. 1.4. Accumulation de polyphosphates chez *Enterobacter*. Le "luxury uptake" dans des conditions d'une carence en soufre (a), et le "phosphate overplus" suit à une carence en phosphore (b); ajout de phosphates à t = 4 h). D'après HAROLD (1964).

Même si la polyphosphate-kinase est présente, elle est en compétition pour son substrat, l'ATP, avec toutes les autres utilisations de l'ATP. La quantité de poly-P formée ne dépend donc pas exclusivement de l'activité potentielle de la polyphosphate-kinase, mais également de la quantité d'ATP disponible.

HAROLD (1966) distingue deux types de "accumulation pléthorique" intracellulaire de phosphore (c.à d., une accumulation de phosphore en excès des besoins courants de la cellule): le "luxury uptake" et le "phosphate overplus" , également appelé "overplus compensation". Dans les deux cas, un déséquilibre nutritionnel en est l'origine.

Le " **luxury uptake**" ou "**assimilation excédentaire**" a lieu quand la synthèse d'acides nucléiques est bloquée par la carence en un métabolite essentiel, par exemple le soufre. Les activités polyphosphate- kinasique et polyphosphatasique n'augmentent pas (Fig. 1.4). L'accumulation de poly-P peut être expliquée au mois partiellement par la compétition plus faible pour l'ATP. Quand l'élément essentiel redevient disponible, la croissance peut reprendre, la synthèse de poly-P diminue et sa dégradation est accelérée. Les orthophosphates libérés peuvent être utilisés pour la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides etc....

Dans le cas du "**overplus compensation**" ou "**surcompensation de la carence en phosphore**", l'accumulation de polyphosphates est induite par une privation préalable des sources de phosphore. Lors de cette privation, l'activité polyphosphate-kinasique augmente, tout comme l'activité polyphosphatasique. Quand des orthophosphates sont introduits dans le milieu, ils sont vite absorbés et stockés sous forme de poly-P. Ce phénomène a été nommé "phosphate overplus compensation" en traduction du "Phosphat Überkompensation" de LISS *et* LANGEN (1962).

La régulation de la dégradation des polyphosphates a été étudiée moins en détail. D'une part, la réaction:

$$ATP + poly-(P)_n \rightleftharpoons ADP + poly-(P)_{n+1}$$

semble souvent réversible (§ 1.4); le sens de la réaction pourrait alors être déterminé par le rapport ATP/ADP (KORNBERG, 1959). D'autre part, comme chez *Enterobacter aerogenes*, la dégradation des polyphosphates peut être régulée par le biais de la

polyphosphatase. La régulation des polyphosphatases n'est pas connue en détail. Aussi peut-on se demander comment les activités polyphosphatasique et polyphosphate-kinasique sont différenciées, la synthèse des deux enzymes étant régulée par le même gène? Il semble probable que le concentration en orthophosphate influence l'équilibre de la réaction catalysée par la polyphosphatase.

D'autres voies de dégradation sont connues dans des cas bien précis (§ 1.4), mais leurs mécanismes de régulation n'ont pas été rapportés.

1.5. LE ROLE DES CATIONS DANS LE TRANSPORT ET LE METABOLISME DU PHOSPHORE.

Les cations (Na^+ , Ka^+ , Ca^+ , Mg^+) interviennent à plusieurs niveaux dans le métabolisme des polyphosphates. Les cations sont indispensables pour neutraliser les charges négatives, mais certains jouent également un rôle d'activateur pour un grand nombre d'enzymes. Dans le cadre du traitement des eaux résiduaires, les cations ont été étudiés sous deux angles: dans les phénomènes de transport, et dans leur association avec les polyphosphates dans les granules métachromatiques.

Très souvent, un transport de cations parallèle à celui des ions phosphates a été observé. Le tableau 1.7 résume les principaux ions déterminés.

Il faut noter que les valeurs rapportés par OLSON *et* CONNEL (1971) pour l'absorption de Mg^{2+} en aérobiose correspondent aux valeurs du relargage de Mg^{2+} en anaérobiose. Par contre, les quantités de Ca^{2+} relarguées en anaérobiose ne correspondent pas à celles absorbées en aérobiose. CARBERRY *et* TENNEY (1973) soulignent l'importance des cations monovalants et notamment du Na^+ et du K^+ pour l'absorption du phosphore par les boues, toutefois sans établir une relation mathématique entre les quantités de cations et de phosphates, et sans préciser la quantité de phosphore accumulée dans les boues.

RENSINK *et* DONKER (1984) ont étudié l'évolution des concentrations de Ca, Mg et K au cours d'un traitement dans un pilote du type A /O (aérobie - anaérobie). Les résultats sont présentés sur la figure 1.5.

Tableau 1.7. Rapports molaires des cations et phosphates relargués ou absorbés au cours des traitements biologiques anaérobies-aérobies.

Référence	Mg^{2+} / P	K^+ / P	Ca^{2+} / P
ARYIN *et* KRISTENSEN, 1984	0,32	0,23	/
COMEAU *et al.*, 1985	0,24 - 0,28	0,20 - 0,34	0,06 - 0,12
FUKASE *et al.*, 1984	0,32	0,28	0,25
GERBER *et* WINTER, 1984	0,25	0,25	$
MEGANCK (comm. pers.)	0,30	-0,42	-1,32
MIYAMOTO-MILLS *et al.*, 1983	0,26	0,27	/
OLSON *et* CONNEL, 1971 (1)	0,27 - 0,35	/	0,06 - 0,11
(2)	0,28 - 0,38	/	0,17 - 0,67

$: aucune correlation entre le transport du Ca et du P ; / : pas de données disponibles; (1) et (2): différentes expériences.

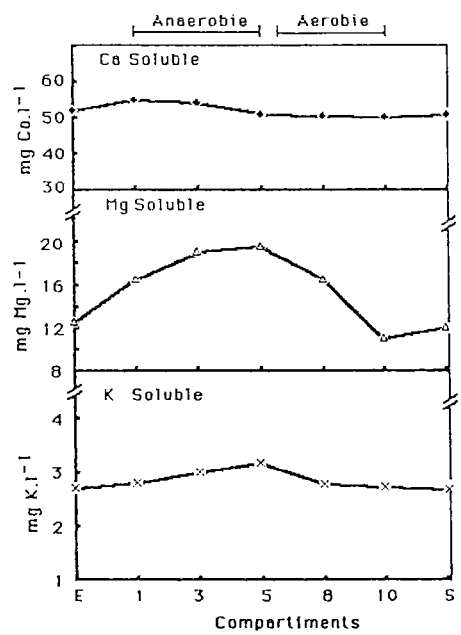


Fig. 1.5. Evolution des concentrations en Ca, Mg et K solubles au cours d'un traitement aérobie - anaérobie en vue d'une élimination biologique du phosphore. D'après RENSINK *et* DONKER (1984).

On peut en déduire un échange important d'ions Mg^{2+} , et en moindre mesure de Ca^{2+} et de K^{+} entre la boue et le liquide environnant, correlé avec celui des phosphates.

Les chiffres rapportés par les différents chercheurs pour les échanges de Mg^{2+} et de K^{+} sont assez cohérents: le rapport molaire Mg / P se situe le plus souvent entre 0,27 et 0,32, celui de K /P entre 0,23 et 0,28 , tandis qu'il est difficile de trouver une relation entre l'évolution des ions phosphates et des ions Ca^{2+}.

D'autre part, des chercheurs ont dosé les cations dans les boues des réacteurs (Tab.1.8). Les valeurs de KAINRATH (comm. pers.) portent sur 80 observations, faites sur des échantillons prélevées dans les zones aérobie, anoxique et anaérobie d'un pilote de type Phoredox modifié.

Tableau 1.8. Rapports molaires entre trois cations et les phosphates dans les boues.

Référence		conditions	Mg / P	K / P	Ca / P	%P
ARVIN *et* KRISTENSEN, 1984		n-A, fixée	/	/	1,7	7,4 - 9,3
FUKASE *et al.*, 1984	(1)	n-A, libre	0,333	0,281	0,054	2,15
	(2)	A, libre	0,264	0,377	0,100	5,26
KAINRATH (comm. pers.)		A & n-A, libre	0,29	0,29	0,9 - 1,3	1,6 - 5,8
MEGANCK (comm. pers.)		A, libre	0,21	0,94	0,82	5,0
OLSON *et* CONNEL, 1971		A, libre	0,36	/	0,57	2,4
PITMAN *et al.*, 1983	(1)	A, libre	0,21	/	0,19	4,79
	(2)	A, libre	0,20	/	0,27	3,84

A: aérée; n-A: non aérée; fixée: biomasse fixée; libre: boue libre; / : pas de données disponibles; (1) et (2): différentes expériences; %P : teneur en phosphore

BUCHAN (1983) annonce des rapports molaires Ca/P variant entre 0,12 et 0,28. Ces rapports sont basés sur des mesures à l'aide de la technique EDAX (Analyse de la Dispertion de l'Energie de rayons X).

WATANABE *et al.* (1984) concluent de leurs études à l'aide d'EDAX que le Mg et le K jouent le rôle majeur dans la neutralisation des polyphosphates intracellulaires.

Le rapport molaire de Mg /P dans la biomasse semble relativement constant; les valeurs oscillent entre 0,20 et 0,36. Le rapport K/P a moins souvent été établi; une valeur entre 0,28 et 0,38 est probable, mais MEGANCK (comm. pers.) a observé un rapport de 0,94. Le rapport Ca/P est extrèmement variable; de 0,054 à des valeurs supérieurs à 1. Il n'est pas improbable que selon les circonstances, des complexes de Ca avec d'autres anions que les phosphates puissent se former.

En résumé: l'importance des ions Mg^{2+} et K^{+} pour le processus de l'élimination biologique du phosphore est mise en évidence par un nombre important d'auteurs. Non seulement ils sont présents dans les boues en proportions relativement constantes par rapport au phosphore, mais il sont relargués et absorbés par la boue en même temps que les phosphates. Le rôle exact des cations ne semble pas entièrement élucidé.

1.7. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES DU POLY-HYDROXYBUTYRATE ET SA LOCALISATION INTRACELLULAIRE.

Le poly-ß-hydroxybutyrate (pHB) est un poly-ester du D-(-)-3-hydroxybutyrate. C'est un polymère linéaire, constitué de plusieurs centaines à plusieurs milliers de monomères.

Le pHB est insoluble dans un milieu polaire. Dans la cellule, le pHB est stocké sous forme de granules, entourés d'une structure de type membranaire, différente toutefois d'une membrane cellulaire classique (DAWES *et* SENIOR, 1973). Si cette couche superficielle autour des granules n'est pas un artéfact de préparation, elle pourrait jouer un rôle d'interface cytoplasme-pHB. En plus du pHB, ces granules contiennent également des

protéines (2%) et des lipides (DAWES *et* SENIOR, 1973). Les granules refractent la lumière et sont facilement colorables au noir de Soudan.

Selon FINDLAY *et* WHITE (1983) et WALLEN *et* ROHRWEDDER (1974) le pHB intracellulaire devrait être appelé poly-ß-hydroxyalcanoate (pHA), car il s'agit d'un hétéropolymère. Le pHA isolé des boues activées est composé essentiellement de ß-hydroxyvalérate et de ß-hydroxy butyrate (WALLEN *et* ROHRWEDDER, 1974). Cependant, 95 % des monomères constituant le pHA de *Bacterium megaterium* sont du ß-hydroxybutyrate (FINDLAY *et* WHITE, 1983). Par convention, les pHA des organismes seront appelés pHB.

Le pHB est un produit de stockage de carbone à l'état réduit. Son influence sur la pression osmotique et sur l'équilibre des réactions est minimale. Par l'esterification des monomères, les groupements carboxyles sont neutralisés, et son influence sur le pH intracellulaire est également minimale.

La synthèse et la dégradation du pHB sont schématisés dans la figure 1.6. La synthèse part de l'acétyl-CoA, plaque tournante du métabolisme. Deux molécules d'acétyl-CoA sont condensées pour donner l'acétoacétyl-CoA. Le groupement =O sur le carbone 3 de l'acétoacétyl-CoA est réduit par le $NADH_2$ pour former le ß-hydroxybutyryl-CoA et le NAD . Ensuite le ß-hydroxybutyryl-CoA est polymérisé en libérant le CoASH.

La dégradation suit une autre voie que la synthèse, ce qui facilite une bonne régulation du stock de pHB. Le pHB est hydrolysé, et les monomères (hydroxybutyrate) sont oxydés en acide acétoacétique, en réduisant un NAD. L'acide acétoacétique est activé par le CoASH et ensuite, à l'aide d'un deuxième COASH, clivé en deux molécules d'acétyl-CoA. (DAWES *et* SENIOR,1973 ; GAUDY *et* GAUDY; 1980).

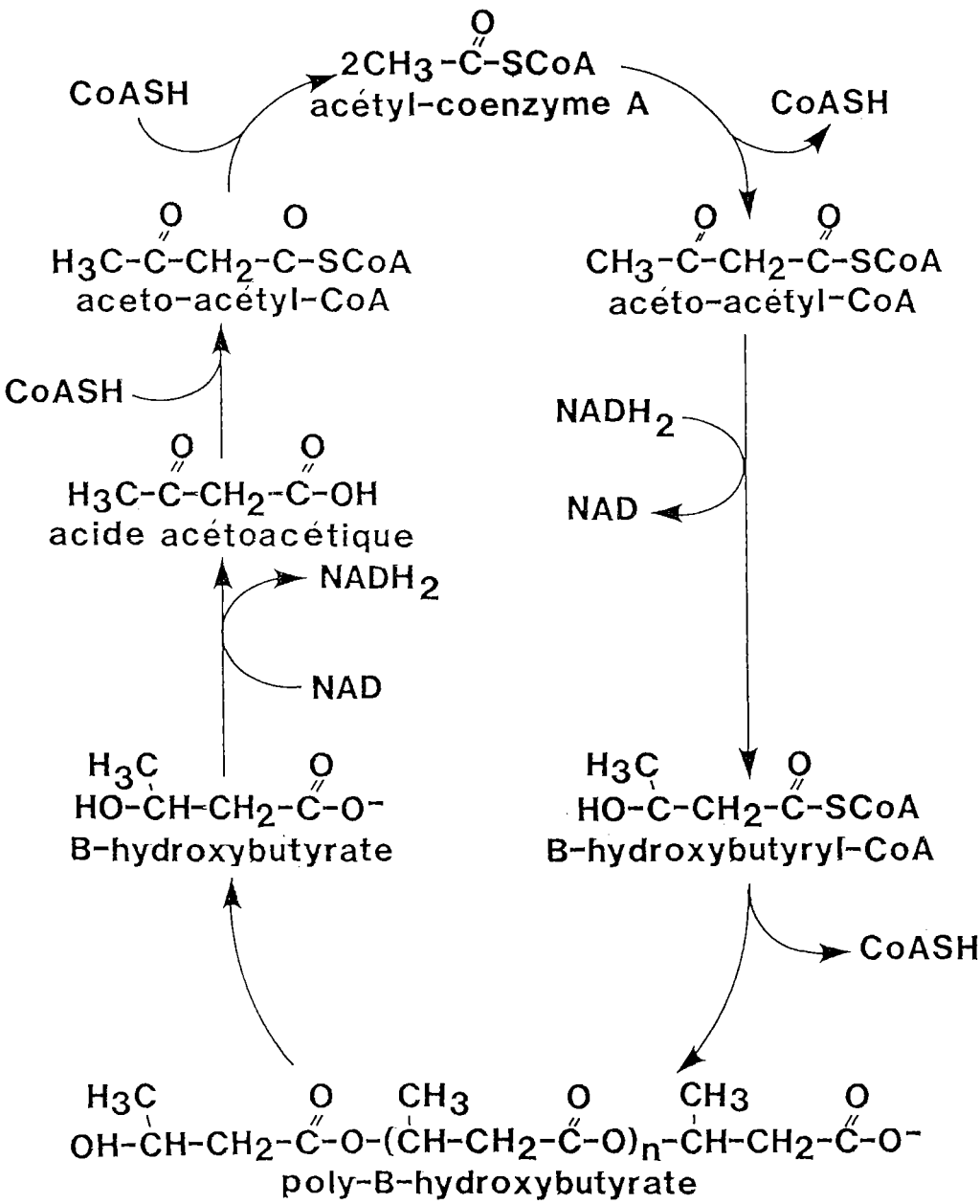


Fig. 1.6. Schéma des voies de synthèse et de dégradation du poly-B-hydroxybutyrate. Selon GAUDY *et* GAUDY, 1980.

1.8. LE ROLE PHYSIOLOGIQUE DES POLYPHOSPHATES ET DU POLY-HYDROXYBUTYRATE.

Il existe certaines analogies entre le poly-P et le pHB. Les deux macromolécules sont principalement synthétisées lorsque la culture des bactéries s'opère en milieu carencé (par exemple en azote (DAWES *et* SENIOR, 1973). D'autre part, un certain antagonisme entre le poly-P et le pHB a été observé; au cours du traitement dans un système d'élimination biologique de phosphore, la concentration en pHB dans les boues évolue d'une façon inverse par rapport à la concentration en poly-P (FUHS *et* CHEN, 1975 ; POTGIETER *et* EVANS, 1983 ; FUKASE *et al.* ,1984).

Nous considérerons d'abord la littérature concernant le rôle du poly-P, puis du pHB, et ensuite les relations possibles entre les deux produits de stockage seront étudiés.

C'est bien le poly-P qui est responsable des variations des teneurs en phosphore total entre les échantillons de boues prélevées dans différents stades de la filière de traitement; la corrélation entre la teneur en poly-P et la teneur en phosphore total des cellules est significative à cet égard (Fig. 1.8). Apparemment les variations des teneurs en phosphore total dans une boue au cours du traitement anaérobie-aérobie sont quasi exclusivement dues aux variations des teneurs en poly-P de faible poids moléculaire (PM), comme défini par MINO *et al.* (1984 b). La figure 1.7 montre l'évolution, au cours d'un traitement anaérobie/aérobie, des différentes fractions de composés phosphorés. La teneur en poly-P de faible PM évolue de façon parallèle à la teneur en phosphore total (P_{total}). Les teneurs en d'autres composés phosphorés (poly-P de haut PM, acides nucléiques, phospholipides, phosphoprotéines...) restent stables durant le traitement entier.

Selon KULAEV (1975), les poly-P de haut PM constituent une réserve tampon pour le métabolisme, qui permet une régulation optimale des concentrations des composés phosphorés, et des P_i en particulier, indépendemment des concentrations extracellulaires.

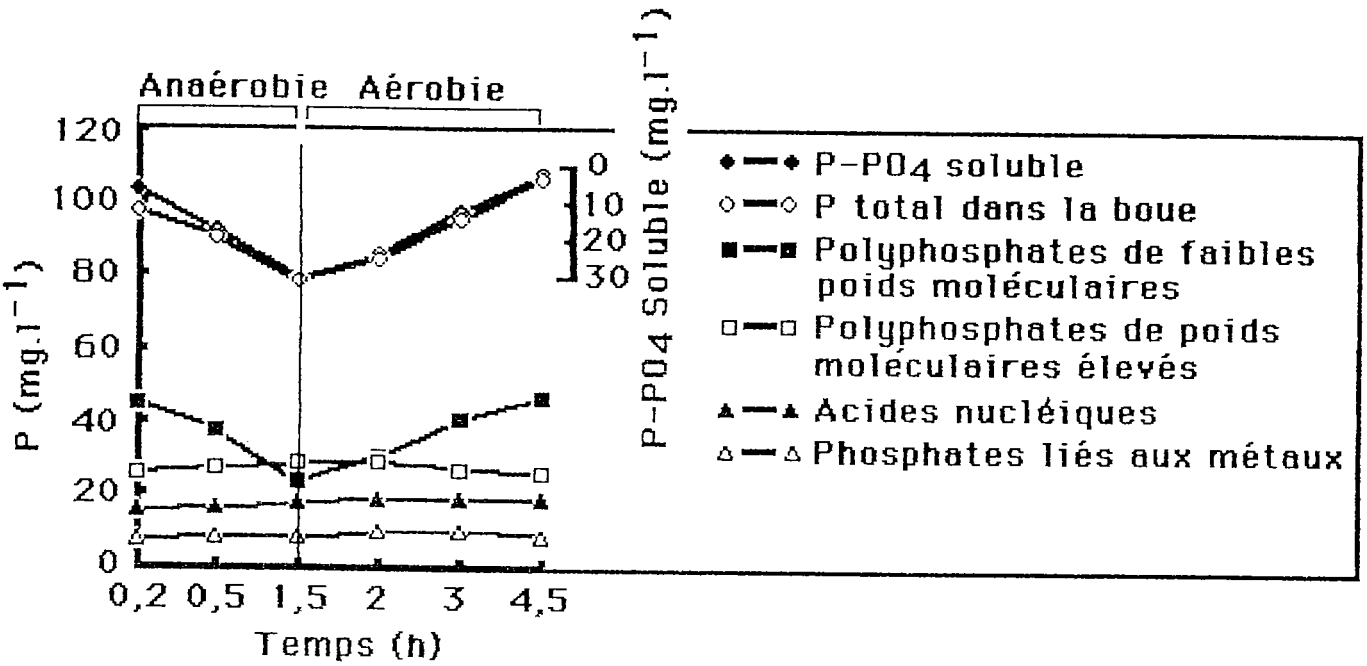


Fig. 1.7. Variations de la teneur en différents classes de phosphore au cours du traitement (MINO *et al.* ,1984).

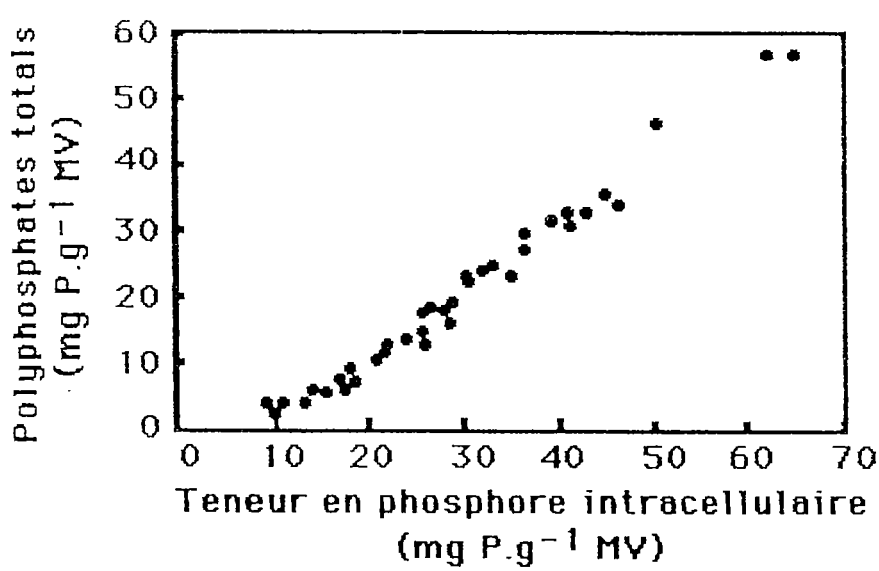


Fig. 1.8. Relation entre la teneur en phosphore total (P_t) et la teneur en polyphosphates (poly-P) dans les boues. (MINO *et al.* ,1984).

Récemment, VAN GROENESTYN *et al.* (1985) ont mis en évidence expérimentalement le rôle du poly-P chez *Acinetobacter* comme réserve de phosphore en cas de carence en cet élément. Chez d'autres organismes (algues, champignons, *Enterobacter*, *Corynebacterium*) cette fonction a été mise en évidence antérieurement (revu par HAROLD 1966).

De plus, KULAEV (1975) a attribué aux poly-P le rôle de réserve de phosphates activés, et en conséquence de réserve d'énergie, en premier lieu pour des phosphorylations de carbohydrates dans des phénomènes de transport etc....

MINO *et al.* (1984 b) n'ont pas observé d'échange isotopique entre les poly-P de haut PM et les poly-P de faible PM. Cette observation supporte l'hypothèse que chez les bactéries les poly-P de hauts PM ne sont pas les précurseurs des poly-P de faibles PM, et par conséquent que les poly-P de faible PM sont formés via la voie de la polyphosphate-kinase (HAROLD, 1966) ou par une des voies revues par KULAEV *et* VAGABOV (1983) (voie catalysée par la 1,3- diphosphoglycérate-polyphophate-phosphotransférase).

MINO *et al.* (1984 a,b) ont suggéré que les poly-P de faibles PM pourraient constituer une source d'énergie au cours du traitement anaérobie-anaérobie.

HAROLD *et* HAROLD (1965) ont montré que chez *Enterobacter*, la dégradation des polyphosphates résultait en une dissipation de l'énergie de la liaison anhydrique. Cependant, dans des conditions *in vitro*, le transfert de l'énergie de la liaison anhydrique par phosphorylation d'un ADP est possible (Tab 1.3). De même, la polyphosphate-kinase des Corynébactéries et des Mycobactéries peut catalyser le transfert de cette énergie lors de la phosphorylation du glucose (KULAEV *et* VAGABOV, 1983). Toutefois, à notre connaissance, le transfert *in vivo* de l' énergie de la liaison anhydrique des polyphosphates à d'autre molécules n'a pas encore été démontré.

Le transport des phosphates du milieu environnant au cytoplasme demande de l'énergie (S1.2). Une réserve intracellulaire de phosphore pourrait être utile pour la synthèse de RNA et d'autres composés contenant du phosphore lors de l'initialisation de la croissance (HAROLD, 1966).

Le pHB, synthétisé en conditions de carence, par exemple en azote ou en oxygène, est oxydé dès que le substrat limitant redevient disponible.

Il a été avancé que, chez certains organismes, les polyphosphates seraient dégradés en conditions anaérobies et en présence d'un substrat carboné. L'énergie de la liaison anhydrique serait alors utilisée pour l'accumulation du substrat carboné sous forme de pHB. Cette voie métabolique hypothétique est schématisée sur la figure 1.9. La voie de transfert d'énergie le plus souvent supposée est une phosphorylation de l'ADP par le poly-P (NICHOLLS *et* OSBORN, 1978; MARAIS *et al.*, 1983; COMEAU, 1984 ...). L'ATP formé est utilisé pour l'assimilation du substrat carboné et sa transformation en pHB. Cependant, certains auteurs mettent en doute la phosphorylation de l'ATP par le poly-P en conditions physiologiques (HAROLD,1966 ; KULAEV, 1975).

Une voie alternative ou supplémentaire semble possible, particulièrement lorsque l'acétate sert de substrat carboné en anaérobie. Deux variations peuvent être envisagées.

D'une part, l'acétate pourrait être phosphorylé dès son passage à travers la membrane par une molécule membranaire (par ex. phosphatidyl glycerol), à son tour phosphorylée par le poly-P.

D'autre part, l'acétate pourrait être phosphorylé directement à partir du poly-P par l'acétate-kinase. La phosphorylation de l'acétate par le poly-P se déroulerait de façon analogue à sa phosphorylation par l'ATP (ROSE ,1955) ou par le pyrophosphate (CRUDEN *et al.* ,1983). *Acinetobacter,* un organisme fréquemment utilisé comme modèle pour les organismes poly-P, possède une enzyme, l'acétate-kinase (TAYLOR *et* JUNI,1961; JUNI, 1978), mais son activité avec le poly-P comme donneur de phosphates activés n'est pas connue.

Dans tous les cas, le produit de phosphorylation est l'acétyl-phosphate. Cette acétyl-phosphate serait transformé en acétyl-CoA par le phospho-transacétylase, en conservant au moins partiellement l'énergie de la liaison C - P, et en libérant un phosphate inorganique. L'activité de l'enzyme phospho-transacétylase a été dosée dans les boues par LÖTTER (1984). Le phosphate inorganique libéré dans le cytoplasme est relargué dans le milieu extracellulaire, avec des cations stabilisateurs.

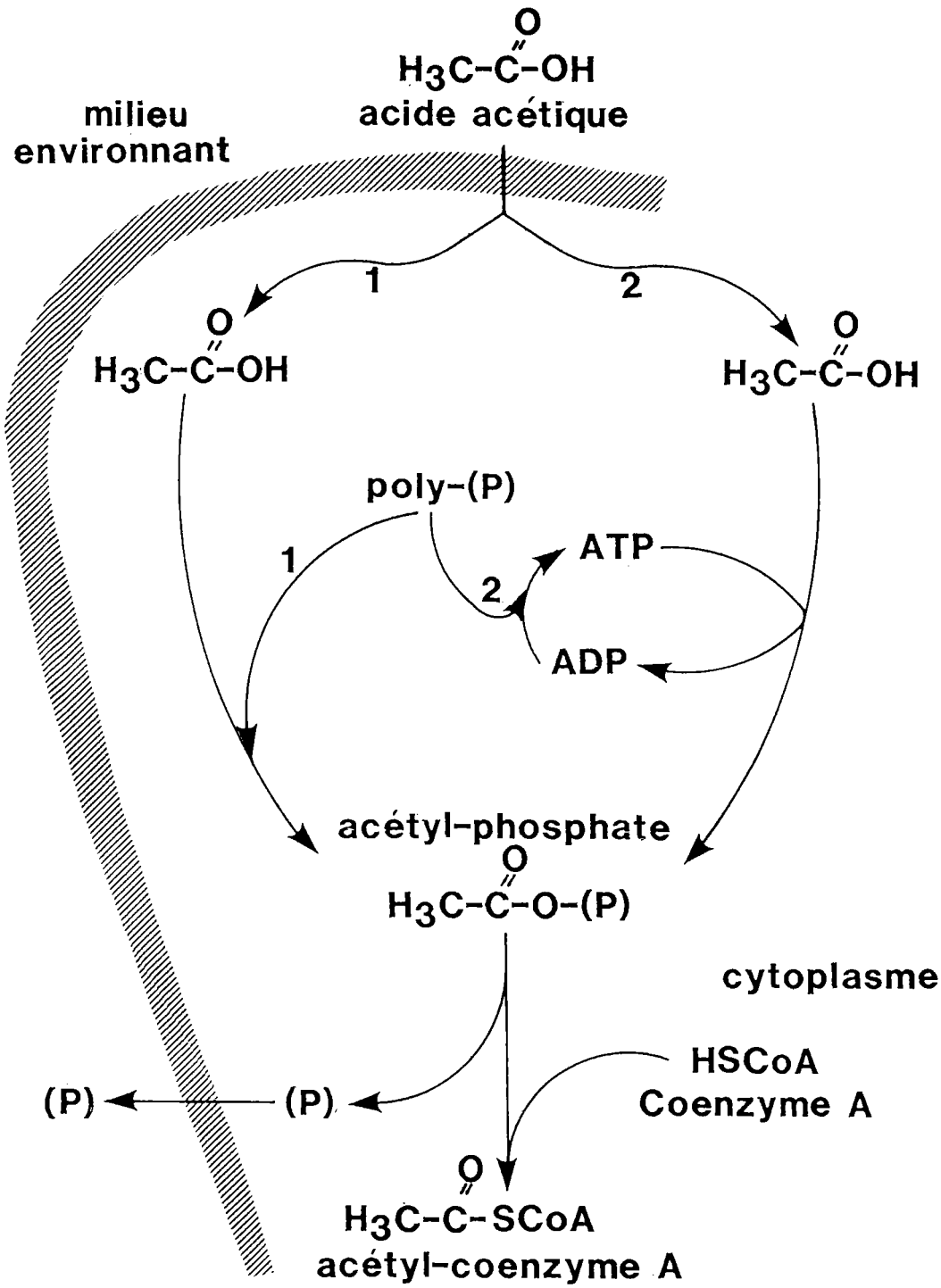


Fig. 1.9. Voies hypothétiques pour l'absorption de l'acétate en anaérobie avec formation de l'acétyl-CoA et hydrolyse des polyphosphates:
1. phosphorylation de l'acétate directement par les polyphosphates;
2. phosphorylation de l'acétate par les polyphosphates, via l'ATP.

L'acétyl-CoA est utilisé pour la synthèse du pHB via les voies connues (§1.8). Cette voie hypothétique, qui pourrait exister chez des organismes aérobies ne possèdant pas de voies fermentatives (ex. *Acinetobacter, Pseudomonas*), explique les phénomènes suivants:

- l'importance de l'acétate par rapport aux autres substrats, et en particulier sa cinétique élévée d'absorption (ces phénomènes seront traités dans le §1.3 de la deuxième partie de ce rapport);

- le relargage de phosphates dans un rapport molaire proche de 1/1 par rapport à la quantité d'acétate consommé (également mis en évidence dans le §1.3 de la deuxième partie);

- l'évolution opposée des quantités de phosphore et de pHB ;

- le relargage des ions K^+ et Mg^{2+} avec les phosphates.

Cette voie métabolique rentre dans un modèle biochimique, détaillé et discuté dans le § 5.2.

1.9. TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE.

Le plus souvent, l'activité de la polyphosphate-kinase est dosée dans un extrait de biomasse. Exceptionnellement, des cellules entières ont été utilisées (VAILLANCOURT *et al.*,1978).

Seront traitées : les méthodes de préparation de l'extrait enzymatique, puis la composition des milieux de réaction, ainsi que les conditions dans laquelle la réaction a lieu.

1.9.1. La préparation de l'extrait.

La première étape consiste en la destruction des cellules et la récupération de la fraction contenant l'activité enzymatique. Seul VAILLANCOURT *et al.* (1978) a travaillé avec des cellules entières d'*Anacystis nidulans*, dont la paroi avait été perméabilisée à l'aide d'un détergent (cétyltriméthyl ammoniumbromide (CTAB)). Le tableau 1.9 résume les techniques employées par les différents chercheurs pour la préparation de l'extrait. En effet, différentes techniques sont disponibles; presse, broyeur ou traitement aux ultrasons.

Tableau 1.9. Techniques de destruction des cellules pour la préparation d'un extrait en vue du dosage de l'activité polyphosphate-kinasique.

Technique	pH	Organisme	Référence
Détergent	/	*Anacystis nidulans*	VAILLANCOURT et al. , 1978
Presse	/	*Escherichia coli B*	MUHAMMED, 1961
Broyage	6,9	*Mycobacterium smegmatis*	SUZUKI *et al.* 1972
	7,5	*E. coli K12*	LI *et* BROWN , 1973
	7,0	*Saccaromyces cerevisiae*	FELTER *et* STAHL, 1975
	7,2	*S. carlsbergensis*	SHABALIN *et al.*, 1977
Ultrasons	7,0	*E. coli B*	KORNBERG *et al.* , 1956
	7,0	*Enterobacter aerogenes*	HAROLD, 1963
	7,2	*Arthrobacter atrocyaneus*	LEVINSON *et al.*, 1975
	7,0	*Acinetobacter calcoaceticus*	T'SEYEN *et al.* , 1984

/ : non rapporté.

Seul Muhammed (1961) et Muhammed *et al.* (1959) ont utilisé une presse; la pâte obtenue étant homogénéisée par la suite.

D'autres chercheurs ont broyé les cellules, éventuellement en présence d'un adjuvant avec une action mécanique; SUZUKI *et al.* (1972) ont utilisé du sable enfin d'améliorer le broyage, tandis que FELTER *et* STAHL (1975) et SHABALIN *et al.* (1977) ont utilisé des billes de verre.

D'autres encore ont traité la biomasse aux ultrasons pour rompre les structures cellulaires et solubiliser l'enzyme (HAROLD, 1963 ; KORNBERG *et al.*, 1956 ; LEVINSON *et al.* ,1975). HAROLD (1963) a utilisé des billes de verre comme adjuvant mécanique lors du traitement aux ultrasons. Il rapporte l'absorption de l'enzyme aux billes de verre, observation faite également par ANDREARCZYK (comm. pers.).

Tableau 1.10. Protecteurs ou activateurs ajoutés au milieu d'extraction.

Produit	Concentration	Organisme	Référence
Mg^{2+}	1 mM	*Saccaromyces cerevisiae*	FELTER *et* STAHL, 1975
EDTA	2 mM	*E. coli K12*	LI *et* BROWN , 1973
poly-P	2 mM	*Acinetobacter calcoaceticus*	T'SEYEN *et al.* , 1984

Trois chercheurs ont ajoutés des composés au milieu d'extraction comme protecteur, ou activateur, sans que l'on connaisse leur mécanisme d'action. Il s'agit notamment de l'EDTA (LI *et* BROWN, 1973), du Mg^{2+} (FELTER *et* STAHL, 1975) et du poly-P (T'SEYEN *et al.*, 1984). Les concentrations dans le milieu d'extraction sont données dans le tableau 1.10.

1.9.2. La réaction *in vitro*.

Des mesures de l'activité polyphosphate-kinasique ont été effectuées depuis 1956 (KORNBERG *et al.* ,1956).

La majorité des chercheurs a déterminé l'activité polyphosphatekinasique d'un extrait non purifié ("brut"). Toutefois, LI *et* BROWN (1973), KORNBERG *et al.* (1956), LEVINSON *et al.* (1975), SUZUKI *et al.* (1972) et MUHAMMED (1961) ont purifié la polyphosphate-kinase dans une certaine mesure.

Le milieu de réaction *in vitro* a deux composants principeaux :

- l'extrait biologique dont l'activité enzymatique doit être mesurée,
- l'ensemble des réactifs, solutions tampons etc...

Les techniques de préparation de l'extrait biologique ont été rapportées précédemment. Nous étudierons d'abord les principes du dosage, et ensuite les conditions chimiques et physico-chimiques appliquées par les différents chercheurs.

L'activité de l'ATP-polyphosphate-phosphotransferase est mesurée le plus souvent par le taux de transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP vers une chaîne de polyphosphate, la rallongeant ainsi d'un groupement. Cependant, la réaction inverse a également été mesurée.

En général, le ^{32}P (phosphore-32) a été utilisé comme marqueur du transfert de groupements phosphates. Vu le nombre d'auteurs et la variété de réactifs utilisés, les méthodes de dosage proposés sont résumées dans le tableau 1.11. Dans le tableau 1.12, les conditions physico-chimiques sont précisées lorsque la mesure de l'activité polyphosphate-kinasique a été réalisée selon la réaction:

$$\mathbf{ATP^* + poly\text{-}(P)_n \longrightarrow ADP + poly\text{-}(P^*)_{n+1}}$$

Pour mesurer la réaction de synthèse, l'ATP marqué sur le groupement terminal par le ^{32}P (ATP-^{32}P) est souvent ajouté au milieu de réaction comme substrat. Dans le système de dosage de KORNBERG *et al.* (1956), MUHAMMED (1961) et HAROLD (1964), l'ATP marqué est synthétisé *in situ* à partir de l'acétylphosphate marqué et de l'ADP par l'action de la l'acétyl-kinase:

$$\mathbf{ADP + acétyl\text{-}(P^*) \longrightarrow acétate + ATP^*}$$

Pour la réaction inverse de la polyphosphate-kinase, le substrat est évidemment le poly-P marqué au ^{32}P et de l'ADP:

$$\mathbf{ADP + poly\text{-}(P^*)_n \longrightarrow ATP^* + poly\text{-}(P^*)_{n-1}}$$

La concentration en ATP utilisée pour le dosage de la réaction de synthèse varie entre 7,5 et 1000 µM. LI *et* BROWN (1973), LEVINSON *et al.* (1975), et SUZUKI *et al.* (1972) ont respectivement utilisé une concentration de 400, 400 et 510 µM, des valeurs proches de la moyenne arithmétique des concentrations rencontrés dans la littérature.

LEVINSON *et al.* 1975 ont observé une inhibition de la polyphosphatekinase par un excès de substrat à des concentrations en Mn ATP^{-2} supérieures à 600 µM.

L'inhibiteur de la réaction de synthèse le plus généralement reconnu est l'ADP (KORNBERG *et al.* , 1956; MUHAMMED, 1961; HAROLD, 1964; LI *et* BROWN, 1973; LEVINSON *et al.* ,1975). Selon SUZUKI *et al.* (1972), le taux d'inhibition dépend du rapport AMP/ADP et de la concentration en P_i. LEVINSON *et al.* (1975) rapportent une forte inhibition par 1mM de pyrophosphate (PP_i). Par contre, le poly-P ne semble pas présenter un effet inhibiteur (HAROLD, 1963).

L'effet inhibiteur de l'ADP, produit normal de la synthèse du poly-P, peut être contourné lors du dosage par un système "régénérateur". Ainsi dans le système de dosage de l'activité polyphosphate-kinasique de KORNBERG *et al.* (1956), MUHAMMED (1961) et HAROLD (1964), l'acétyl-P peut phosphoryler l'ADP ou même l'AMP; à priori l'ADP n'interfère pas dans leur méthode de dosage. SHABALIN *et al.* (1977) semblent les seuls à avoir utilisé un système régénérateur d'ATP à partir de l'ADP formé lors de la réaction. Ils ont utilisé 20 mM de créatinephosphate, et 2 à 3 unités de créatinephosphate-kinase par essai. Le volume de réaction était de 200 µl.

Tableau 1.11. Résumé des méthodes de dosage de l'activité polyphosphate-kinasique.

Référence	Organisme	Purification de l'extrait	Substrat	|S| µM	Volume essai µl
T'SEYEN *et al.*,1984	*Acinetobacter*	brut	$AT^{32}P$	400	150
VAILLANCOURT *et al.*,1978	*Anacystis*	cell. entières	$AT^{32}P$	7,5	500
SHABALIN *et al.*,1977	*Saccharomyces*	brut	$AT^{32}P$	1000	200
LEVINSON *et al.*,1975	*Arthrobacter*	brut	$AT^{32}P$	400	100
LI *et* BROWN, 1973	*Escherichia*	purifié	$AT^{32}P$	400	100
SUZUKI *et al.*,1972	*Mycobacterium*	purifié	ATP (^{14}C)	510	200
HAROLD, 1963	*Enterobacter*	brut	acétyl-^{32}P	400	330
MUHAMMED, 1961	*Corynebacterium*	brut &purif.	acétyl-^{32}P	2000	250
KORNBERG,1956	*Escherichia*	brut	$AT^{32}P$ acétyl-^{32}P	1200 1680	250 250

|S| : concentration en substrat.

Tableau 1.12. Protecteurs ou activateurs ajoutés au milieu de réaction.

Produit	Concentration	Organisme	Référence
$MgCl_2$	20 mM	*Acinetobacter*	T'SEYEN *et al.*,1984
$MgSO_4$	20 mM	*Anacyctis*	VAILLANCOURT *et al.*,1978
$MgCl_2$	0,3 µM (?)	*Saccharomyces*	SHABALIN *et al.*,1977
histone type II MnCl2	1 $g.l^{-1}$ 2 mM	*Arthrobacter*	LEVINSON *et al.*,1975
histone type II	2 $g.l^{-1}$	*Escherichia*	LI *et* BROWN,1973
MgSO4 poly-P de K ac. succinique	2 mM 5 $g.l^{-1}$ 100 mM	*Mycobacterium*	SUZUKI *et al.*,1972
$MgCl_2$	12 mM	*Corynebacterium*	MUHAMMED, 1961
$MgCl_2$	4 mM	*Escherichia*	KORNBERG *et al.*, 1956

CONCLUSION.

HAROLD (1966), KULAEV (1975) et KULAEV *et* VAGABOV (1983) ont revu les études fondamentales portant sur la biologie des polyphosphates d'un grand nombre de chercheurs. FUHS *et* CHEN (1975) et NICHOLLS *et* OSBORN (1978) ont appliqué les théories des microbiologistes et des biochimistes au traitement des eaux résiduaires comportant des phases anaérobies et aérobies. MARAIS *et al.* (1983) mais surtout COMEAU *et al.* (1985) ont organisé les connaissances relatives au métabolisme des bactéries dans une succession de conditions aérobies et anaérobies dans des modèles qui expliquent les phénomènes majeurs observés dans des installations de déphosphatation biologique.

Cependant, un nombre de lacunes subsiste. Certains postulats n'ont pas été vérifié expérimentalement:

- le transfer de la liaison anhydrique des polyphosphates à d'autres molécules comme l'acétate;

- l'induction des enzymes de synthèse des polyphosphates (polyphosphate-kinase) chez les bactéries par un séjour en conditions anaérobies;

- l'activité de la polyphosphate-kinase dans des boues activées dans les mêmes conditions.

De même quelques questions théoriques n'ont qu'une réponse très partielle:

- quel type d'organisme participe au processus de relargage et d'absorption du phosphore ?

- quelles sont les voies métaboliques qui distinguent les bactéries poly-P des autres bactéries de la boue activée ?

2. MATERIELS ET METHODES.

2.1. SOUCHES EMPLOYEES. 49

2.2. BOUES UTILISEES. 49

2.3. CONDITIONS DE CULTURE. 49

2.4. PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE. 51

2.5. DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE. 52
2.5.1. La préparation du milieu de réaction.
2.5.2. La réaction *in vitro*
2.5.3. La chromatographie sur papier.
2.5.4. Le comptage de la radioactivité en scintillation liquide.
2.5.5. L'interprétation des résultats.

2.6. DOSAGE DES PHOSPHATES. 53

2.7. DOSAGE DES PROTEINES. 53

2.8. DOSAGE DES SUCRES. 53

2. MATERIELS ET METHODES.

Dans ce chapitre sont décrits: les matériels biologiques (les souches pures et les boues), et les réactifs chimiques , l'équipement de laboratoire et les méthodes employés au cours de l'étude sur la biochimie du phosphore (les cultures, la préparation de l'extrait enzymatique et le dosage proprement dit de l'activité polyphosphate-kinasique).

2.1. SOUCHES EMPLOYEES.

Selon les expériences, des cultures pures des souches suivantes ont été utilisées: *Acinetobacter calcoaceticus* (collection du laboratoire du CSE, Université de Metz, et souche isolée de la boue du pilote de déphosphatation biologique du Laboratoire Central, Lyonnaise des Eaux, Le Pecq); *Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus"* (NRLL B-8058. US Department of Agriculture, Peoria, Illinois); *Aeromonas hydrophila,* (isolé de la boue du pilote de déphosphatation biologique du Laboratoire Central, Lyonnaise des Eaux, Le Pecq); *Bacillus subtilis* (Institut Pasteur, IP 5148); *Escherichia coli* (IP 611); *Pseudomonas fluorescens* (IP 6326); *Pseudomonas vesicularis* (collection du laboratoire du CSE, Université de Metz, et souche isolée de la boue du pilote de déphosphatation biologique du Laboratoire Central, Lyonnaise des Eaux, Le Pecq); *Serratia sp.* (collection du laboratoire du CSE, Université de Metz). Les souches ont été repiquées mensuellement et conservées à température ambiante sur milieu gélosé (bio-Mérieux 5.138.1 ou Institut Pasteur 64.477).

2.2 BOUES UTILISEES.

Des essais ont été réalisés sur des échantillons de boue en provenance des zones anaérobie anoxique et aérobie des pilotes de déphosphatation biologique du Laboratoire Central, Lyonnaise des Eaux, Le Pecq. Les installations pilotes étaient de type "Phoredox modifié" (décrit dans le §6.2 et introduit dans l'annexe 3). Elles étaient alimentées soit avec une eau résiduaire urbaine, soit avec un effluent de laiterie reconstitué. Le tableau 2.1 donne les caractéristiques détaillés des différents échantillons. D'autres essais ont été effectués sur des échantillons de boue prélevés dans le bassin d'aération de la station d'épuration de la ville de Metz.

2.3 CONDITIONS DE CULTURE.

Selon les expériences, les cultures des souches ont été réalisées dans deux milieux: Viandox-acétate (lors de la mise au point du dosage) et glucose-acétate (lors de l'étude de l'activité polyphosphate-kinasique des différentes souches et lors des essais d'induction).

Le milieu Viandox-acétate est de composition: acétate de sodium: 6,0 g; sulfate d'ammonium 5,5 g; dihydrogénophosphate de potassium 0,5 g; chlorure de potassium 0,2 g; chlorure de magnésium 0,2 g; Viandox (extraits de viande de boeuf, LIEBIG) à une dilution 1/100 q.s.p. 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,0 avant autoclavage.

Le milieu glucose-acétate est composé de: acétate de sodium: 0,78 g ; glucose 0,21: g ;

chlorure d'ammonium: 0,50 g ; sulfate de sodium: 0,09 g ; sulfate de magnésium.7 H_2O: 0,05 g ; chlorure de calcium.2 H_2O: 0,015 g ; sulfate de fer (II).7 H_2O: 0,72 mg ; EDTA de sodium.2 H_2O: 1,03 mg ; monohydrogénophosphate de sodium.12 H_2O: 0,3 g ; dihydrogénophosphate de potassium: 0,045 g; solution tampon Tris-HCl (0,2 M): 50 ml; eau distillée q.s.p. 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,15 avant autoclavage.

Tableau 2.1. Identité et teneur en matières sèches (MS) des échantillons de boue utilisés lors de l'étude de l'activité polyphosphate-kinasique.

Origine	MS $g.l^{-1}$	Identification
Essais en discontinu		
EB + boue; 1 h anaérobie		A6
boue; 5.45 h anaérobie; + EB		A8
boue; 5.45 h anaérobie; + eau permutée		A9
Pilote alimenté avec des eaux résiduaires urbaines		
bassin anaérobie 10.11.83	14,4	B1
bassin aérobie 10.11.83	9,9	B4
bassin anoxique 23.11.83	9,3	B7
bassin aérobie 23.11.83	10,0	B8
bassin anaérobie 1.12.83	7,2	A1
bassin aéré 1.12.83	5,0	A3
Pilote effluent laiterie		
bassin anaérobie 16.6.83	18,5	L4
Pilote alimenté avec l'acétate		
bassin anaérobie		PACA
bassin aérobie		PACB
Station d'épuration de Metz		
bassin aéré	3	

Les cultures ont été réalisées dans des flacons erlenmeyer de 500 ml, des flacons de WIAME de 500 ml (Fig. 2.1; utilisés lors de l'étude de l'activité polyphosphate-kinasique chez les différentes souches pures) ou des fermenteurs BIOLAFITTE d'une capacité de 2 l (lors des essais d'induction).

L'agitation du milieu est assurée à l'aide d'un barreau magnétique pour les erlenmeyers et d'une table agitante (NEW BRUNSWICK GYROTORY; 150 rpm) pour les flacons de WIAME.

La densité optique des cultures a été suivie par turbidimétrie à 620 nm (spectrophotomètre UVIKON 810 ou spectrophotomètre PERKIN ELMER E 295).

L'oxygénation du milieu a été réalisée par l'agitation des flacons de WIAME et certains erlenmeyers, ou par insufflation d'air stérile dans le fermenteur et dans certains erlenmeyers. L'anaérobiose dans le fermenteur a été obtenue par insufflation d'azote (azote U; CARBOXYQUE FRANCAISE).

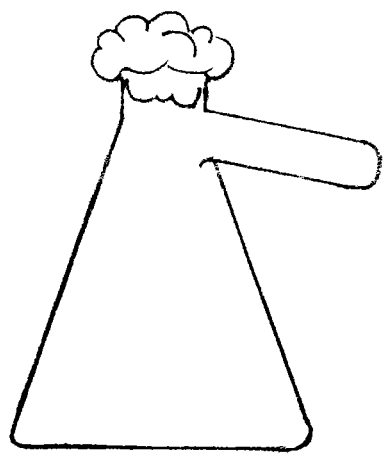


Fig. 2.1. Flacon de WIAME utilisé lors de l' étude de l'activité constitutive de la polyphosphate-kinase.

2.4 L'EXTRACTION

Les extraits bactériens ont été préparés par un traitement aux ultrasons (appelé "**sonification**") des cultures de souches pures ou de boues.

Pour la préparation de l'extrait, 250 ml d'une culture bactérienne ou 50 ml d'une boue ont été centrifugés à 3 400 g pendant 15 min (centrifugeuse JOUAN G82 N). Les culots ont été remis en suspension dans respectivement 5 ou 25 ml de milieu d'extraction. Le **milieu standard d'extraction** consiste en une solution tampon Tris-HCl 0,025M à pH 7,0, additionnée de polyphosphate (sel de GRAHAM, MERCK 6529) pour obtenir une concentration finale en polyphosphate de 4 mM. Cette suspension a ensuite été congelée à -26 °C jusqu'au moment de la sonification.

La rupture des structures cellulaires et la solubilisation de l'enzyme polyphosphate-kinase ont été réalisées par un traitement aux ultrasons d'une durée totale de 15 min. La

sonification a été effectuée par étapes d'une minute, espacées de deux minutes de temps de refrigération. Le récipient contenant la suspension (tube en polystyrène d'une capacité de 10 ou de 40 ml; POLY-LABO PAUL BLOCK) était placé dans un bain de glace pour éviter une dégradation de l'activité enzymatique par une élévation de température. La puissance de sonification était de 25 W, générés par une unité à ultrasons A. PONS et transmise par une sonde T10T + TC4C.

La suspension traitée aux ultrasons a été centrifugée à 20 000 g pendant 10 min, à une température comprise entre 0 et 4 °C (KONTRON TGA 50 ultracentrifugeuse). Les surnageants ont été stockés à -26 °C jusqu'au moment des dosages.

2.5 LE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE

Le dosage peut être décrit en cinq étapes: la préparation du milieu de réaction; la réaction *in vitro* ; la chromatographie descendante sur papier; le comptage de la radioactivité; l'interprétation des résultats du comptage.

2.5.1. La préparation du milieu de réaction.

70 µl d'extrait bactérien ont été mélangés vigoureusement avec 70 µl de la solution d'essai, dans un microtube (POLYLABO 96 304) à 0 °C. La solution d'essai était composée de : $MgCl_2$ 20 mM; ATP non-radioactif (SIGMA A 5394) 774 µM; ATP marqué $-^{32}P$ (NEN NEG002) 26 µM; créatine phosphate (CP; SIGMA P 4635) 40 mM ; créatinephospho-kinase (SIGMA C 3735) 20 unités.ml^{-1} dans une solution tampon Tris-HCl 0,025M; pH=7,0.

2.5.2. La réaction *in vitro*

Le transfert du microtube contenant l'extrait et les réactifs, du bain de glace au bain Marie à 30 °C, initie la réaction *in vitro*. A des intervalles de temps réguliers, des échantillons aliquotes de 20 µl ont été prélevés et déposés sur du papier de chromatographie (WHATMAN ET 31). Les dépôts ont été immédiatement séchés par un flux d'air chaud pour arrêter la réaction enzymatique.

2.5.3. La chromatographie sur papier.

Les phosphates de faible poids moléculaire (PM) (P_i, P-P, ATP, ADP, AMP) ont été séparés des polyphosphates par une chromatographie descendante sur papier (WHATMAN ET 31). L'éluant était de l'acide trichloro-acétique (TCA) 50 g.l^{-1}. Les composés phosphorés de faible PM migrent avec le front de l'éluant, tandis que ceux de PM élevé (polyphosphates) restent au niveau du point de dépôt (LI *et* FELMLEY, 1973).

Après 15 à 20 min d' élution, les papiers de chromatographie ont été séchés, découpés en fractions, et chaque fraction du chromatogramme a été mise dans un flacon de polyéthylène d'une capacité de 20 ml (KONTRON), rempli de 15 ml d'eau distillée.

2.5.4. Le comptage de la radioactivité en scintillation liquide.

Les flacons de comptage ont été enrobés d'un produit antistatique (LKB), et la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (LKB Minibeta 1122), en utilisant l'effet CERENKOV. L'efficacité de comptage, préalablement déterminée à l'aide d'une gamme étalon, était de 46 % dans la gamme de 2 000-200 000 CPM. La radioactivité contenue dans chaque flacon a été comptée trois fois. Les valeurs de comptage ont été saisies et traitées par un micro-ordinateur APPLE IIe, couplé au compteur de scintillation.

2.5.5. L'interprétation des résultats.

La quantité de polyphosphate formée lors de la réaction est estimée par l'incorporation du ^{32}P dans la fraction du dépôt (c.à.d., la fraction des phosphates à PM élevé, les composés phosphorés de faible PM ayant migré avec l'éluant).

Le rapport de la radioactivité dans la fraction des phosphates à haut PM sur la radioactivité totale du chromatogramme entier est proportionnel à la quantité de poly-P formée. En multipliant ce rapport par le nombre de moles d'ATP initialement présentes dans le milieu, on obtient la quantité exacte de poly-P. L'activité polyphosphate-kinasique est donnée comme une **vitesse initiale** ou comme une **activité spécifique.** L'activité spécifique est définie comme le rapport de la vitesse initiale sur la concentration en protéines dans l'extrait. Les unités sont des nmoles d'orthophosphate transférées par minute et par mg de protéine (nmole P_i. mg^{-1} prot . min^{-1}), correspondant à 16,67 mkat . kg^{-1}prot.

La signification des différences observées entre les activités avant et après une période anaérobie a été déterminée à l'aide du test sur la somme des colonnes de WILCOXON (WILCOXON'S SUM OF RANKS TEST; LANGLEY, 1979; NF X 06-065). Il s'agit d'un test non paramétrique pour comparer deux lots d'observations qui ne sont pas appariées.

2.6 LE DOSAGE DES PHOSPHATES

La concentration en orthophosphates a été appréciée soit manuellement à l'aide d'un spectrophotomètre (UVIKON 810), soit à l'aide d'une chaîne TECHNICON AUTOANALYSER par la méthode de dosage au molybdate d'ammonium et tartrate potassique d'antimoine en présence des acides ascorbique et sulfurique. La densité optique (DO) a été mesurée à 880 nm (ISO/DIS 6878/1; NF T 90-023).

2.7 LE DOSAGE DES PROTEINES.

La quantité de protéines dans les extraits bactériens a été mesurée par la méthode de BRADFORD (1976). 5 ml du réactif de BRADFORD ont été mélangés avec 100 µl d'extrait bactérien. Le réactif de BRADFORD consiste en: éthanol 25 ml; bleu de Comassie (SIGMA B-1131) 50 mg; acide phosphorique (MERCK 573) 50 ml; eau distillée q.s.p. 1 000 ml ; filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm (MILLIPORE HA). Après une incubation de 10 min à température ambiante, la densité optique a été mesurée à 595 nm. Les résultats sont exprimés en g de protéines par ml par comparaison de l'échantillon avec une courbe étalon d'albumine de sérum bovin (BSA; SIGMA B-4387). La courbe étalon a été établie à l'aide d'une gamme de solutions de BSA de 0 à 300 µg dans 100 µl de milieu standard d'extraction.

2.6 LE DOSAGE DES SUCRES.

Les sucres ont été dosés par la méthode au phénol et acide sulfurique de DUBOIS *et al.* (1956). 1 ml d'une solution de phénol (50 $g.l^{-1}$; MERCK 206), 1 ml d'échantillon et 5 ml d'acide sulfurique (MERCK 731) ont été homogéinisés. Le mélange a été mis dans un bain de glycine à 100 °C pour une durée de 5 min., puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La DO a été mesurée à 492 nm. Les résultats ont été exprimés en µg de glucose par ml, par comparaison avec une courbe étalon de glucose dans la gamme de 0 à 100 $\mu g.ml^{-1}$.

3. OPTIMISATION ET STANDARDISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE.

3.1. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN ATP DANS LE MILIEU DE REACTION. 55

3.2. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN POLYPHOSPHATES. 58

3.3. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CREATINEPHOSPHO-KINASE. 60

3.4. CHOIX DE LA CONCENTRATION EN ATP POUR LES ESSAIS AVEC LES BOUES. 62

3.5. ESSAI DE PRETRAITEMENT DES BOUES. 64

3. OPTIMISATION ET STANDARDISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE.

Face aux concentrations diverses de réactifs trouvées dans la littérature (S 1.10), des essais ont été effectués pour fonder le choix des concentrations des principaux réactifs (ATP, poly-P et CPK).

Acinetobacter calcoaceticus a été choisi comme modèle pour la mise au point du dosage en raison de l' importance qui lui a été accordée par la littérature concernant le processus de l'élimination biologique du phosphore (FUHS *et* CHEN , 1975; DEINEMA *et al.* ,1981).

Sa culture (en discontinu) a été réalisée dans un erlenmeyer de 500 ml, avec 200 ml de milieu Yiandox-acétate. La culture a été agitée par un agitateur magnétique. La température a été maintenue à 30 °C. Lors de la phase stationnaire, la culture a été centrifugée à 3 000 g pendant 20 min. La biomasse obtenue lors de cette culture a été utilisée par la suite pour les opérations décrites dans les S 3.1, 3.2, et 3.3.

Les boues constituent un matériel très différent des souches pures. Pour cette raison, un essai de vérification de la concentration optimale du substrat principal, l'ATP, a été conduit avec un extrait de boues (S 3.4).

3.1 CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN ATP DANS LE MILIEU DE REACTION.

Protocole.

Le culot obtenu par centrifugation de la culture bactérienne a été mis en suspension dans 25 ml du milieu standard d'extraction (S2.4). Cette suspension bactérienne a subi un traitement aux ultrasons durant 5 min à une puissance de 50 W.

Deux expériences ont été conduites: l'une dans la gamme de concentrations en ATP de 26,7 à 301,6 µM, et l'autre dans la gamme de 303,4 à 2003,4 µM.

Résultats.

L'activité de l'enzyme ATP-polyphosphate phosphotransférase varie entre 8,3 et 89,0 pmoles de phosphate transférés de l'ATP au poly-P, en fonction de la concentration initiale en ATP (Tab. 3.1). La reproductibilité n'a pu être estimée faute de répétitions.

Tableau 3.1. Activité polyphosphate-kinasique (v_i) d'un extrait d'*Acinetobacter* mesurée en fonction de différentes concentrations initiales en ATP.

	|ATP| µM	v_i (pmole P.min^{-1}.ml^{-1})
Essai N° 1	26,7	8,27
	33,3	11,64
	39,2	11,95
	76,7	30,28
	151,6	44,73
	301,6	88,97
Essai N° 2	303,8	44,29
	603,4	11,64
	903,4	57,03
	1203,4	24,07
	1503,4	15,48
	2003,4	11,42

Dans la gamme de concentrations en ATP de 26,7 à 301,6 µM, la vitesse initiale mesurée est proportionnelle à la concentration initiale en substrat (ATP) (Fig.3.1).

Le deuxième essai, conduit dans la gamme de 303,8 à 2003,4 µM en ATP, n'indique pas de

relation linéaire entre la concentration du substrat et la vitesse initiale mesurée (Fig. 3.1). En omettant le point (603,4 ; 11,64) sur cette figure, on obtient une courbe qui passe par un maximum situé vers une concentration en ATP dans la zone de 400 à 800 µM; la vitesse initiale baisse très rapidement pour des concentrations initiales en ATP plus élévées. Il y a apparemment inhibition par excès de substrat.

La différence quantitative entre les résultats obtenus lors des deux essais est sans doute due à des différences dans le matériel biologique (concentration en biomasse, conditions de sonification...)

La valeur de 400 µM en ATP a été retenue pour les essais suivants, ce en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature (tableau 1.11).

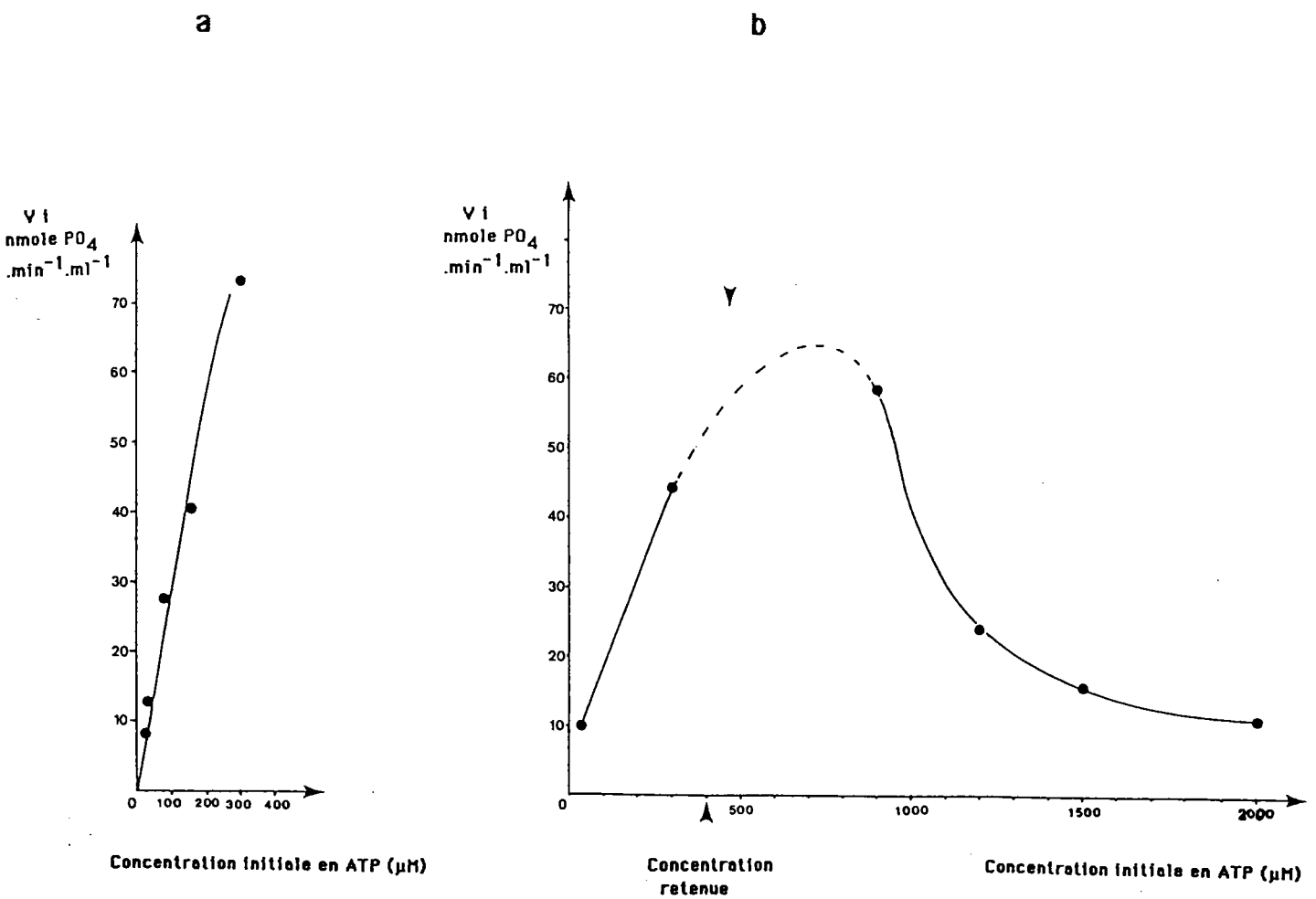


Fig. 3.1. L'activité polyphosphate-kinasique en fonction de la concentration initiale en ATP. Premier (a) et deuxième (b) essai.

3.2. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN POLYPHOSPHATES.

Protocole.

La production de biomasse utilisée pour ces essais a été décrite précédemment. La préparation de l'extrait enzymatique a été réalisée selon la méthode exposée dans le § 2.4, à l'exception de l'extraction proprement dite, qui a été réalisée par un traitement aux ultrasons durant 10 min, à une puissance de 50 W. Le milieu d'extraction consistait en un tampon Tris HCl (0,025M, pH = 7,0), dépourvu de polyphosphates.

Le milieu de réaction contenait: de l'ATP (400µM), du $MgCl_2$ (20 mM) et 2 unités de CPK par 100 µl de milieu de réaction. De plus, des polyphosphates à des concentrations finales entre 0 et 1,96 mM ont été ajoutés.

Résultats.

Les concentrations en poly-P sont rapportées dans le tableau 3.2, ainsi que les vitesses initiales de l'activité polyphosphate-kinasique obtenues. Des estimations de la reproductibilité n'ont pu être calculées faute de répétitions.

Tableau 3.2. Vitesses initiales (v_i) de la polyphosphate-kinase mesurées en fonction des concentrations en polyphosphates ajoutés.

|poly-P| mM	v_i nmoles.min^{-1}.ml^{-1}
0,0	0,07
$7,66.10^{-3}$	0,18
$3,06.10^{-2}$	0,08
$1,23.10^{-1}$	0,49
$4,90.10^{-1}$	0,90
1,96	1,52

mM: mM exprimé comme $NaPO_3$

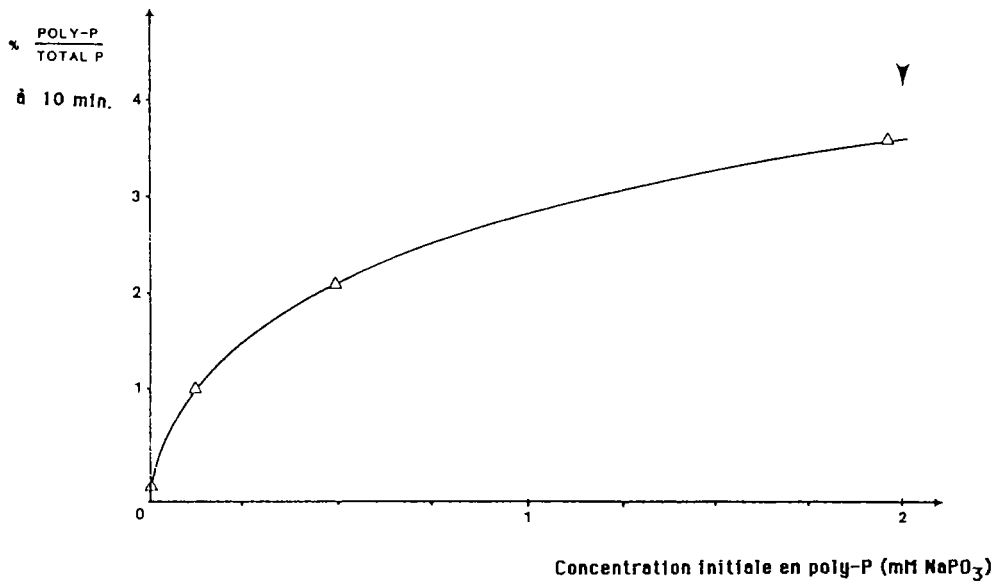


Fig. 3.2. L'activité polyphosphate-kinasique en fonction de la concentration en polyphosphate ajouté.

Sans ajout de poly-P dans le milieu de réaction, la vitesse initiale est extrêmement faible (Tab. 3.2, Fig. 3.2). A des concentrations supérieures à environ 2mM, la cinétique de la réaction devient d'ordre 0 par rapport à la concentration en poly-P.

La concentration en poly-P dans le milieu de réaction a été fixée à 2 mM. Lors des essais suivants, le poly-P est ajouté au milieu d'extraction, et non au milieu de réaction, pour qu'il puisse exercer une fonction protectrice lors de la sonification (ANDREARCZYK, comm. pers.) en plus de sa fonction initiatrice des chaînes de poly-P lors de la réaction enzymatique (WIDRA *et al.*,1959).

3.3. CHOIX DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CREATINEPHOSPHO-KINASE (CPK).

Protocole.

La production de biomasse utilisée pour ces essais a été décrite précédemment. La préparation de l'extrait enzymatique a été réalisée comme décrit dans le §2.4, à l'exception de la sonification: la biomasse a été traitée aux ultrasons pendant 10 min à 50 W dans le milieu standard d'extraction.

Deux essais ont été effectués. Les concentrations des réactifs dans les deux essais étaient identiques, à l'exception des concentrations en CPK et ATP; Tris HCl 0,0625 M; Créatinephosphate 20 mM; $MgCl_2$ 20 mM.

Lors du premier essai, la concentration initiale en ATP était de 400 µM; les concentrations en CPK testées se situaient dans la gamme de 0 à 80,2 $u.ml^{-1}$. Lors du deuxième essai, la concentration en ATP était de 385 µM; la gamme de concentrations en CPK était comprise entre 10,0 et 30,0 $u.ml^{-1}$.

Résultats.

Les concentrations en CPK utilisées, ainsi que les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 3.3 et représentés sur la figure 3.3. Des estimations de l'erreur sur la mesure n'ont pas été calculées par manque de données.

Les vitesses obtenues lors du premier essai se situent entre 3,0 et 4,8 nmoles de phosphate transferés par minute et par millilitre de milieu réactionnel. La plus faible vitesse correspond à un essai sans CPK. Les vitesses initiales mesurées avec une concentration de 10,03; 20,01; 40,10 et 80,20 $u.ml^{-1}$ sont sensiblement identiques. Comme le montre la figure 3.3, l'évolution de la radioactivité incorporée dans la fraction des polyphosphates reste linéaire plus longtemps avec 10,03 u de CPK qu'avec d'autres concentrations. Le caractère linéaire de la courbe facilite l'estimation de la vitesse initiale de la réaction.

Tableau 3.3. Influence de la concentration en créatinephospho-kinase (CPK) sur l'activité polyphosphate-kinasique (v_i).

	CPK $u.ml^{-1}$	v_i $nmole\ P.min^{-1}.ml^{-1}$
Essai N° 1	0,00	3,0
	10,03	5,4
	20,01	6,2
	40,10	5,9
	80,20	4,8
Essai N° 2	10,0	9,8
	15,0	9,6
	20,0	9,6
	25,0	8,6
	30,0	10,4

Les résultats du deuxième essai sont très homogènes; dans la gamme de concentrations en CPK entre 10,0 et 30,0 $u.ml^{-1}$, et dans les conditions expérimentales appliquées, la concentration en CPK a peu d'influence sur l'activité polyphosphate-kinasique.

Vu les résultats des deux essais, la concentration en CPK dans le milieu de réaction a finalement été fixée à 10,0 $u.ml^{-1}$.

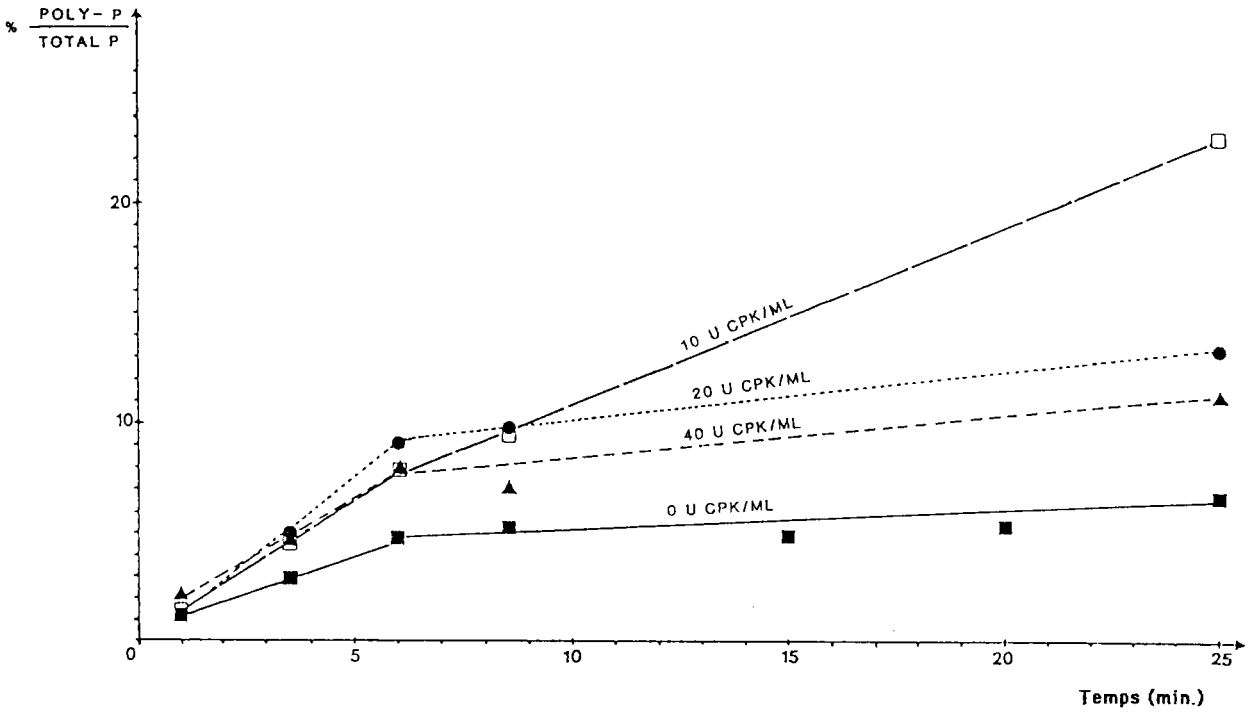


Fig. 3.3. Synthèse *in vitro* de poly-P au cours du temps en fonction de la quantité de créatinephospho-kinase (unités de CPK par ml) ajoutée au système. Premier essai.

3.4. CHOIX DE LA CONCENTRATION EN ATP POUR LES ESSAIS AVEC LES BOUES

Protole.

Deux échantillons de boue ont été testés: B8, provenant du pilote de déphosphatation du laboratoire de la Lyonnaise des Eaux alimenté avec une eau résiduaires urbaine, et L4, provenant d'un pilote alimenté avec un effluent de laiterie (S2.2). Les échantillons ont été traités comme décrit dans le S 2.4; la méthode de dosage était celle décrite dans le S 2.5, sauf que des concentrations initiales en ATP dans la gamme de 400 à 2000 µM ont été utilisées.

Résultats.

L'évolution dans le temps de la quantité de phosphore radioactif incorporé dans la fraction des polyphosphates est tracée sur la figure 3.4. L' activité des échantillons B8 et L4, pour des concentrations initiales en ATP de 400, 700, 1000 1500 et 2000 µM n' était pas mesurable. Par défaut à une démonstration d'une autre concentration plus optimale, la concentration initiale en ATP reste fixée sur 400 mM pour les essais avec les boues menés ultérieurement.

3.5. ESSAI DE PRETRAITEMENT DES BOUES.

La mise au point d'un protocole de prétraitement des boues, préalablement au dosage de la polyphosphate-kinase, a pour but de se débarrasser d'interférences potentielles. Il a été décidé d'examiner les facteurs suivants:

- certaines molécules (exopolysaccharides...) sont susceptibles de complexer des facteurs nécessaires à la réaction de synthèse des polyphosphates. Le but est d' étudier l'influence d'un "lavage" des boues préalablement à l'extraction, sur l'élimination de ces molécules;

- l'effet de la présence d'un substrat compétitif pour les protéases dans le milieu au moment de l'extraction; en particulier l'ajout d'histone a été testé pour éviter la dégradation éventuelle de l'enzyme polyphosphate-kinase par les protéases;

- l'optimisation la durée du traitement aux ultrasons. Il est concevable que les structures du floc nécessitent une durée de sonification plus importante que la biomasse obtenue lors d'une culture pure.

Protocole.

Le protocole développé pour la mise au point du traitement des boues, préalablement au dosage proprement dit, est schématisé sur la figure 3.5. Une étape de "lavage" et une étape d'extraction peuvent être distinguées.

Un échantillon de boue prélèvé dans le bassin anoxique dun pilote alimenté avec des eaux résiduaires urbaines (B7, tableau 2.1) a été décongelé, et deux (sous-)échantillons de 5 ml ont été mélangés avec chaque fois 5 ml de tampon Tris-HCl 0,025 M à pH 7,0.

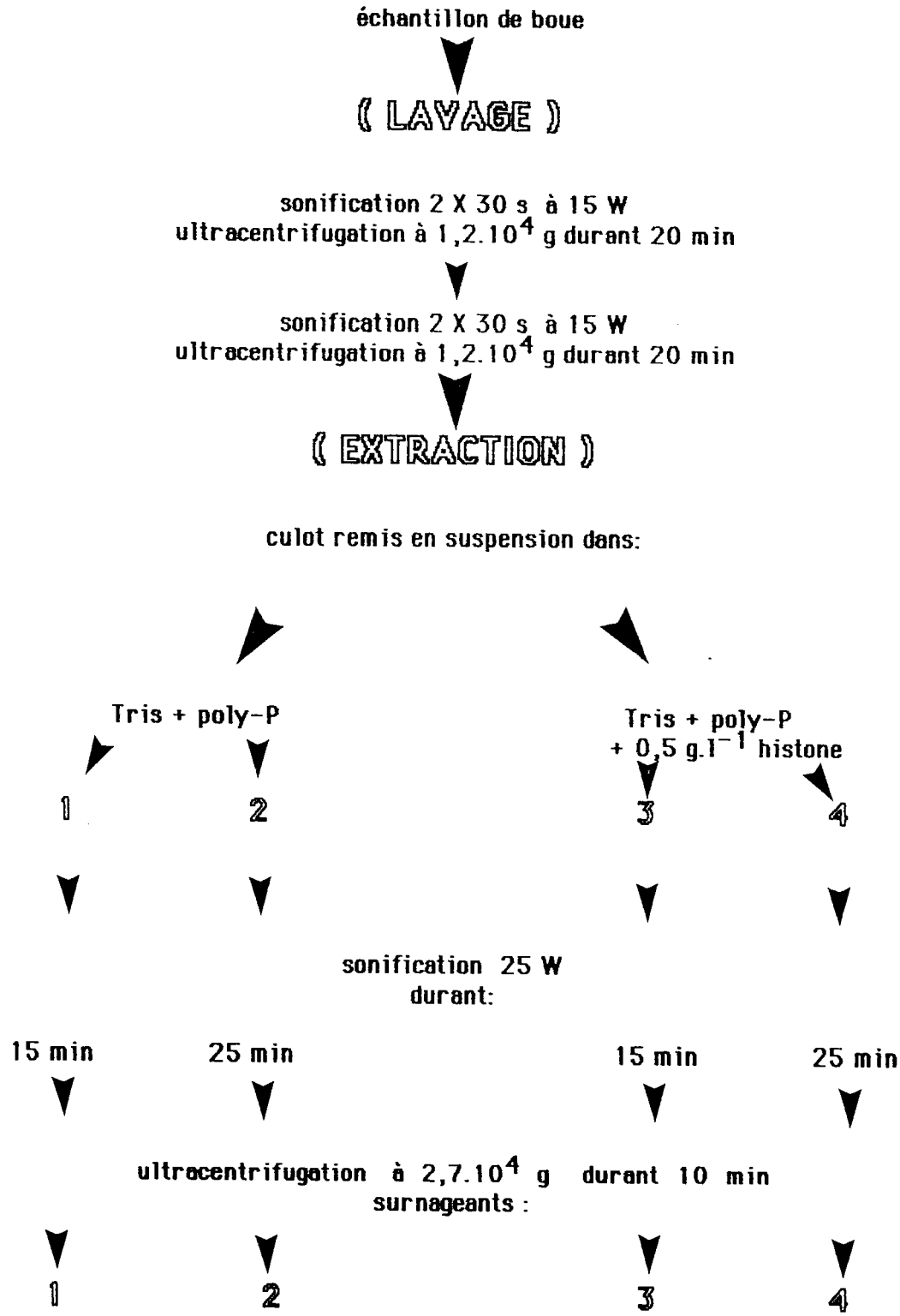


Fig. 3.4. Représentation schématique du protocole de traitement des boues préalable au dosage de l'activité polyphosphate-kinasique.

L'étape de "lavage" consiste en un traitement très court aux ultrasons à faible puissance et une ultracentrifugation pour séparer les molécules solubilisées des cellules bactériennes (GEHR *et* HENRY, 1983).

Les deux échantillons de 10 ml ont été traités aux ultrasons durant 2 fois 30 secondes à une puissance de 15 W; les deux étapes de sonification étaient espacées d'une minute pour réfrigérer les échantillons. Ensuite les échantillons ont été centrifugés à 12 000 g pendant 20 min à une température comprise entre 0 et 4 °C. Les surnageants ont été prélevéset les concentrations en protéines et en sucres mesurées (1er surnageant). Les culots ont été récupérés dans 10 ml de solution tampon Tris et le traitement a été répété (2me surnageant).

Après ce "lavage" préalable, 4 essais d'extraction comparatifs ont été conduits; deux milieux d'extraction (avec et sans 0,5 $g.l^{-1}$ d'histone) ont été combinés avec deux durées de sonification différentes (15 et 25 min).

Après le traitement aux ultrasons, les 4 échantillons ont été centrifugés à 27 000 g durant 10 min, à une température comprise entre 0 et 4 °C. Le culot a été éliminé; le surnageant a été congelé jusqu'au moment du dosage de la polyphosphate-kinase.

Résultats.

Le tableau 3.4 résume les résultats obtenus avec les 4 extraits. Les numéros des extraits correspondent aux numéros sur la figure 3.5. Le protocole n'a été exécuté qu'une fois. En conséquence, une estimation de la reproductibilité n'était pas possible.

Le premier "lavage" enlève une quantité considérable de sucres (plus de 1 mg de sucres par échantillon de 5 ml de boue, correspondant à une masse de boue d'environ 50 mg), mais également une quantité conséquente de protéines (plus de10 mg de protéines par échantillon de boue, soit 1/5 de la masse de l'échantillon original). Le deuxième lavage témoigne de l'efficacité du premier; seulement 0,2 mg de sucres ont été éliminés (1/5 de la quantité enlevée lors du premier lavage). La quantité de protéines éliminées lors du deuxième lavage est encore importante (environ 5 mg de protéines par échantillon de boue).

Tableau 3.4. Résultats des dosages effectués sur les surnageants obtenus lors des différentes étapes du protocole de prétraitement et d'extraction des boues schématisé par la figure 3.5.

Extrait	1er surnageant		2me surnageant		extrait enzymatique	
	protéines	sucres	protéines	sucres	protéines	A_S
N°	$\mu g.ml^{-1}$	$\mu g.ml^{-1}$	$\mu g.ml^{-1}$	$\mu g.ml^{-1}$	$\mu g.ml^{-1}$	
1	1100	102	480	19	1510	0,06
2	1100	102	480	19	1100	0,0
3	1080	104	490	23	1970	0,0
4	1080	104	490	23	1430	0,0

A_S: Activité spécifique de la polyphosphate-kinase (nmole $P.mg^{-1}prot.min^{-1}$).

La quantité de protéines mesurée dans les 4 extraits est comparable: entre 1100 et 1970 $\mu g.ml^{-1}$, car l'histone ajouté n'influence pas le dosage des protéines selon le protocole décrit dans le § 2.7. Ceci a été confirmé par une gamme étalon de 0 à 1000 $\mu g.ml^{-1}$ d'histone dans le milieu d'extraction.

Le seul extrait qui présente une activité polyphosphatekinasique est le N° 1, sans ajout d'histone et avec un temps de sonification de 15 min. Cet extrait a été utilisé dans l'essai avec l'étalon interne (§4.4).

Les résultats obtenus sont discutés dans le § 5.3.

4. PROTOCOLES ET RESULTATS.

4.1. MESURE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE CONSTITUTIVE. 68

4.2. ESSAI D'INDUCTION DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE PAR UNE CARENCE EN PHOSHATES. 69

4.3. ESSAIS D'INDUCTION DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE PAR DES CONDITIONS ANAEROBIES. 71

4.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE DES EXTRAITS DE BOUES ACTIVEES SANS PRETRAITEMENT. 75

4.5. ESSSAIS DE DOSAGE DE L'ACTIVITE D'ECHANTILLONS COMPOSES D'EXTRAITS D'*Acinetobacter* ET D'UNE BOUE (ECHANTILLONS DITS AVEC "ETALON INTERNE"). 77

4. PROTOCOLES ET RESULTATS.

4.1. MESURE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE CONSTITUTIVE.

Un nombre important de bactéries possèdent l'enzyme ATP-polyphosphate phosphotransférase (§ 1.4). La technique de dosage mise au point pour *Acinetobacter* (§ 3) a été appliquée à un échantillon de souches, sans induction particulière de leur activité polyphosphate-kinasique. Le but était de vérifier la possibilité d'appliquer la méthode sur d'autres souches, et de comparer l'activité constitutive de quelques souches.

Protocole.

Quatre souches, rapportées dans le tableau 4.1 ont été cultivées dans des fioles de WIAME sur le milieu glucose-acétate (§ 2.3). La température était de 30 °C, le pH initial de 7,0. La croissance a été suivie par la mesure de la DO à 620 nm. Chaque culture a été prélevée au début de la phase de ralentissement de croissance. Par conséquant, la durée de la culture n'était pas fixée d'avance et dépendait de la souche. Elles ont été centrifugées à 3400 g pendant 15 min. Les culots ont été remis en dans 5 ml du milieu standard d'extraction, et soumis au protocole décrit dans les § 2.4 et 2.5.

Résultats.

L'activité polyphosphate-kinasique mesurée chez les différentes souches est rapportée dans le tableau 4.1, exprimée en activité spécifique (A_S). La répétabilité est estimée par l'écart type. Deux cultures de la même espèce (*Acinetobacter calcoaceticus*) ont été réalisées. La différence (un facteur 2) observée entre les deux cultures n'a pas été expliquée. Bien que plus faible que chez *Acinetobacter*, *Pseudomonas fluorescens* présente également une activité polyphosphate-kinasique. Dans nos conditions expérimentales, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Serratia sp.* ne présentent pas d'activité mesurable. Ces résultats seront discutés dans le § 5.

Tableau 4.1. Activité constitutive de l'enzyme polyphosphate-kinase chez quatre souches bactériennes.

Souche	DO_{620} finale % transmission	pH final	A_s nmole $P.min^{-1}.mg^{-1}$ prot.
Acinetobacter calcoaceticus (1)	50	ND	4,0 ± 0,3
A. calcoaceticus (2)	60	ND	1,8 ± 0,1
Bacillus subtilis	69	ND	0,0
E. coli	68	ND	0,0
Pseudomonas fluorescens	60	8,66	0,40 ± 0,03
Serratia sp.	58	8,56	0,0

ND : **non déterminé**

4.2 ESSAI D'INDUCTION DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE PAR UNE CARENCE EN PHOSPHATES.

Selon HAROLD (1963,1966) l'enzyme polyphosphate-kinase d' *Enterobacter* est induite par une carence en phosphates. Il semble intéressant d'examiner si le même phénomène se produit chez notre modèle, *Acinetobacter*.

Protocole.

Acinetobacter calcoaceticus a été cultivé en flacon erlenmeyer dans le milieu glucose-acétate à 30°C. La biomasse a été recoltée au moment où la DO à 620 nm était de 0,718. Le pH final était de 7,45. Deux échantillons de 400 ml ont été centrifugés à 3400 g pendant 20 min. Le premier culot a été remis en suspension dans le même milieu, mais avec omission de

phosphates inorganiques, pour la culture (*). Le deuxième culot a été remis en suspension dans 5 ml de milieu standard d'extraction, et congélé jusqu'au moment de l'extraction.

La culture (*), sans phosphates inorganiques, a été réalisée dans un erlenmeyer d'une capacité de 1000 ml, avec 400 ml de milieu sans ajout de phosphore inorganique.

Après deux heures, la culture a été centrifugée à 3400 g pendant 20 min, et le culot a été remis en suspension dans 5 ml de milieu standard d'extraction, puis congelé jusqu'au moment de l'extraction.

Résultats.

Les résultats des dosages de l'activité polyphosphate-kinasique et l'écart type sur la mesure sont rapportés dans le tableau 4.2. Une nette augmentation de l'activité enzymatique est observée au terme de la culture dans le milieu sans ajout de phosphates inorganiques. Ces résultats suggèrent un phénomène de "surcompensation de la carence en phosphore" (HAROLD,1964; § 1.5). Cet accord avec les données de la littérature tend à valider la méthode de dosage (§ 2.5). La méthode et les résultats obtenus sont discutés dans les § 5.1 et § 5.4, respectivement.

Tableau 4.2. Influence d'une carence en phosphate inorganique sur l'activité polyphosphate-kinasique (activité spécifique ± écart type).

	A_3 nmole P/min/mg prot.
avant carence	**4 ± 4**
après carence	**10 ± 1**

4.3. ESSAIS D'INDUCTION DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE PAR DES CONDITIONS ANAEROBIES.

NICHOLLS *et* OSBORN (1979) ont appliqué le terme "overplus compensation" à l'accumulation de phosphore suite à un "stress anaérobie" dans le traitement des eaux résiduaires (§1.5). Le terme "overplus compensation" implique selon HAROLD (1966) une induction de la polyphosphate-kinase. Non seulement aucune évidence expérimentale ne confirme l'application du terme "overplus compensation" dans le cas d'un traitement des eaux résiduaires, mais à notre connaissance aucune observation d'une induction de la polyphosphate-kinase par un séjour en conditions anaérobies n'a été rapportée dans la littérature avant T'SEYEN *et al.* (1984).

Protocole

Des cultures de: *Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus", Aeromonas hydrophila, Pseudomonas fluorescens* et de *Pseudomonas vesicularis* ont été conduites en fermenteur selon le protocole schématisé dans la figure 4.1.

Pour chaque souche un fermenteur contenant 500 ml de milieu glucose-acétate a été ensemencé à partir d'une préculture. Après 10 h, la DO à 620 nm a été lue, puis du milieu glucose-acétate a été ajouté jusqu'à un volume de 1500 ml. La DO a été suivie par de prélèvements réguliers. En phase de croissance exponentielle, un échantillon (1) de 400 ml a été recueilli dans un récipient placé dans un bain de glace, et traité comme décrit dans le § 1.10. Immédiatement après, l'insufflation d'air a été remplacée par une insufflation d'azote afin de créer des conditions anaérobies. (La concentration en oxygène chutait immédiatement d'une valeur entre 70 et 90 % à une valeur entre 2 et 5 % de la saturation. Bien que ces chiffres (2 à 5 % de la saturation) suggèrent la présence d'une quantité résiduelle d'oxygène, la croissance des bactéries s'est interrompue brusquement.

Deux heures plus tard, un deuxième échantillon (2) a été pris et traité ensuite comme décrit dans le § 2.5. L'insufflation de l'azote a été remplacée par une insufflation d'air. Un nouveau ajout de milieu a été réalisé, jusqu'au volume de 1500 ml. L'introduction du milieu a été effectuée à un faible débit (environ 100 $ml.min^{-1}$), afin de ne pas provoquer une brusque

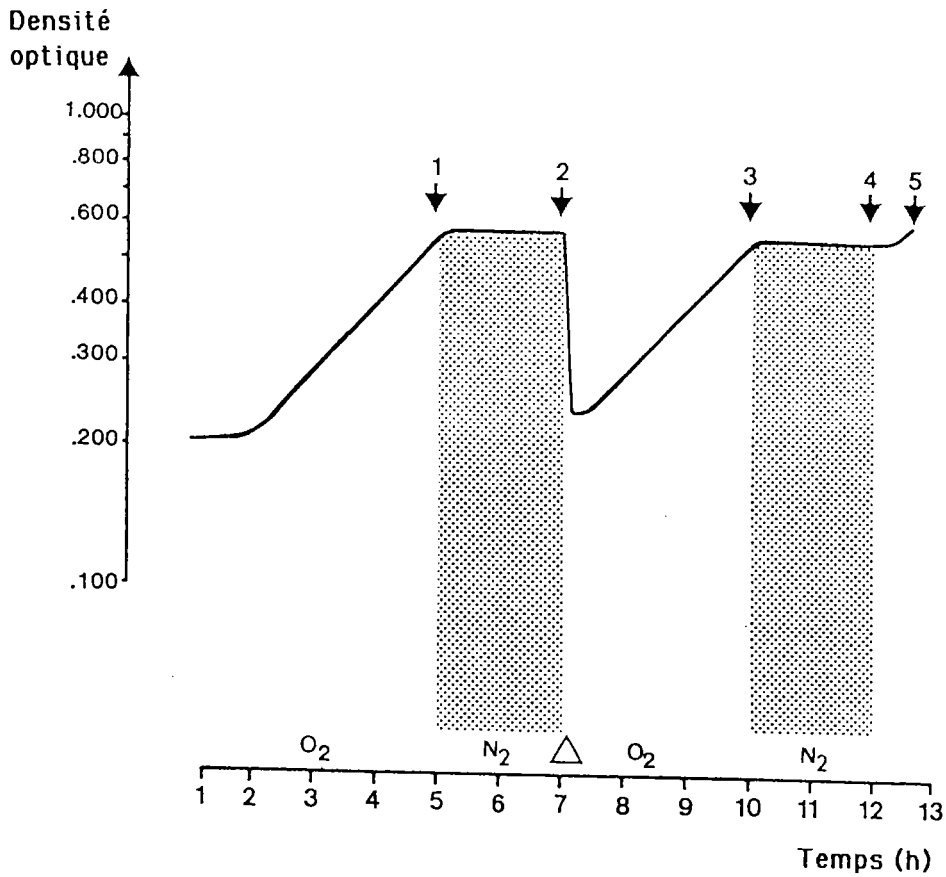


Fig. 4.1. Schéma des cultures aérobies-anaérobies. La courbe trace l'évolution dans le temps de la DO à 620 nm.

↓ **Prise d'échantillon de 400 ml de culture bactérienne.**

△ **Addition de milieu de culture (glucose-acétate).**

□ **conditions aérobies.**

▒ **conditions anaérobies.**

baisse de la température du milieu. Comme le montre le schéma sur la figure 4.1, l'ajout de milieu et l'introduction d'air a permis une reprise de la croissance. Lors de la phase de

croissance exponentielle, l'opération décrite a été répétée: deux échantillons (3 et 4) ont été de nouveau prélèvés suivant la même procédure.

A la fin de l'expérience (10 à 15 h), l'insufflation d'azote a été remplacée par l'aération, et une heure plus tard un cinquième échantillonage (5) a été effectué.

Résultats.

L'activité spécifique de la polyphosphate-kinase chez les cinq souches est rapportée dans le tableau 4.3. Les concentrations extracellulaires en orthophosphate sont rapportées dans le tableau 4.4.

Les souches *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas vesicularis* ne présentent aucune activité polyphosphate-kinasique mesurable.

L'activité enzymatique des autres souches (*Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter calcoaceticus* et *Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus"*) est variable. A une exception près, l'activité est plus élevé après une période anaérobie (échantillons 2 et 4) qu' après une période d'aérobiose (échantillons 1, 3 et 5). Ces résultats suggèrent un effet d'induction par une période anaérobie. Ce phénomène est le plus évident chez *Acinetobacter calcoaceticus*. Un test d'ordination des résultats a été effectué sur les souches qui présentent une activité polyphosphate-kinasique (*Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter calcoaceticus* et *Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus"*). Selon le test de WILCOXON (LANGLEY, 1979) pour des essais non appariés, la probabilité que la différence observée entre les activités avant (échantillons 1, 3 et 5) et après une période anaérobie (échantillons 2 et 4) soit due au hasard est de 0,05 ($n_A = 6$, $n_B = 8$; $R = 29$). Si l'on accepte l'hypothèse d'une induction de la polyphosphate-kinase par une période anaérobie, on a 5 % de chance de commettre un jugement erroné.

Rien n'explique de façon rigoureuse pourquoi, chez *Acinetobacter calcoaceticus*, l'activité des échantillons 3 (après la deuxième période d'aératation) est inférieure à celle des échantillons 1 (première période aérée).

Tableau 4.3. Activité polyphosphate-kinasique (A_S en nmole P .mg^{-1}prot. min^{-1}) de cinq cultures bactériennes dans une alternance de conditions aérobies et anaérobies. Les N° des échantillons font référence à la figure 4.1.

Souche	Echantillons 1	2	3	4	5
Acinetobacter calcoaceticus	0,79±0,05	1,42±0,04	0,08±0,01	0,48±0,09	0,24±0,01
A. calcoaceticus "phosphadevorus"	0,32±0,03	0,12±0,03	0,0	0,41±0,04	0,02±,01
Aeromonas hydrophila	0,0	0,0	0,0	0,0	ND
Pseudomonas fluorescens	0,03±0,01	0,83±0,04	0,68±0,05	0,86±0,08	ND
Pseudomonas vesicularis	0,0	0,0	0,0	0,0	ND

ND : **non déterminé.**

Les concentrations extracellulaires en orthophosphates (Tab. 4.4) varient de manière aléatoire. Dans aucun cas, une absorption de phosphore en aérobiose et un relargage en anaérobiose ne sont observés. Selon le même test de WILCOXON, la probabilité que les différences observées entre les concentrations en orthophosphates avant et après une période anaérobie soit due au hasard est supérieur à 0,1 (n_A = 14, n_B = 9, R = 0,4). En conséquence, nous acceptons l'hypothèse selon laquelle l'anaérobiose n'a pas eu une influence sur la concentration en orthophosphates lors de ces expériences.

Tableau 4.4. Les concentrations en orthophosphates (en $mg.l^{-1}$) dans le surnageant des cinq cultures bactériennes dans une alternance de conditions aérobies et anaérobies. Les N° des échantillons font référence à la figure 4.1.

Souche	Echantillons				
	1	2	3	4	5
Acinetobacter calcoaceticus	30,3	31,2	29,3	25,3	27,2
A. calcoaceticus "phosphadevorus"	30,3	37,0	30,3	29,0	30,9
Aeromonas hydrophila	28,3	27,7	27,0	26,8	26,0
Pseudomonas fluorescens	26,3	23,2	22,5	20,7	21,0
P. vesicularis	26,0	ND	24,3	24,7	ND

ND : **non déterminé.**

4.4 DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE DES EXTRAITS DE BOUES ACTIVEES SANS PRETRAITEMENT.

Un grand nombre de bactéries possède l'enzyme polyphosphate-kinase (revues de HAROLD, 1966 et de KULAEV *et al.*, 1971). La polyphosphate-kinase de certaines souches pures est induite par un séjour en conditions anaérobies (S 4.3). NICHOLLS *et* OSBORN (1979) ont avancé l'hypothèse que l'accumulation du phosphore dans les boues ait lieu par le mécanisme de la "overplus compensation", proposé par HAROLD (1966). Cependant, aucune information ne semble être publiée sur l'activité polyphosphate-kinasique des boues des installations classiques ou des installations de déphosphatation biologique. Il semble intéressant de comparer l'activité des boues provenant des installations classiques et des installations de déphosphatation biologique. Cette comparaison peut nous apprendre si les boues classiques ont l'équipement enzymatique nécessaire pour éliminer le phosphore, ou s'il leur faut une

adaptation quelconque (induction,renouvellement de la flore...) avant de pouvoir assumer cette fonction.

Protocole.

Dans un premier temps, l'activité polyphosphate-kinasique de 12 extraits de boues a été dosé selon le protocole décrit dans les § 2.4 et 2.5. Les 12 échantillons de boue (A1, A3, A6, A8, A9, B1, B4, B7, B8, L4, PACA, PACB) provenant de pilotes de déphosphatation biologique ont été décrits dans le tableau 2.1.

La boue B8 a été traitée aux ultrasons premièrement à une concentration en MS de 10 $g.l^{-1}$ et deuxièmement diluée préalablement à 4 $g.l^{-1}$ par une solution tampon Tris-HCl (0,025 M; pH = 7,0). Tous les autres paramètres étaient comme décrit dans les § 2.4 et 2.5.

Dans un deuxième temps un échantillon des boues de la station d'épuration de Metz a été soumis à un protocole analogue à celui décrit dans le § 4.3. Les seules modifications apportées sont les suivantes: la culture dans le fermenteur n'a pas été alimenté avec le milieu glucose-acétate mais avec de l'eau résiduaire décantée, prélèvée à la station d'épuration de Metz et conservée à 0 °C, et portée à 23 °C avant d' être ajoutée à la culture. La DO n'a pas été suivie; les durées de l'aérobiose ont été fixées à 4 h, et les durées de l'anaérobiose à 2 h. Les matières sèches ont été déterminées lors de chaque échantillonage (§ 7.3). L'extraction et le dosage ont eu lieu comme décrit pour les souches bactériennes pures (§ 2.5).

Résultats.

Aucun échantillon de boue provenant d'un pilote de déphosphatation ne présentait une activité polyphospate-kinasique mesurable, indépendemment d'une dilution éventuelle de la boue avant la sonification.

Les résultats obtenus avec la boue provenant de la station d'épuration de Metz sont rassemblés dans le tableau 4.5. L'activité de cette boue est faible mais mesurable. Une induction de la polyphosphate-kinase par anaérobiose ne peut être démontrée à l'aide des chiffres obtenus.

Tableau 4.5. Activité polyphosphate-kinasique (A_s en nmole $P.mg^{-1}prot.min^{-1}$), poids sec des matières en suspension (MS, en $g.l^{-1}$), et concentration en phosphore soluble (P_{milieu}, en $mg.l^{-1}$) d'une boue dans une alternance de conditions aérobies et anaérobies. Les N° des échantillons font référence à la figure 4.1.

Paramètres	Echantillons			
	1	2	3	4
A_s($nmole\ P.mg^{-1}prot.min^{-1}$)	0,03	0,04	0,08	0,07
MS ($g.l^{-1}$)	0,66	0,55	0,24	0,20
P_{milieu} ($mg.l^{-1}$)	1,5	1,2	0,7	0,7

4.5. ESSAIS DE DOSAGE DE L'ACTIVITE D'ECHANTILLONS COMPOSES D'EXTRAITS D' *Acinetobacter* ET D'UNE BOUE, (ECHANTILLONS DITS AVEC "ETALON INTERNE").

Afin de pouvoir déceler un effet inhibiteur éventuel, exercé par des constituants des boues sur l'activité polyphosphate-kinasique, un extrait bactérien avec une activité connue (étalon) a été ajouté à des extraits de boues. Une inhibition est mise en évidence si l'activité de l'étalon interne est inférieur à l'activité attendue.

Protocole.

Un extrait enzymatique préparé à partir d'une culture d' *Acinetobacter calcoaceticus* (S 4.1), appelé "**étalon interne**" a été ajouté en différentes proportions à des extraits de boues traitées (B7 N°1 ; S 3.5) ou non traitées (B7)préalablement à l'extraction.

Afin de pouvoir distinguer l'effet de dilution par les boues et l'effet inhibiteur éventuel des boues sur l'étalon, l'activité enzymatique d'une série témoin a été mesurée. Le témoin était constitué d'un étalon ajouté non à une boue mais à une solution tampon Tris-HCl (0,05 M; pH = 7,0).

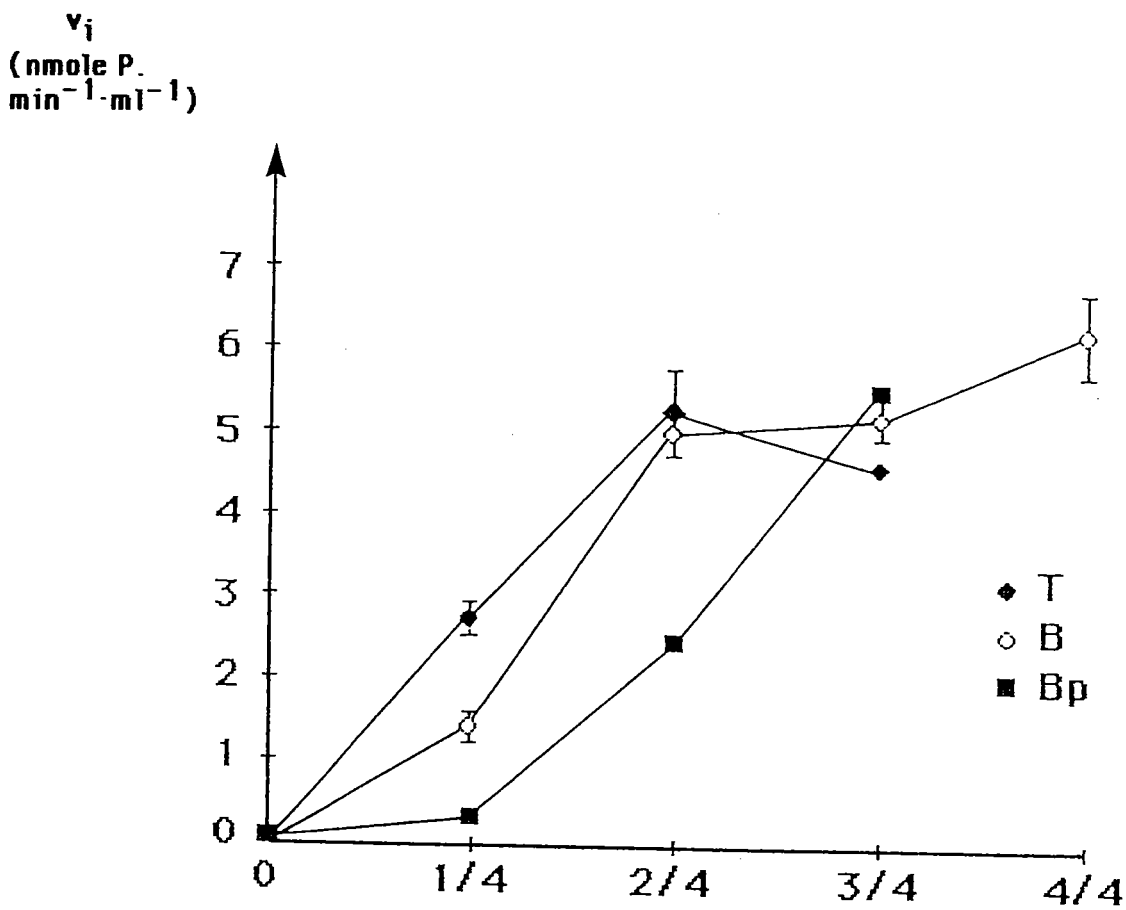
Des mélanges de l'étalon et les boues ont été testés dans la gamme de proportions des deux constituants de 0/4 à 4/4. Le tableau 4.6 résume les mélanges réalisés. Puisqu'il s'agit d'un ensemble d'essais comparatifs, les activités sont exprimées en vitesse initiale (v_i), et non en activité spécifique (A_s).

Tableau 4.6. Activité polyphosphate-kinasique (v_i: nmole P. $ml^{-1}.min^{-1}$) d'échantillons composés d'extraits de boue (B) ou de boue prétraitée (Bp) et un étalon interne (extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus*).

Proportion d'étalon (*Acinetobacter*) dans l'échantillon composé:	Etalon+Tris	Etalon + B	Etalon + Bp
0/4	0,0	0,0	0,07 ± 0,02
1/4	2,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,32 ± 0,03
2/4	5,3 ± 0,4	5,0 ± 0,3	2,44 ± 0,04
3/4	4,60±0,07	5,20±0,25	5,53 ± 0,45
4/4	6,1 ± 0,3		6,4 ± 0,7

B : extrait de la boue B7 (S 2.2)
Bp: extrait de la boue B7 prétraitée (B7 N° 1; S 3.5)
Etalon: extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* (S 4.1)

La figure 4.2 donne une image des résultats. L'activité du témoin (extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* + tampon Tris-HCl) n'augmentait pas régulièrement en fonction de la concentration en extrait d' *Acinetobacter calcoaceticus* (l' étalon interne); à des concentrations élèvées (proportion de l'étalon sur le total > 2/4), il semble y avoir une phase plateau. Une observation analogue est faite pour les échantillons composés d'extrait de



Proportion d'extrait d'*Acinetobacter* dans l'échantillon testé.

Fig. 4.2. Activité polyphosphate-kinasique d'échantillons composés d'extraits de boue (B) ou de boue prétraitée (Bp) et un étalon interne (extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus*). Vitesse initiale mesurée (v_i) en fonction de la proportion d'extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* dans l'échantillon.

T : solution tampon Tris-HCl + étalon
B : extrait de la boue B7 (S 2.2) + étalon
Bp: extrait de la boue B7 prétraitée (B7 1.1 ; S 3.5) + étalon

boue sans prétraitement + étalon interne; à faible concentrations en *Acinetobacter* (proportion de l'étalon < 2/4) l'activité augmente régulièrement en fonction de la concentration, mais à des plus fortes concentrations (>2/4), cette tendance ne se confirme pas. L'activité des l'échantillons composés de l'étalon interne + extrait de boue prétraitée augmente plus lentement en fonction de la concentration en étalon. Jusqu'à une proportion de 2/4 extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus*, l'activité des échantillons contenant de l'extrait de boue prétraitée sont inférieures à celle des échantillons contenant de l'extrait de boue sans prétraitement. A une proportion d'extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* de 3/4 l'activité de l'échantillon contenant de l'extrait de boue prétraitée dépasse celle des autres échantillons. Cette expérience confirme que l'activité polyphosphate-kinasique d'un extrait de boue, prétraitée ou non, sans ajout d' extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* est zéro, ou tout au moins non mesurable dans nos conditions. A des faibles concentrations en extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* (proportion < 2/4), l'activité des extraits des boues, et, étonnamment, surtout de la boue prétraitée, est inférieure à l'activité des témoins correspondants. Si un effet inhibiteur est invoqué comme explication de la non-mesurabilité de l'activité polyphosphate-kinasique, il faut noter que le prétraitement n'élimine pas cet effet. A des proportions élevées d' extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* dans la composition de l'échantillon, l'activité des échantillons contenant des extraits de boues (prétraitées ou non) et celle des témoins correspondants (tampon Tris) sont très proches. On ne peut conclure à une inhibition, ni à un synérgisme dans cette gamme de concentrations en extrait de boues (proportion d' extrait d'*Acinetobacter calcoaceticus* > 2/4).

5. DISCUSSION.

5.1. TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE. 82

5.2. MODELE BIOCHIMIQUE. 84

5.3. ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE MESUREE DANS LES EXTRAITS DE BOUES. 89

5.4. ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE MESUREE CHEZ DES SOUCHES PURES. 91

5.5 CONCLUSIONS. 94

5. DISCUSSION.

Dans le cadre de l'élimination du phosphore des eaux résiduaires par voie biologique, une étude a été menée afin de mieux comprendre le métabolisme des organismes qui participent à l'élimination du phosphore. La partie expérimentale porte sur l'activité de l'enzyme polyphosphate-kinase.

Premièrement, la méthode de dosage de la polyphosphatekinase mise au point (S 3) sera comparée à celles d'autres chercheurs. Ensuite le modèle du métabolisme de l'acétate et des polyphosphates sera rappelé et discuté. Enfin, l'activité polyphosphate-kinasique des boues et des souches pures sera discutée.

5.1. LA TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHOSPHATE-KINASIQUE.

L'adenosine triphosphate (ATP) est le substrat principal de la réaction de synthèse des polyphosphates (HAROLD, 1966). La concentration initiale en ATP choisie pour réaliser nos essais (400 µM) se situe dans la gamme de concentrations utilisées par d'autres chercheurs (LEVINSON *et al.*,1975; LI *et* BROWN, 1973).

Dans les expériences effectuées dans le cadre de cette étude, l'ADP formé lors de la réaction de synthèse des polyphosphates est transformé en ATP à l'aide d'un système comportant le créatinephosphate (CP) et l'enzyme créatinephosphate-kinase (CPK):

$$\text{ADP} + \text{CP} \xrightarrow{\text{CPK}} \text{créatine} + \text{ATP}$$

SHABALIN *et al.* (1977) ont utilisé le même système pour la régénération de l'ATP à partir de l'ADP formé lors de la réaction de synthèse des polyphospates. La quantité de CP utilisée dans nos expériences (20 mM) correspond à la quantité de CP utilisée par SHABALIN *et al.* (1977). Nos expériences avec les différentes concentrations en CPK indiquaient une concentration optimale (1 unité/140 µl) légèrement inférieure à celle de SHABALIN *et al.* (1977)(2 à 3 u./ 200 µl).

Les raisons de l'ajout de polyphosphates dans les milieux d'extraction et de réaction sont *a priori* multiples. Selon HAROLD (1963) les polyphosphates évitent l'adsorption des enzymes sur les parois du récipient. Ils pourraient jouer le rôle d'initiateurs des chaînes

lors de la réaction polyphosphate-kinasique (WIDRA, 1959). Finalement, ils pourraient agir comme protecteurs de l'intégrité des enzymes lors de l'extraction (ANDREARCZYK, comm. pers.). Indépendamment de leur mode d'action, la nécessité de la présence de polyphosphates dans le milieu de réaction est démontrée par l'expérience rapportée dans le S3.3. Cependant, une trop forte concentration en poly-P risque d'entrainer des effets secondaires: les polyphosphates pouvant interagir avec les protéines et les précipiter (HAROLD, 1963), l'homogéinisation du milieu de réaction peut poser des problèmes.

Il est important d'effectuer le dosage des protéines en comparaison avec une gamme étalon préparée dans la même solution que la solution essai (milieu standard d'extraction); Les composés du milieu d'extraction, et les polyphosphates en particulier, entrainent un décalage important de la courbe étalon par rapport à la courbe étalon préparée dans une solution physiologique (Figure en annexe 8).

La réaction catalysée par la polyphosphate-kinase nécessite des cofacteurs. La composition des milieux de réaction rapportés dans la littérature est très variable. Presque tous les chercheurs ajoutent Mg^{2+} (KORNBERG *et al.*, 1956; MUHAMMED, 1961; SHABALIN *et al.*, 1977; SUZUKI *et al.*, 1972) dans le milieu de réaction, et plus rarement Mn^{2+} (LEVINSON *et al.*, 1975). Ces cations divalents peuvent neutraliser les groupements anioniques de l'ATP ou des polyanions comme le poly-P. La concentration en Mg^{2+} ajouté au milieu de réaction de nos essais était de 10 mM, concentration appliquée également par LI *et* BROWN (1973).

Au cours de la mise au point du dosage, les concentrations des réactifs ont varié un à un, en gardant toutes les autres concentrations fixes. Les concentrations optimales des réactifs issues de ces expériences sont cohérentes avec les concentrations optimales rapportées dans la littérature. Il aurait été intellectuellement satisfaisant de réaliser une expérience récapitulative. Au cours de cette expérience, toutes les concentrations de réactifs varieraient selon un plan factoriel. Les résultats de cette expérience auraient permis de vérifier l'ensemble du système de dosage.

Les valeurs obtenues avec la méthode de dosage mise au point (S 3) sont situées dans la gamme des valeurs énoncées dans la littérature. L'activité mesurée sur des extraits d'*Acinetobacter calcoaceticus*, notre modèle biologique, varie entre 0,8 et 13 nmoles de phosphate transférés par minute et par mg de protéine (S4). A titre comparatif, SURESH *et al.* (1984) ont trouvé un maximum de 10 pmoles par min et par 0,1 ml d'extrait chez *Pseudomonas*

vesicularis: HAROLD et HAROLD (1965) et HAROLD (1964) ont annoncé entre 2 et 25 nmoles P. $min^{-1}.mg^{-1}$protéine chez *Enterobacter aerogenes*: LEVINSON *et al.* (1975) ont rapporté 1,1 nmole P. $min^{-1}.mg^{-1}$protéine chez *Arthrobacter atrocyaneus*: KORNBERG (1957) a trouvé une activité entre 1,3 et 11 nmole P. $min^{-1}.mg^{-1}$protéine chez *E. coli*. Les résultats de nos essais se situent donc dans la même gamme que ceux de KORNBERG (1957). Nos valeurs sont un peu décalées vers les faibles valeurs par rapport à celles de HAROLD (1964). Toutefois, les différences sont faibles; les résultats obtenus semblent cohérents avec les résultats rapportés dans la littérature.

A notre connaissance, des essais de dosage de l'activité de la polyphosphate-kinase dans les boues activées, comme décrits dans les § 4.4 et 4.5, n'ont pas été rapportés ultérieurement. En conséquence, une comparaison avec des données de la littérature n'est pas possible. Les résultats obtenus avec différentes boues sont discutés dans le § 5.3.

5.2. LE MODELE BIOCHIMIQUE.

Le modèle présenté sert a résumer et à structurer nos connaissances concernant la biochimie de l'élimination biologique du phosphore. Ce modèle est en grande partie basé sur les modèles proposés par NICHOLLS *et* OSBORN (1978), MARAIS *et al.* (1983) et par COMEAU *et al.* (1985). Bien que la plupart des réactions enzymatiques ait été démontrées par différents auteurs, l'existence chez un même organisme des voies métaboliques présentées est hypothétique, et devra être confirmée par des recherches ultérieures. Le modèle, simple et cohérent, explique qualitativement les phénomènes majeurs:

- l'importance de l'acétate par rapport aux autres substrats potentiels pour les bactéries poly-P;
- le relargage en anaérobiose de phosphates dans un rapport 1:1 par rapport à la quantité d'acétate consommé (COMEAU *et al.*, 1985; ARVIN *et*KIRSTENSEN, 1984; EKAMA *et al.*, 1984; FUKASE *et al.*, 1984; WENTZEL *et al.*, 1984; POTGIETER *et* EVANS, 1983; RENSINK, 1981; MEGANCK, comm pers.);
- l'évolution inverse des quantités de polyphosphate et de poly-hudroxybutyrate intracellulaires au cours du traitement anaérobie-aérobie (POTGIETER *et* EVANS, 1983;

FUKASE *et al.*, 1984; FUHS *et* CHEN, 1975).

Cependant, le modèle ne peut prédire d'une façon quantitative les phénomènes de relargage et d'absorption.

Le modèle comporte deux parties: les processus biochimiques en **anaérobiose**, et le métabolisme **aérobie**. En conditions anaérobies, deux processus sont effectués par deux populations différentes: d'une part une production d'acétate, et d'autre part une assimilation d'acétate.

En conditions anaérobies, certaines bactéries aérobies-anaérobies facultatives effectuent une **fermentation** (une dégradation dans laquelle des molécules organiques interviennent aussi bien en tant qu'accepteurs qu'en tant que donneurs d'électrons) à partir d'une fraction de la matière organique contenue dans l'eau résiduaire (BRODISCH, 1984; FUHS*et* CHEN, 1975; MARAIS *et al.*, 1983; MEGANCK *et al.*, 1984). Ce processus, appelé acidogénèse, est approfondi dans la deuxième partie de ce rapport. Le produit de fermentation le plus important pour les systèmes de déphosphatation biologique est l'acétate (FLORENTZ *et al.*, 1984; MARAIS *et al.*, 1983; MEGANCK *et al.*, 1984).

L'acétate, et peut-être d'autres molécules de faible poids moléculaire, peuvent être absorbés en conditions anaérobies par certaines bactéries **aérobies** (RENSINK *et* DONKER, 1984). L'exemple le plus fréquemment cité d'une bactérie pouvant assimiler de l'acétate en anaérobiose est *Acinetobacter* (DEINEMA *et al.*, 1984; FUHS *et* CHEN, 1975; LAWSON *et* TONHAZY, 1980). Simultanément à la disparition de l'acétate, un relargage de phosphates par la biomasse est observé. La figure 5.1 représente schématiquement l'assimilation et le métabolisme de l'acétate en trois étapes: une phosphorylation de l'acétate, la formation de l'acétyl-coenzyme A et la synthèse du poly-hydroxybutyrate (pHB).

Quant à la phosphorylation de l'acétate, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. L'énergie pour le transport et l'assimilation de l'acétate pourrait être apportée par les polyphosphates emmagasinés dans la cellule bactérienne (§ 1.8) ou par une réserve d'ATP .

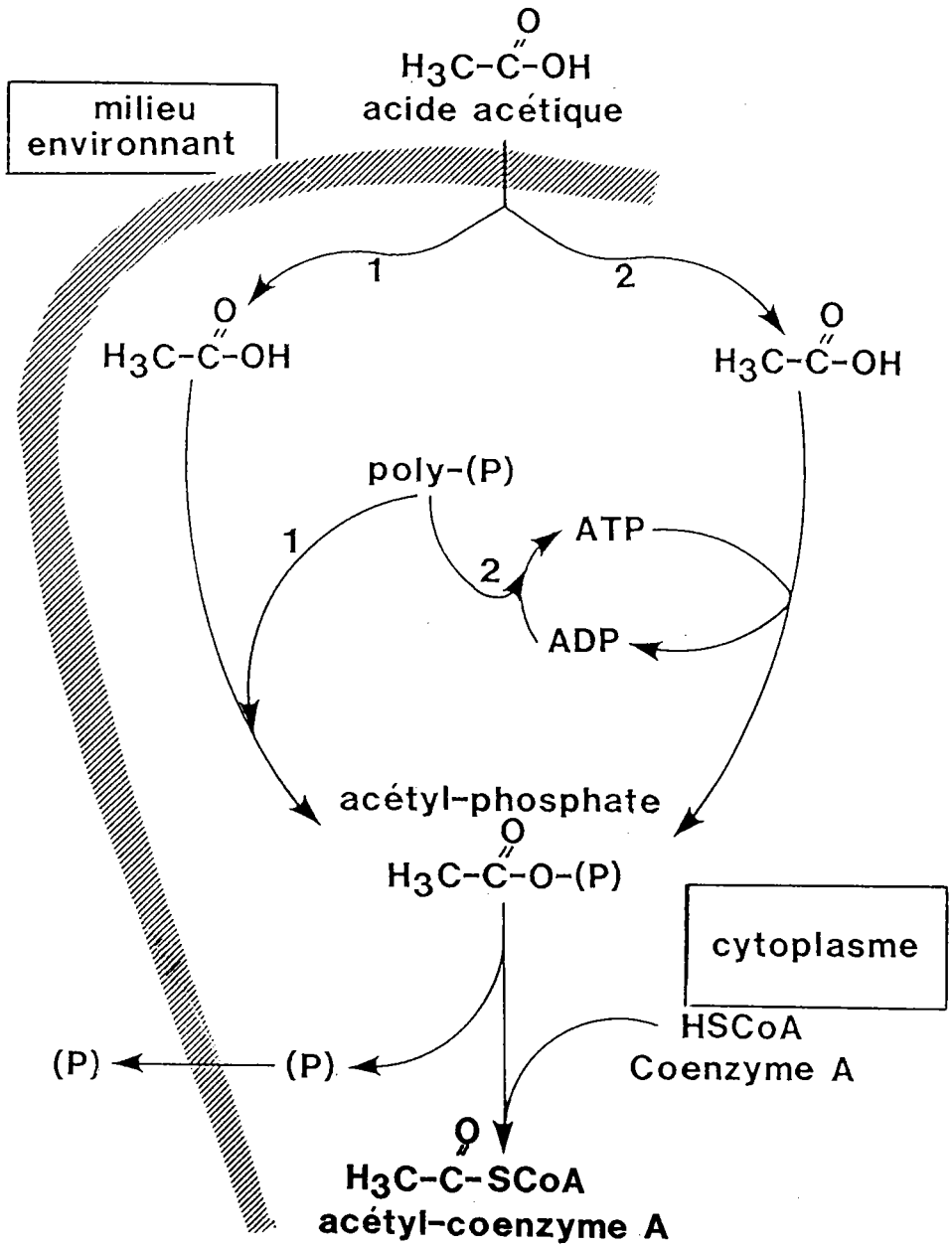


Fig. 5.1. Voies hypothétiques por l'absorption de l'acétate en anaérobiose avec formation de l'acétyl-CoA et hydrolyse des polyphosphates :
1. phosphorylation de l'acétate directement par les polyphosohates;
2. phosphorylation de l'acétate par les polyphosphates, via l'ATP.

D'une part, l'acétate pourrait être phosphorylé dès son passage à travers la membrane par une molécule membranaire (par ex. phosphatidyl glycerol), à son tour phosphorylée par le poly-P. D'autre part, les polyphosphates pourraient phosphoryler l'acétate par analogie avec la phosphorylation de l'acétate par l'ATP (ROSE,1959) ou par le pyrophosphate (CRUDEN *et al.*, 1983):

$$\text{Poly-(P)}_n + CH_3COOH \longrightarrow \text{Poly-(P)}_{n-1} + CH_3COO\text{-(P)}$$

- Certaines bactéries, comme *Acinetobacter*, possèdent l'enzyme acétate-kinase (TAYLOR *et* JUNI,1961; JUNI, 1978), mais son activité avec le poly-P comme donneur d'un groupement de phosphate n'est pas connue.

- Dans l'hypothèse où un transfert direct d'un groupement phosphate des polyphosphates vers l'acétate serait impossible, les polyphosphates pourraient phosphoryler l'ADP par la réaction inverse de la polyphosphate-kinase (HAROLD *et* HAROLD, 1964; KORNBERG *et al.*, 1957; KULAEV *et* VAGABOV, 1983). L'ATP pourrait alors phosphoryler l'acétate:

$$\text{Poly-(P)}_n + ADP \longrightarrow \text{Poly-(P)}_{n-1} + ATP$$
$$ATP + CH_3COOH \longrightarrow ADP + CH_3COO\text{-(P)} + P_i$$

Le pyrophosphospate (PP_i) est facilement hydrolysé pour donner deux orthophosphates.

L'acétyl-phosphate formé serait transformé en acétyl-coenzyme A par l'enzyme phosphotransacétylase (LÖTTER,1984), en conservant au moins partiellement l'énergie de la liaison -P, et en libérant un phoshate inorganique dans le cytoplasme:

$$CH_3COO\text{-(P)} + CoA \longrightarrow CH_3CO\text{-}SCoA + (P)_i$$

Dans ces conditions, la concentration en phosphates peut devenir plus élévée dans le cytoplasme que dans le milieu, et les phosphates tendent à sortir de la cellule par diffusion d'un gradient de concentration (NICHOLLS, 1979; S 1.2).

- Dans l'hypothèse d'une phosphorylation de l'acétate directement par le poly-P ou via l'ATP, un groupement phosphate est relargué pour chaque molécule d'acétate absorbé, en accord avec les observations de COMEAU *et al.*(1985); EKAMA *et al.*(1984); FUKASE *et al.* (1982) et MEGANCK (comm. pers.).
- Dans l'hypothèse où l'acétate est directement complexé par le coenzyme A (selon MARAIS *et al.*, 1983) deux orthophosphates sont relargués, en accord avec certaines observations de WENTZEL *et al.* (1984) et DEVRIES *et al.* (1985).

Dans tous les cas, des cations métalliques sont transportés en parallèle avec les phosphates; ainsi les charges électriques sont neutralisées (§ 1.6).

L'acétyl-CoA, une molécule-clé dans le métabolisme, peut être utilisé pour la synthèse du poly-hydroxybutyrate (pHB) (FUHS *et* CHEN, 1975; COMEAU *et al.*, 1985). La synthèse du pHB est une "voie secondaire". Elle ne donne pas directement lieu à la production d'ATP ou à d'autre formes d'énergie, mais elle évite le blocage de certaines "voies principales" causé par l'épuisement du NAD^+. Le pHB joue alors le rôle d'accepteur d'électrons. En effet, le pHB est un produit de stockage de carbone à l'état réduit. Son influence sur la pression osmotique et sur l'équilibre des réactions est minimale. Par l'estérification des monomères, les groupements carboxyles sont neutralisés, et l'influence sur le pH intracellulaire est également minimale (§ 1.7). La voie de synthèse du pHB est schématisée dans la figure 1.6. Les phénomènes de relargage de phosphore et d'accumulation de pHB sont limités par la quantité d'acétate disponible dans le milieu, ou, dans l'hypothèse où les polyphosphates constituent une source de phosphates "activés", par la quantité de polyphosphates disponibles dans la cellule. Dans le cas d'une station d'épuration d'eaux résiduaires la limitation en substrat (acétate ou autre) semble la plus fréquente.

Par un mécanisme non élucidé, l'enzyme polyphosphate-kinase est induite lors du séjour en anaérobie (§ 4.3). Or, les faibles concentrations en ATP (POTGIETER *et* EVANS,1983) sont défavorables à la réaction de synthèse des polyphosphates:

$$\text{ATP} + \text{poly-(P)}_n \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{poly-(P)}_{n+1}.$$

Une dégradation, via la voie catalysée par l'acétate-kinase, par la réaction inverse de la polyphosphate-kinase ou par une autre voie, prédomine.

Dans des conditions où les bactéries effectuent un **métabolisme respiratoire** (où l'oxygène est l'accepteur final des électrons libérés par l'oxydation des molécules organiques), une grande partie des molécules organiques contenues dans l'eau résiduaire peut être dégradée et utilisée pour la synthèse de constituants cellulaires ou pour la production d'énergie. Les réserves de poly-hydroxybutyrate peuvent être oxydées jusqu'à l'acétyl-CoA. La voie de la dégradation du pHB est représentée schématiquement dans la figure 1.6. L'acétyl-CoA produit peut être utilisé dans un éventail de voies métaboliques. Une de ces voies est le cycle de KREBS, pour la génération d'énergie.

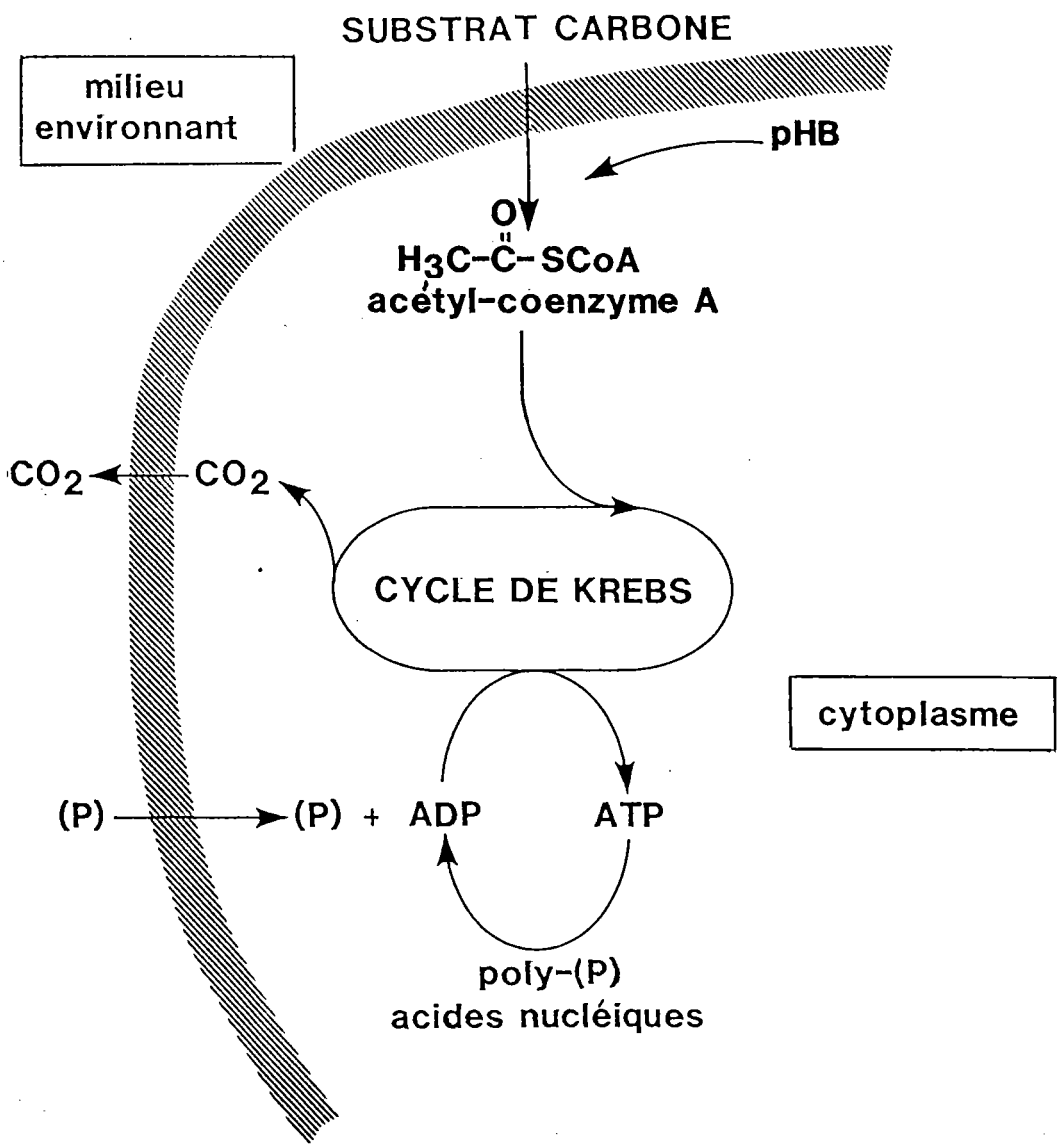


Fig. 5.2. Schéma du métabolisme des bactéries poly-P en aérobie, avec la dégradation du poly-hydroxybutyrate et synthèse de polyphosphates.

L'énergie produite lors de l'oxydation des substrats endo- et exogènes sera partiellement disponible pour la synthèse des polyphosphates; le transport des phosphates (FRIEDBERG, 1977; HAROLD *et* SPITZ, 1975; MEDVECZKY *et* ROSENBERG, 1971) et la polymérisation par l'action de la polyphosphate-kinase ou d'autres enzymes (HAROLD, 1966; KULAEV *et* VAGABOV, 1983) sont énergie-dépendants. La quantité de polyphosphates synthétisés et accumulés peut dépendre de divers facteurs: l'activité de la polyphosphate-kinase, la quantité de phosphore disponible, ou la quantité d'énergie disponible. La polyphosphate-kinase est en compétition pour son substrat l' ATP avec toutes les autres utilisations de l'ATP; le transport actif pour compenser les pertes chimiques et électriques qui dégradent les gradients à travers la membrane cellulaire, la synthèse des divers constituants de la cellule, et particulièrement pour la synthèse des acides nucléiques (HAROLD, 1966).

Il est difficile d'estimer de la quantité de phosphore pouvant être absorbé avec l'énergie générée à partir du stock de pHB. Le nombre d'interférences est trop important à cause de la place centrale qu'occupe l'acétyl-CoA dans le métabolisme. Un des points faible du modèle est qu'il ne peut pas prédire dans quelles conditions l'énergie générée à partir des substrats endo- ou exogènes est réellement utilisée pour la synthèse de polyphosphates. Cette lacune n'est pas propre au modèle: la littérature sur les phénomènes de relargage en anaérobiose est nettement plus riche que celle portant sur l'absorption aérobie du phosphore. A notre connaissance, l'importance des substrats carbonés exogènes dans la zone aérée n'a pas encore été évaluée.

L'importance des voies de synthèse des polyphosphates autre que celle catalysée par la polyphosphate-kinase semble limitée (KULAEV *et* VAGABOV, 1983). Dans les organismes où les voies catalysées par la polyphosphate-kinase et par la diphosphoglycérate-polyphosphate-phosphotransférase sont présentes, l'activité de la polyphosphate-kinase est nettement supérieure (KULAEV *et al.*, 1971).

La synthèse des polyphosphates et d'acides nucléiques épuise les réserves intracellulaires d'orthophosphates; par conséquent, une absorption importante de phosphates du milieu a lieu. Cette absorption peut être observée en absence d'oxygène moléculaire, à condition que les bactéries puissent utiliser l'oxygène des nitrates comme accepteur final d'électrons dans leur métabolisme respiratoire (dénitrification)(MALNOU *et al.*, 1983).

Les résultats expérimentaux présentés dans le § 4 seront discutés dans l'optique de notre connaissance du métabolisme du phosphore, résumée par le modèle.

5.3. L'ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATEKINASE MESUREE DANS LES EXTRAITS DE BOUES.

Les essais rapportés dans les § 4.4 et 4.5 semblent constituer les premiers dosages de la polyphosphate-kinase à avoir été effectués sur des échantillons de boues.

L'activité polyphosphate-kinasique mesurée dans les boues est très faible et reste toujours inférieure à l'activité mesurée chez *Acinetobacter calcoaceticus* Cette faible activité tend à montrer que seule une faible fraction de la biomasse présente une activité polyphosphate-kinasique. Le seul échantillon de boue dont tous les sous-échantillons montrent une activité polyphosphate-kinasique est , étonnamment, une boue non adaptée à l'élimination biologique du phosphore, provenant de la station d'épuration de Metz. Plusieurs explications peuvent être avancées, mais elles restent à prouver. D'une part, il faut remarquer que la concentration de la boue de Metz lors de la sonification était égale à 3 fois supérieure à la concentration des échantillons de boue provenant des pilotes de déphosphatation. D'autre part, les échantillons de boue provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux au Pecq ont subi une plus longue période de conservation et de transport que les boues provenant de la station d'épuration de Metz. Les échantillons provenant du Pecq ont été transporté dans une boîte isolée mais non réfrigérée.

Suite aux premiers échecs des essais de dosage de la polyphosphate-kinase dans les boues provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux au Pecq (§4.4), des expériences ont été effectuées avec le double but de déterminer la cause de l'absence d'activité chez les boues et de définir éventuellement une remède.

Premièrement, des essais ont été conduits avec des boues diluées avant la sonification; la matière sèche des boues étant beaucoup plus importante que celle des cultures pures, l'extraction pourrait être inefficace. L'essai conduit ultérieurement avec la boue de Metz semble contredire cette hypothèse; en effet, le poids sec de la boue de Metz était aussi important que le poids sec des boues provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire

de la Lyonnaise des Eaux.

Deuxièmement, il a été constaté qu'une variation de la concentration initiale en ATP n'améliorait pas la réponse lors du dosage de la polyphosphate-kinase.

Un essai d'élimination d'inhibiteurs éventuels a été réalisé ("lavage" des boues). Une quantité importante de sucres et de protéines a été éliminée, mais les essais réalisés avec des "étalons internes" indiquent plutôt une diminution de l'activité polyphosphate-kinasique par rapport au témoin et même par rapport à une boue non traitée.

L'addition d'un substrat compétitif (histone) pour pallier l'action des hydrolases n'a donné aucun effet mesurable.

La recherche sur les boues provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux n'a pas été poursuivi. En revanche, une expérience plus fructueuse a été effectuée avec une boue activée classique, provenant de la station d'épuration de Metz.

L'activité polyphosphate-kinasique de la boue provenant de la station d'épuration de Metz suggère qu'une boue classique a la potentialité d'accumuler du phosphore. Des observations faites lors de l'ensemencement des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux au Pecq avec des boues classiques confirment l'existence de cette potentialité: les boues "classiques" commencent à relarguer et à réabsorber du phosphore dans un délai de deux jours (MALNOU, comm. pers.), même si l'âge des boues est de 15 jours. Vu l'âge des boues, un renouvellement de la flore ne peut avoir eu lieu au bout de deux jours. Il faut toutefois noter que l'activité polyphosphate-kinasique ne variait pas significativement au cours des essais comportant des phases aérobies et anaérobies. La faible concentration en phosphore soluble dans le milieu (0,7 $mg.l^{-1}$) suggère que la polyphosphate-kinase a pu être induite par une carence en phosphore.

Il aurait été intéressant d'établir une correlation entre l'activité polyphosphate-kinasique des boues et leur pouvoir d'accumulation de phosphore. Cette correlation n'a pu être établi d'une part à cause de l'échec avec les boues provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux au Pecq.

5.4. L'ACTIVITE DE LA POLYPHOSPHATE-KINASE MESUREE CHEZ DES SOUCHES PURES.

Les résultats obtenus lors des essais avec des souches pures (§ 4.1 et 4.3), permettent d'apporter certains éléments de réponse aux questions suivantes: quels organismes sont responsables de l'accumulation biologique du phosphore dans les boues; et quel est le mécanisme en jeu ?

Le pouvoir d'accumulation de phosphore par les membres du groupe *Acinetobacter* est généralement reconnu. Cependant, au moins deux opinions existent quant au rôle des autres groupes taxonomiques dans l'élimination biologique du phosphore. Pour certains, le rôle de suraccumulation de phosphore dans la boue doit être attribué au seul groupe *Acinetobacter* (BUCHAN 1983; CLOETE *et al.*, 1984; DEINEMA *et al.*, 1980; FUHS *et* CHEN, 1975; LAWSON *et* TONHAZY 1980; RENSINK *et al.*, 1984). Pour d'autres, différents organismes sont également impliqués dans le processus (BRODISH,1985; BRODISH *et* JOYNER, 1983; GERBER *et* ALLEN, 1984; LÖTTER, 1984; MEGANCK *et al.*, 1984).

Une partie de nos résultats rapportés dans le § 4.3 confirment des hypothèses issues des essais réalisés à l'aide de techniques différentes. En outre, la cohérence des données obtenues à l'aide du dosage de la polyphosphate-kinase et de techniques différentes confirment la validité scientifique de la technique du dosage. Ainsi, une activité de la polyphosphate- kinase a été détectée chez *Acinetobacter calcoaceticus* ; la même souche accumule des quantités importantes de phosphore dans des conditions d'alternance aérobiose/anaérobiose; 5,3 % de phosphore par rapport au poids sec (essais en fermenteur réalisés par MEGANCK; comm pers.). Par contre, chez *Aeromonas hydrophila*, aucune activité n'a pu être détectée dans des conditions d'alternance anaérobiose/aérobiose; dans les mêmes conditions, cette souche n'accumule pas de phosphore en excès par rapport à ses besoins métaboliques immédiats; 1,7 % de P par rapport au poids sec (MEGANCK, *op. cit.*). Il faut cependant noter que BRODISCH *et* JOYNER (1983) rapportent la présence chez *Aeromonas punctata* de granules identifiés à l'aide d'une coloration comme des polyphosphates. Bien que *Pseudomonas vesicularis* accumule du phosphore (3,3 % de P par rapport au poids sec; MEGANCK, *op. cit.*) son activité polyphosphate-kinasique n'était pas mesurable à l'aide de notre système de dosage.

Quant au mécanismes d'accumulation intracellulaire de phosphore mis en jeu, HAROLD (1966) en distingue deux (§ 1.5): une accumulation de polyphosphates lors d'une carence en

azote ou soufre, appelée "luxury uptake" ou "assimilation excédentaire", et une accumulation de polyphosphate après une période de carence en phosphate, appelée "overplus compensation" ou "surcompensation de la carence en phosphore" HAROLD (1966) ne mentionne pas d'alternance aérobiose/anaérobiose, comme nous la connaissons dans le traitement des eaux résiduaires.

NICHOLLS *et* OSBORN (1979) ont étendu les notions de "luxury uptake" et de "overplus compensation" à l'accumulation de phosphore survenant après un "stress" anaérobie. Jusqu'ici, aucune expérience ne confirmait cette théorie au niveau enzymatique.

Le processus d'accumulation de phosphore dans les boues suite à un passage en conditions anaérobies pourrait être appelé "overplus compensation". L'utilisation de ce terme peut être motivée par l'analogie des effets de carence en oxygène avec les effets d'une carence en phosphates (induction de la polyphosphate-kinase, suraccumulation dès que l'élément manquant redevient disponible). Cependant, il n'est pas certain que l'induction de la polyphosphate-kinase obtenue par une carence en phosphore soit reproduite dans les conditions d'une alternance anaérobiose/aérobiose d'une station d'épuration. Car la polyphosphate-kinase est induite chez un très grand nombre de souches lors d'une carence en phosphates : *Klebsiella* (GERSBERG *et* ALLEN,1984); *Pseudomonas, Bacillus* (SURESH *et al.*, 1984); *Enterobacter* (HAROLD, 1964); *Escherichia coli* (KORNBERG, 1957) etc... Parmi ces organismes , certains sont aérobies-anaérobies facultatifs (*Klebsiella, Enterobacter, E. coli*). Or, si le modèle présenté dans les § 1.8 et 5.2, est correct, seules les souches **aérobies** doivent participer au processus de relargage et de réabsorption du phosphore, caractéristique au fonctionnement d'une station en élimination biologique du phosphore. En effet, les organismes aérobies-anaérobies facultatifs effectuent un métabolisme fermentatif en anaérobiose, avec **formation d'acétate** à partir de l'acétyl-CoA. Or le modèle prévoit une **absorption d'acétate** avec formation d'acétylphosphate puis d'acétyl-CoA par les organismes actifs dans la déphosphatation biologique (organismes poly-P). La démonstration de l'induction de la polyphosphate-kinase par anaérobiose chez des organismes aérobies-anaérobies facultatifs, en présence d'un substrat fermentescible, serait suffisante pour invalider le modèle. L'accumulation de quantités importantes de phosphore par une culture d'une souche aérobie-anaérobie facultative dans des conditions d'une alternance aérobiose/anaérobiose, en présence d'un substrat fermentible, serait une sérieuse indication de l'invalidité du modèle. Evidemment, si le modèle prédit que **seuls** les organismes aérobies participent au processus de relargage

et absorption du phosphore au cours du traitement anaérobie-aérobie, il n'implique pas que **tous** les organismes aérobies possèdent l'équipement nécessaire à l'accumulation des polyphosphates. De même, le modèle n'est pas incompatible avec l'accumulation de polyphosphates par des organismes aérobies-anaérobies facultatifs par l'action d'autres mécanismes qu'une anaérobiose (par exemple par une carence en phosphore ou un autre élément essentiel).

A notre connaissance, un terme pour décrire spécifiquement l'accumulation de polyphosphates survenant après une anaérobiose n'a pas encore été proposé.

Une des questions fondamentales quant à la régulation de la polyphosphatekinase est la suivante: "est-ce que l'induction de l'activité de la polyphosphatekinase est regulée par la concentration en phosphore dans le milieu ou par un équilibre ATP/ADP/P intracellulaire?" (MARAIS *et al.*, 1983). Jusqu'ici, l'induction de la polyphosphatekinase a été mise en évidence uniquement lors de conditions d'une carence en phosphore (HAROLD,1966). Lors d'une carence en un autre élément (N,S), une induction enzymatique n'a pas lieu, bien qu'il y ait une accumulation de polyphosphates (HAROLD, 1966). Lors des essais en fermenteur, rapportés dans le § 4.3, une induction de la polyphosphatekinase a été observée. Lors des mêmes expériences, il n'y avait pas de variations significatives de la concentration en phosphore dans le milieu. Dans nos essais, la régulation de la polyphosphatekinase était donc indépendante de la concentration en phosphore dans le milieu extracellulaire. Cependant, l'hypothèse d'une régulation par l'équilibre ATP/ADP/P intracellulaire (COMEAU *et al.*, 1985; MARAIS *et al.*,1983) n'est pas encore prouvée.

5.5. CONCLUSIONS.

Une méthode de dosage de l'activité polyphosphate-kinasique a été mise au point pour *Acinetobacter calcoaceticus*. Cette même méthode a été appliqué esur différentes souches pures et sur des boues activées. Le dosage de la polyphospate-kinase a permis de formuler, dans nos conditions expérimentales, les conclusions suivantes :

- un certain nombre de souches, parmi lesquelles *Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus"* et *Pseudomonas fluorescens* présentent une activité polyphosphate-kinasique constitutive, variant entre 0,35 et 4,7 nmoles de phosphate transférées par mg de protéines et par minute;

- une carence en orthophosphates induit la polyphosphate-kinase chez *Acinetobacter calcoaceticus* Cette observation concorde avec le phénomène d' "overplus compensation" décrit par HAROLD (1964) chez *Enterobacter aerogenes*;

- la polyphosphate-kinase est inductible par anaérobiose chez *Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter calcoaceticus "phosphadevorus"* et *Pseudomonas fluorescens*. Elle n'est pas inductible chez *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas vesicularis*. Ces résultats suggèrent que les souches ne sont pas toutes capables de participer au processus de l'élimination du phosphore, et qu' *Acinetobacter calcoaceticus* n'est pas l'unique organisme responsable de la déphosphatation;

- l'activité polyphosphate-kinasique mesurée dans les boues activées est toujours faible (< 0,1 nmole P .min^{-1}.mg^{-1}. prot.). La raison définitive pour le manque d'activité des boues provenant des pilotes de déphosphatation du Laboratoire de la Lyonnaise des Eaux n'a pu être déterminée. Divers traitements ont été appliqués pour lever une inhibition éventuelle; un "lavage", une dilution avant l'extraction, une protection contre les hydrolases par ajout d'un substrat compétitif... Aucun traitement ne s'est avéré efficace. Une préparation des extraits et un dosage sur place pourrait éliminer le risque d'une déterioration des échantillons lors du transport;

- un échantillon d'une boue activée classique, pris à la station d'épuration de Metz, présente une activité faible mais mesurable (0,02 à 0,09 nmole P.min^{-1}.mg^{-1}. prot.). Ce résultat montre que certains organismes d'une boue classique possèdent l'équipement nécessaire pour participer à l'élimination biologique du phospore.

La méthode de dosage développée est un outil de recherche. Elle est trop coûteuse et onéreuse pour des appliquations de routine.

La raison pour laquelle une boue activée classique montrait une activité polyphosphate-kinasique et une boue "déphosphatante" n'en montrait pas mériterait une examination plus approfondie.

L'ensemble des données puisées dans la littérature et obtenues lors des expériences, incitent à rejeter les termes "overplus compensation" (surcompensation de la carence en phosphore)

ou "luxury uptake" (assimilation excédentaire) pour le phénomène d'accumulation de phosphore survenant après une anaérobiose. Le terme "surcompensation du phosphore relargué en anaérobiose" peut décrire ce phénomène.