

50376
1975
156

n° d'ordre : 563

50376
1975
156

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

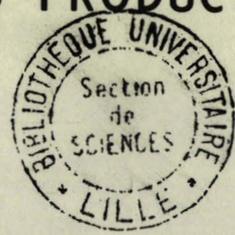
EN BIOLOGIE CELLULAIRE

Option Microbiologie

par

Alain DESCHAMPS

OBTENTION, SELECTION ET PARTICULARITES
PHYSIOLOGIQUES DE SOUCHES MUTANTES
D'ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES D'AMINO ACIDE.



Soutenu le 21 Novembre 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN



MM.	J.B. GUILLAUME	Président
	J.M. LEBEAULT	Rapporteur
	J. KREMBEL	} Examineurs
	C. GRUNEWALD	

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Technologie de l'Institut Pasteur de Lille (Unité au CERTIA) sous la direction de Monsieur le Professeur J. Guillaume, Professeur de Microbiologie à l'Université de Lille I, qui m'a accueilli dans son laboratoire et dont les conseils judicieux m'ont beaucoup aidé et m'ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il trouve ici également mes remerciements pour m'avoir fait l'honneur de présider mon Jury.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Monsieur J.M. Lebeault, maître de conférences à l'Université de Technologie de Compiègne, pour avoir accepté de venir à Lille et être le rapporteur de ce travail, mais aussi pour m'avoir choisi afin d'être son plus proche collaborateur dans son Laboratoire de Fermentations de la nouvelle Université de Compiègne.

Je remercie également Monsieur J. Kremlé, maître de conférences à l'Université de Lille I qui a bien voulu accepter de juger ce travail et participer à mon Jury.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Monsieur Grunwald directeur de la société Rapidase, à Seclin, qui a bien voulu accepter de venir participer au Jury de cette thèse, en y apportant ses compétences et son expérience des aspects industriels et appliqués de la microbiologie.

Je tiens également à remercier ,pour son étroite collaboration tout au long de cette étude, Monsieur B.Plichon, responsable du Laboratoire de Technologie de l'Institut Pasteur.

Ses encouragements et sa ténacité m' ont permis de mener à bien cette recherche parfois bien ingrate et où la persévérance était nécessaire et s'est montré fructueuse.

Je tiens aussi à remercier pour leur collaboration technique à divers moments de cette étude, Messieurs A.Decq , E. Dewailly et C. Noël ainsi que Mme J.Lefèvre, et pour sa contribution à la présentation graphique de cette thèse, Mlle I.Vivier.

Monsieur J.C.Patte, maître de conférences à l'Université de Paris XI et collaborateur de Monsieur G.N.Cohen (Institut Pasteur de Paris) m'a utilement conseillé pour les mesures d'activité et les dosages d'aspartokinase.Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Le personnel et les stagiaires du laboratoire de Technologie de l'Institut Pasteur de Lille trouveront ici la marque de ma gratitude pour la sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée de même que tous ceux qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

P L A N

Introduction et revue bibliographique

1. Matériel et techniques :

1.1. Techniques microbiologiques :

1.1.1. Techniques de mutagenèse :

- A) Mutagenèse par la NTG
- B) Mutagenèse par la 2- Aminopurine
- C) Mutagenèse par les rayons ultra-violets

1.1.2. Techniques de sélection et d'identification :

- A) Nomenclature des souches mutantes obtenues
- B) Sélection de souches auxotrophes
 - 1. Méthode des répliques
 - 2. Sélection par la pénicilline
 - 3. Recherche d'exigence(s) chez les souches auxotrophes
- C) Sélection de souches productrices de lysine
- D) Mise en évidence de la lysine-décarboxylase
 - 1. Méthode de Taylor
 - 2. Méthode de Taylor modifiée
 - 3. Méthode de Richard

1.1.3. Etude de la productivité des souches :

- A) Milieu synthétique MSB₁
- B) Essais préliminaires en fiole erlenmeyer
- C) Etudes en fermenteurs de laboratoire

1.1.4. Techniques diverses :

- A) Mesure d'un poids sec de cellules
- B) Lyse des cellules par le lysozyme
- C) Milieux de culture

1.2. Techniques d'étude de la perméabilité cellulaire :

- 1.2.1. Matériel et produits radioactifs
- 1.2.2. Perméabilité des cellules aux amino-acides
- 1.2.3. Incorporation d'acide radioactif

1.3. Techniques de dosage et de chromatographie

- 1.3.1. Lactose et oses totaux
- 1.3.2. Ions NH_4^+
- 1.3.3. Phosphates inorganiques
- 1.3.4. Lysine
- 1.3.5. Methionine
- 1.3.6. Test cadavérine
- 1.3.7. Aspartokinase
- 1.3.8. Chromatographie d'acides aminés sur papier
- 1.3.9. Chromato-électrophorèse bidimensionnelle sur papier
- 1.3.10. Chromatographie sur couche mince

2. Choix de la souche : étude physiologique comparée entre *S. marcescens* et *E. coli* :

2.1. Choix des souches :

- 2.1.1. Caractères recherchés
- 2.1.2. Vérification et caractères des souches utilisées :
 - A) Souches utilisées pour notre étude
 - B) Souches de référence

C) Propriétés de la souche de *S. marcescens* (LT₁)

2.2. Etude de la croissance en présence d'inhibiteurs :

2.2.1. Généralités et présentation du travail

2.2.2. Inhibition de la croissance par l'AEC :

- A) Protocole expérimental
- B) Etude sur *E. coli* K 10
- C) Etude sur *S. marcescens*

2.2.3. Inhibition de la croissance par la L- canavanine

2.2.4. Inhibition de la croissance par la L- lysine :

- A) Etude sur *E. coli* K 10
- B) Etude sur *S. marcescens*

2.3. Etude de la perméabilité cellulaire :

2.3.1. Généralités

2.3.2. Présentation de l'étude effectuée

2.3.3. Perméabilité à la L- lysine

2.3.4. Perméabilité à la L- arginine

2.3.5. Perméabilité à l'acide L- aspartique

2.3.6. Vérification de la voie de biosynthèse de la lysine chez
S. marcescens

2.4. Etude du système de transport de la lysine et de l'arginine chez
S. marcescens :

2.4.1. Généralités

2.4.2. Recherche d'une interaction entre l'AEC et la thréonine

2.4.3. Recherche d'une compétition entre la lysine et l'AEC :

- A) Etude sur *E. coli* K 10
- B) Etude sur *S. marcescens*

2.4.4. Inhibition de la croissance par la canavanine en présence de lysine

2.4.5. Interférences avec l'arginine

Conclusion :

2.5. Comparaison entre *S. marcescens* et des souches mutantes d'*E. coli* résistantes à l'AEC :

2.5.1. Perméabilité à l'arginine

2.5.2. Inhibition de l'activité aspartokinase

Conclusion :

3. Production de lysine par *E. coli* K 10 :

3.1. Conditions optimales de mutagenèse :

3.1.1. Mutagenèse par la NTG

3.1.2. Mutagenèse par la 2AP

3.1.3. Mutagenèse par les rayons ultra-violet

3.2. Obtention et sélection de souches indicatrices :

3.2.1. Obtention de la souche TL 812

3.2.2. Obtention de la souche L 101 :

A) Mutagenèse par la NTG

B) Mutagenèse par la 2 AP

3.3. Obtention de souches productrices de lysine :

3.3.1. Méthodes de travail

3.3.2. Relations phylogénétiques entre les souches

3.4. Souches productrices de lysine de type TA :

3.4.1. Première série de souches (TA 1-360) :

A) Obtention et sélection

B) Productivité en fiole erlenmeyer

3.4.2. Seconde série de souches (2 TA 1-6) :

- A) Obtention et sélection
- B) Productivité des meilleurs clones
- C) Productivité en fermenteur
- D) Paramètres de productivité de la souche 2 TA 3
- E) Problème d'amélioration des souches 2 TA

3.5. Souches productrices de type MTA

3.5.1. Obtention de souches de type MT

3.5.2. Première lignée de souches (MTA 1-8) :

- A) Obtention
- B) Productivité
- C) Etude en fermenteur

3.5.3. Deuxième lignée de souches (MTA 9-117)

- A) Obtention
- B) Productivité
 - 1. Sélection des meilleurs clones
 - 2. Productivité en milieu MSB_1 - PR
- C) Rôle de quelques paramètres sur la productivité de la souche MTA 117 :
 - 1. Rôle du chlorure d'ammonium
 - 2. Rôle des phosphates
 - 3. Rôle de la thréonine

3.5.4. Troisième lignée de souches (MTA 121-126) :

- A) Obtention (purification et mutagenèse sur la souche MTA 117)
- B) Productivité des souches :
 - 1. Sélection de nouvelles souches
 - 2. Productivité des clones issus de la purification de MTA 117/2

C) Paramètres de productivité

1. En milieu MSB₁ - PR
2. En présence de diverses concentrations de méthionine
3. En présence d'acétate d'ammonium
4. En présence d'acide aspartique
5. En présence d'homosérine
6. En conditions différentes d'aération

D) Etude en fermenteur

3.5.5. Quatrième lignée de souches (MTA 127-135) :

A) Obtention des souches

B) Productivité

1. Sélection de clones producteurs
2. Productivité de la souche MTA 127

3.5.6. Cinquième lignée de souches :

A) Obtention

B) Productivité

3.5.7. Stabilité des souches productrices :

A) Problèmes de stabilité

B) Solutions éventuelles

3.5.8 Récapitulatif.

3.6. Caractères particuliers des souches productrices de lysine :

3.6.1. Comparaison avec E. coli K 10 :

A) Galerie de tests bactériologiques :

1. Test de Mackenzie
2. Galerie de tests

B) Résistance à l'AEC et à la lysine :

3.6.2. Composition du milieu de culture et productivité en lysine :

3.6.3. Régulation des biosynthèses au niveau de l'aspartokinase

- A) Obtention de lysats bactériens
- B) Mesures d'activité aspartokinase

Conclusion

Conclusion générale.

INTRODUCTION

ET

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La pénurie constatée dans notre pays et dans le monde en amino acides nécessaires à l'alimentation du bétail, et plus particulièrement en lysine et le rejet ,chaque année par les industries alimentaires et surtout laitières de grandes quantités de lactosérum (61) nous ont fait envisager la conversion d'une partie de celui ci en lysine par des souches microbiennes à croissance rapide et susceptibles d'utiliser facilement ce lactosérum.

Les espèces bactériennes habituellement utilisées pour la production de lysine , Corynebacterium glutamicum et Brevibacterium flavum étant incapables d'utiliser le lactose comme source de carbone et ayant de plus une croissance lente, il nous fallait essayer d'autres espèces pouvant répondre aux exigences souhaitées.

Notre recherche de telles espèces s'est faite parmi les Entérobactéries, compte tenu de leur pouvoir pathogène et nous a permis de retenir et de comparer deux espèces au niveau de leur physiologie ,de choisir l'une d'entre elles et après de multiples séries de mutations successives ,de pouvoir étudier certains aspects de la régulation de la biosynthèse chez les souches productrices obtenues.

Le problème d'une pénurie en amino acides vitaux pour compléter la nourriture du bétail s'est posé vers 1950-1955. En effet l'homme et les animaux supérieurs sont incapables de synthétiser les amino acides nécessaires à la synthèse de leurs protéines et à leur croissance, et, de ce fait, doivent les trouver dans leur nourriture. Or les produits végétaux contiennent peu d'acides essentiels comme la lysine, la méthionine et même le tryptophane d'où la nécessité de compléter ces produits végétaux et de trouver des moyens artificiels de produire ces amino acides.

Les méthodes chimiques se sont révélées être trop coûteuses. Des essais ont pourtant été entrepris pour produire de la lysine à partir de caprolactame, de dihydropyrane, de cyclohexanone et de pypéridine (70). Ces techniques ne permettaient d'obtenir que de la DL-lysine avec des difficultés pour séparer la forme L de la forme D, la forme L étant la seule assimilable par les mammifères. Des microorganismes comme Aspergillus ustus ont même été utilisés dans ce but (102) mais le processus est complexe, coûteux et difficilement exploitable.

Aussi les chercheurs se sont-ils tournés vers les méthodes microbiologiques en constatant que la plupart des microorganismes produisent de petites quantités d'acide dans leur milieu de culture sous la forme L, en particulier les bactéries mais aussi les levures, les champignons et les actinomycètes.

Casida (11) et Kinoshita (42,45) furent les premiers à évoquer la possibilité d'une production de lysine par des souches sélectionnées d'Escherichia coli. Ce dernier auteur envisagea également la production d'acide glutamique par Micrococcus glutamicus (43). Cet amino acide était intéressant pour son utilisation comme additif alimentaire, en tant que correcteur de goût et il était nécessaire de le produire par d'autres moyens qu'en l'extrayant de sources naturelles (mélasses de betterave, gluten, farine de soja, etc...) devenues insuffisantes. En 1958 également, Kinoshita fit produire de la lysine à des souches auxotrophes de Micrococcus glutamicus (44). D'autres techniques particulières furent aussi mises au point sur E. coli (10,32,49) et Bacillus subtilis (41) à la même époque. Ces dates ont marqué les débuts de la production industrielle d'amino acides par voie microbiologique et depuis de nombreuses souches et de nombreux procédés ont été brevetés puis exploités. De nombreux ouvrages et articles de synthèse font la revue de ces techniques (1,68,69,70,90,108).

Pour chaque espèce bactérienne les techniques employées ont quelque peu différé et c'est sous cet angle que nous évoquerons les divers procédés de production de lysine.

Les champignons et les levures figurent parmi les premiers microorganismes testés bien que leur voie de biosynthèse de la lysine soit différente de celle des bactéries et passe par l' α -amino adipate (68,70). En particulier, en 1957, Dulaney utilisa Ustilago maydis et Geocladium sp. (27). Des travaux

plus récents ont été effectués sur *U. maydis* (95,96) mais les résultats obtenus n'étaient pas concurrentiels avec ceux des bactéries. Des souches de levures peuvent également produire de la lysine (1,70) ,en particulier Saccharomyces cerevisiae et Torulopsis utilis, jusqu'à 20 % de leur poids.

Les Actinomycètes et les Mycobactéries ont été assez peu utilisés sauf sur hydrocarbures ,comme Streptomyces coroniformis sur tetrahydronaphtalène et Mycobacterium tuberculosis sur décane ou méthane (26) mais aussi Nocardia sp. (Hse⁻) sur paraffine (1).

Les bactéries restent les microorganismes les plus utilisés pour la production de lysine . Parmi celles-ci le genre Bacillus a fait l'objet de recherches de production ,en particulier sur *B. megatherium* en ajoutant de l'acide α -aminobutyrique au milieu de culture (1) et sur *B. subtilis* à l'aide de souches mutantes exigeantes en homosérine (73).

Des mutants exigeants en homosérine d' Azotobacter sp.(1) et d'Alcaligenes marshallii capable d'utiliser la n-paraffine sont également producteurs de lysine (35).

L' espèce bactérienne la plus utilisée reste Micrococcus glutamicus encore appelé Corynebacterium glutamicum . Son utilisation remonte à 1958 (44) et 1961 (72).Plusieurs types de souches mutantes étaient alors testées,cette étude étant menée conjointement à celle concernant la production d'acide glutamique. (74) et les souches Hse⁻ ou Met⁻ et Thr⁻ étaient les meilleures productrices (20 g/l). Actuellement sur milieux industriels

utilisant la mélasse de canne à sucre le rendement peut atteindre 75 g/l au Japon ,en présence de facteurs de croissance dont la biotine et en intervenant au niveau de la perméabilité cellulaire . Le taux de production dépend des concentrations en biotine et en homosérine, et un excès de ces facteurs inhibe la synthèse de lysine et fait dévier la chaîne métabolique vers l'acide lactique (72). La biosynthèse de lysine est régulée par une inhibition concertée entre la lysine et la thréonine au niveau de l'aspartokinase (analogies avec Brevibacterium flavum) ,chaque amino acide étant faiblement inhibiteur séparément. Aucune inhibition n'a pu être décelée au niveau de la dihydrodipicolinate-synthase et l'homosérine ne réprime pas non plus la chaîne de biosynthèse à 1 mg/ml (76).

L'aspartokinase n'est pas réprimée non plus de façon significative par un excès de thréonine ou d'isoleucine. La production de lysine par une souche de Corynebacterium acetophilum exigeante en homosérine mais capable d'utiliser l'acide acétique a également été décrite (103). Des souches de Corynebacterium sp. et de C. glutamicum résistantes aux analogues de la lysine sont également productrices (21,22,38).

La production de lysine par Brevibacterium flavum est, elle, plus récente et a été mise en évidence par Sano et Shio en 1967 (97) sur des souches auxotrophes Hse^- , Thr^- , Leu^- et Ile^- . Plusieurs analogies concernant les mécanismes de régulation des voies de biosynthèse peuvent être faites avec C. glutamicum (63,106), en particulier au niveau d' une inhibition concertée sur l'aspartokinase par la lysine et la thréonine (107) alors que

séparément ,chaque amino acide à 1mM est faiblement inhibiteur et qu'ensemble à la même concentration ,l'inhibition de l'activité aspartokinase est de 90 %.

La L-aspartate-semialdéhyde-déhydrogénase est à peine inhibée par les amino acides de la chaîne de l'aspartate (107) et la dihydrodipicolinate-synthase n'est ni inhibée ni réprimée par la lysine. Des souches mutantes sensibles à la thréonine ou à la méthionine sont de bonnes productrices (98,100) par suite d'une sensibilité accrue de l'homosérine-déhydrogénase qui est déficiente envers la thréonine ou la méthionine, donc la concentration intracellulaire en ces amino acides sera très basse et toute la chaîne de biosynthèse sera déviée vers la lysine. Des souches sensibles à l'AEC (S-(2-Aminoéthyl)-L-cystéine) sont également productrices (99) avec la perte de l'inhibition concertée entre la thréonine et la lysine mais aussi entre la thréonine et l'AEC. Un procédé utilisant la décarboxylation du DAP comme chez E.coli a également été envisagée (94) .Enfin d'autres espèces produisent de la lysine notamment des mutants Hse⁻ de B.lactofermentum (1) et de B.ammoniagenes (69).

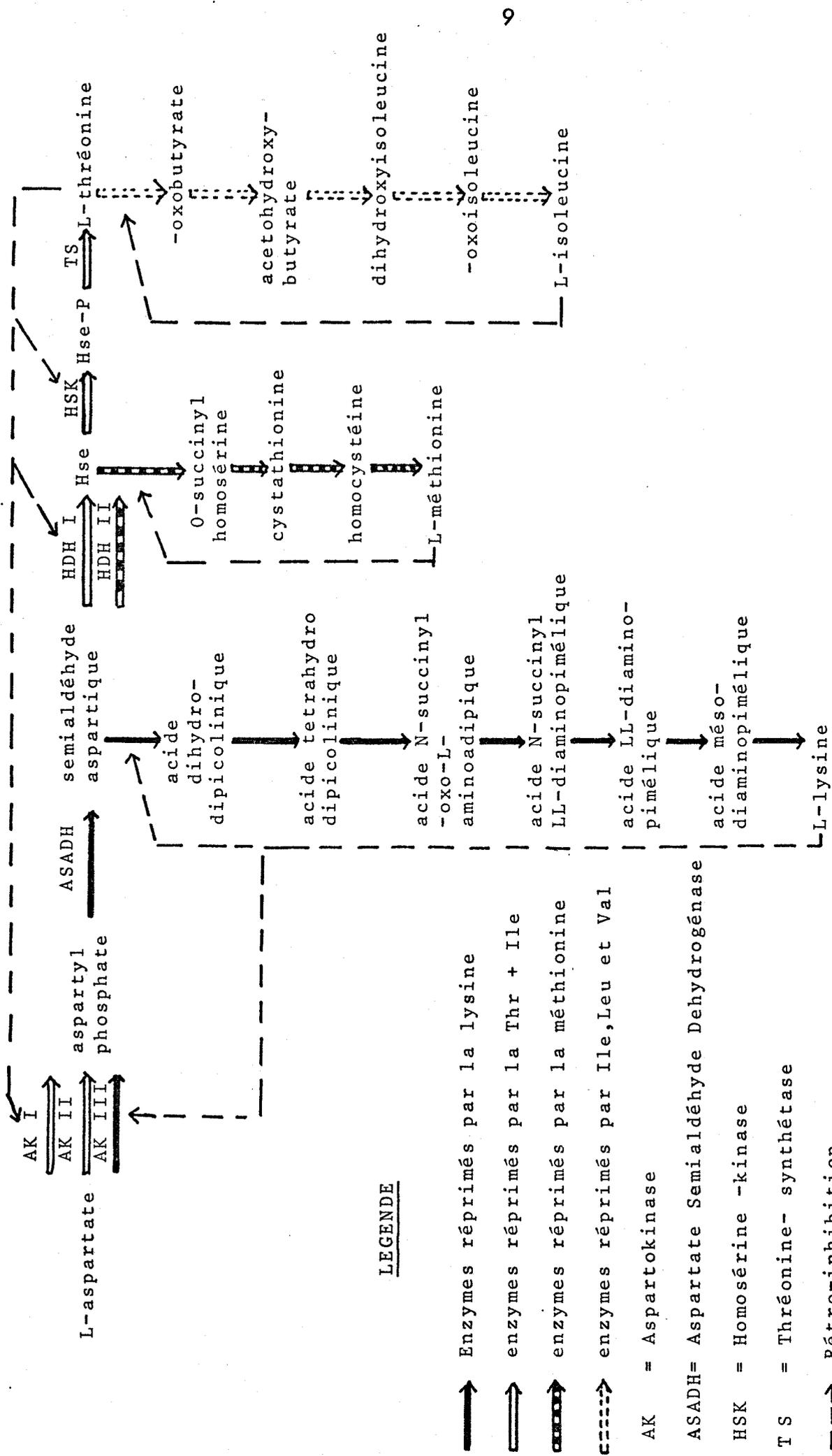
L'utilisation d'entérobactéries pour la production de lysine remonte à 1951 (11) et 1956 (10) et a consisté d'abord à produire de l'acide diaminopimélique (DAP) par des souches Lys⁻ et à convertir ce DAP en L-lysine à l'aide d'une souche d'Aerobacter aerogenes en présence de toluène (10,77).

La souche d'Aerobacter fut remplacée par une autre souche d'E.coli prototrophe (49) et parfois la conversion était même réalisée directement par des cellules réverses (prototrophes) de la

souche Lys⁻ dont on favorisait la prolifération. La production de S-DAP par une souche DAP⁻ a également été mentionnée (32). L'utilisation de mutants auxotrophes a été décrite et testée par Kinoshita, Nakayama et al. (44,75). L'utilisation d'E.coli s'est arrêtée à cette époque et les brevets concernant ces divers procédés arrivent bientôt à expiration. Un problème majeur réside dans le fait qu'E.coli possède une lysine-décarboxylase très active (72) responsable de la transformation de la lysine en cadavérine. La chaîne de biosynthèse de la lysine a été entièrement déterminée chez E.coli et se trouve soumise à une régulation complexe. En effet la première enzyme de cette chaîne, l'aspartokinase, responsable de la conversion de l'acide aspartique en aspartyl-phosphate est en fait constituée par trois isoenzymes fonctionnelles. Ces trois aspartokinases sont soumises à une régulation (répression et rétroinhibition) par les produits terminaux de la chaîne qui peut être résumée par le tableau suivant (16):

	Repression	Inhibition allostérique
Aspartokinase I	Thr + Ile	Thréonine
Aspartokinase II	Méthionine	aucune
Aspartokinase III	Lysine	Lysine

Le schéma général des mécanismes de régulation intervenant sur toute la chaîne des amino acides issus de l'acide aspartique est reproduit à la page suivante (114).



LEGENDE

- Enzymes réprimés par la lysine
- Enzymes réprimés par la Thr + Ile
- Enzymes réprimés par la méthionine
- Enzymes réprimés par Ile, Leu et Val

AK = Aspartokinase

ASADH= Aspartate Semialdéhyde Dehydrogénase

HSK = Homosérine -kinase

TS = Thréonine- synthétase

→ Rétro-inhibition



Les trois aspartokinases sont des enzymes distinctes qui peuvent être séparées et purifiées (28,51,117). Les aspartokinases I et III furent les premières à être découvertes (28,112) puis l'aspartokinase II, sensible à la méthionine, fut décrite par les mêmes auteurs (80). La lysine inhibe également la dihydrodipicolinate-synthase (127). Les remarquables travaux de l'équipe de G.N. Cohen menés depuis près de 15 ans ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces isoenzymes et leur constitution (16). En effet l'activité homosérine-déhydrogénase plus ou moins sensible à la thréonine et l'activité aspartokinase I sont portées par une même protéine (81) mais sur deux régions distinctes de ce polypeptide (119) qui serait en fait constitué de quatre sous-unités (29). L'isolement de souches mutantes dépourvues de l'une ou de plusieurs aspartokinases ou ne possédant que l'une de ces isoenzymes (79,87,114) a permis la localisation génétique de celles-ci (114) de même qu'une étude immunologique a permis d'évoquer l'hypothèse que les trois aspartokinases et l'homosérine-kinase auraient une origine commune (118). De plus la synthèse de lysine chez E.coli aurait une signification génétique par l'existence théorique d'un gène responsable de cette production (36) appelé LysX, récessif par rapport au caractère LysX⁺ (non producteur). Ce gène se situerait sur le chromosome à côté du gène ArgA vers ThyA. Mais les relations entre ce gène théorique et les mécanismes de régulation restent à définir. Il n'existe pas vraiment d'opéron lysine (118) car les divers gènes codant les étapes de biosynthèse de celle-ci sont séparés sur le chromosome et n'auraient pas la même régulation.

Enfin l'un des problèmes majeurs posés par l'emploi d'*E. coli* réside dans l'existence d'une lysine-décarboxylase (LDC) très efficace (72) et inductible par la lysine elle même (104) alors que cette dernière réprime la DAP-décarboxylase (121). La LDC peut aussi être stimulée par certains peptides ou certains mélanges d'acides aminés (9).

La production de lysine a pu aussi être envisagée chez d'autres espèces d'Entérobactéries comme *Aerobacter* *aerogenes* (à partir de DAP) et *Proteus* *vulgaris* (1) mais aussi la production de SDAP par *Serratia* *marcescens* et *Aerobacter* *aerogenes* (71). L'utilisation de *S. marcescens* peut poser des problèmes par la biosynthèse par cette espèce d'un pigment, la prodigiosine (123) mais cette biosynthèse peut être facilement contrôlée (124) et certains acides aminés ont pu être produits de manière concurrentielle avec ce microorganisme comme l'isoleucine et la valine (46,47,48).

Les milieux industriels de production de lysine (70) utilisent principalement des mélasses de canne à sucre ou de betterave, du "corn steep liquor" (103) et dans des cas particuliers des hydrocarbures ou de l'acide acétique (1), en présence de sulfate d'ammonium (ou de chlorure) et de carbonate de calcium. Pour *B. flavum* et *C. glutamicum* le pH est maintenu près de la neutralité et la température des cultures est de 30°C. Les dosages de lysine se font dans de tels milieux par des méthodes manométriques (avec la lysine-décarboxylase), automatisées (Technicon Autoanalyzer) ou encore microbiologiques.

Notre étude nous a amené à rechercher parmi les Entérobactéries une espèce intéressante et utilisable pour des améliorations génétiques, en recherchant particulièrement la production de lysine par des souches résistantes à des analogues de celle-ci et plus particulièrement à l'AEC. Cette étude nous a amené à sélectionner deux souches, E.coli K10 et S.marcescens LT₁ et à les comparer à différents niveaux de leur physiologie, et en particulier au niveau de la perméabilité cellulaire et de la régulation de la biosynthèse de lysine.

Le choix d'E.coli s'étant imposé, l'obtention de souches résistantes à l'AEC et une série d'améliorations génétiques nous ont permis d'isoler des souches productrices de lysine. Les paramètres intervenant sur la productivité des souches dans leur milieu de culture (en travaillant sur un milieu minimal) ont été déterminés et critiqués (des essais de milieux en vue d'une utilisation industrielle de ces souches ne sont pas évoqués dans le cadre de ce mémoire).

Enfin, quelques aspects intéressants de la régulation de la chaîne de biosynthèse de la lysine chez les souches obtenues ont fait l'objet d'une étude particulière au niveau de l'activité aspartokinase.

1.

MATERIEL ET TECHNIQUES

La plupart des techniques utilisées et décrites dans cette première partie, ont fait l'objet d'une mise au point particulière ou progressive au cours de cette étude. De ce fait dans les deuxième et troisième parties, les modifications éventuelles apportées au cours de certaines expériences seront alors spécifiées. Nous avons distingué trois groupes de techniques : les techniques purement microbiologiques, les techniques d'étude de la perméabilité cellulaire faisant intervenir des manipulations de produits radio-actifs, et les techniques de dosage et de chromatographie.

1.1. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.

Ces techniques concernent les méthodes de mutagenèse, de sélection de souches et d'études de leur productivité, et certaines techniques particulières.

1.1.1. TECHNIQUES DE MUTAGENESE :

A) Mutagenèse par la Nitrosoguanidine (NTG) :

La N-Méthyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine, plus couramment appelée nitrosoguanidine (abréviation : NTG) est connue en tant qu'agent mutagène particulièrement efficace.

Les premiers essais sur E. coli ont été réalisés par Adelberg en 1956 sur E. coli K 12 (2) . La technique décrite ici dérive de celle d'Adelberg et a fait l'objet d'une remise au point particulière sur la souche K 10.

Une culture d'une nuit, à D.O. = 2 environ, est diluée en milieu MSB₁ et remise en incubation jusqu'à l'obtention d'une,

D.O voisine de 1,0 ; la culture est alors en phase exponentielle de croissance. Un échantillon de 20 ml est prélevé et lavé deux fois en milieu MSB_1 sans base minérale, puis le culot est repris dans 0,5 ml de tampon à PH 5,0 et 0,1 ml de solution de NTG à 10 mg/ml (Aldrich-Europe). La solution de NTG est préparée immédiatement avant son utilisation. Le mélange est homogénéisé à la pipette et placé en bain-marie agité ou sur table d'agitation à 30° C pendant 30 minutes.

La solution tampon à PH 5,0 est obtenue en mélangeant 32,5 ml de solution d'acétate de sodium ($3H_2O$) à 0,2 M, à 14,8 ml d'acide acétique 0,2 M, et en complétant à 100 ml par de l'eau distillée.

Après les 30 minutes d'incubation la suspension est lavée deux fois en milieu MSB_1 sans base et remise en suspension dans ce même milieu. Cette suspension peut alors se conserver plusieurs semaines à 4°C et servir pour plusieurs séries de sélections.

B) Mutagènèse par la 2-Aminopurine :

L'utilisation de cet agent mutagène a été particulièrement étudiée par Margolin (59) . Notre méthode de travail s'inspire de cette étude et a fait l'objet d'une mise au point particulière. Une culture à D.O = 2, environ, en milieu MSB_1 est diluée et remise en incubation jusqu'à l'obtention d'une D.O = 0,2 à 0,5. On ajoute alors 10 mg de 2-Aminopurine (Sigma) et 0,2ml d'une solution de l'acide-amino pour lequel on recherche des mutants exigeants. Les cellules sont lavées le lendemain (soit 18 heures d'incubation environ) et remises en suspension dans du milieu MSB_1 sans base.

Ce type d'essai est plus simple à réaliser que celui utilisant la NTG et s'est révélé être plus efficace dans certains cas, en particulier pour la recherche d'exigences difficiles à obtenir avec la NTG, en particulier pour la L-lysine.

L'aspect qualitatif et quantitatif de l'action de ces agents mutagènes sera décrit dans les chapitres suivants.

C) Mutagenèse par les rayons ultra-violets :

Cette technique est très ancienne et a été très peu utilisée au cours de notre étude. Elle a fait l'objet d'une mise au point au cours de nos recherches antérieures (24, 25) et s'effectue dans une petite enceinte stérile, sous un tube germicide à rayons ultra-violet, de type "Mazda" 30 watts. Les suspensions de bactéries sont irradiées à 10 cm du tube, dans des boîtes de Pétri placées sur un plateau rotatif tournant à faible vitesse (30 tours par minute) pendant une à deux minutes. L'épaisseur du film liquide irradié n'excède pas 1 à 2 mm. Après irradiation les boîtes sont refermées et placées à l'abri de la lumière pendant une heure pour éviter les risques de photoréactivation (réparations du DNA à la lumière visible).

1.1.2. TECHNIQUES DE SELECTION ET D'IDENTIFICATION :

A) Nomenclature des souches mutantes obtenues :

Nous avons utilisé une nomenclature personnelle pour les souches mutantes obtenues, en particulier chez E. coli. Chez S. marcescens nous n'avons recherché que des exigences simples n'ayant pour abréviation que l'acide-amino correspondant et

un numéro de référence.

Chez E. coli les caractères d'auxotrophie pour certains amino-acides ont été symbolisés de la façon suivantes : L pour la L-Lysine, M pour la L-Méthionine, T pour la L-Threonine. Le caractère de résistance à L'AEC (S-(2-Aminoethyl)-L-Cysteine) a reçu l'abréviation A.

Une souche MTA est donc Met⁻ Thr⁻ AEC^R.

Un numéro de référence (ou d'identification) suit les caractères de la souche. Ainsi la souche TL 812 est Thr⁻ Lys⁻ et porte le numéro d'identification 812.

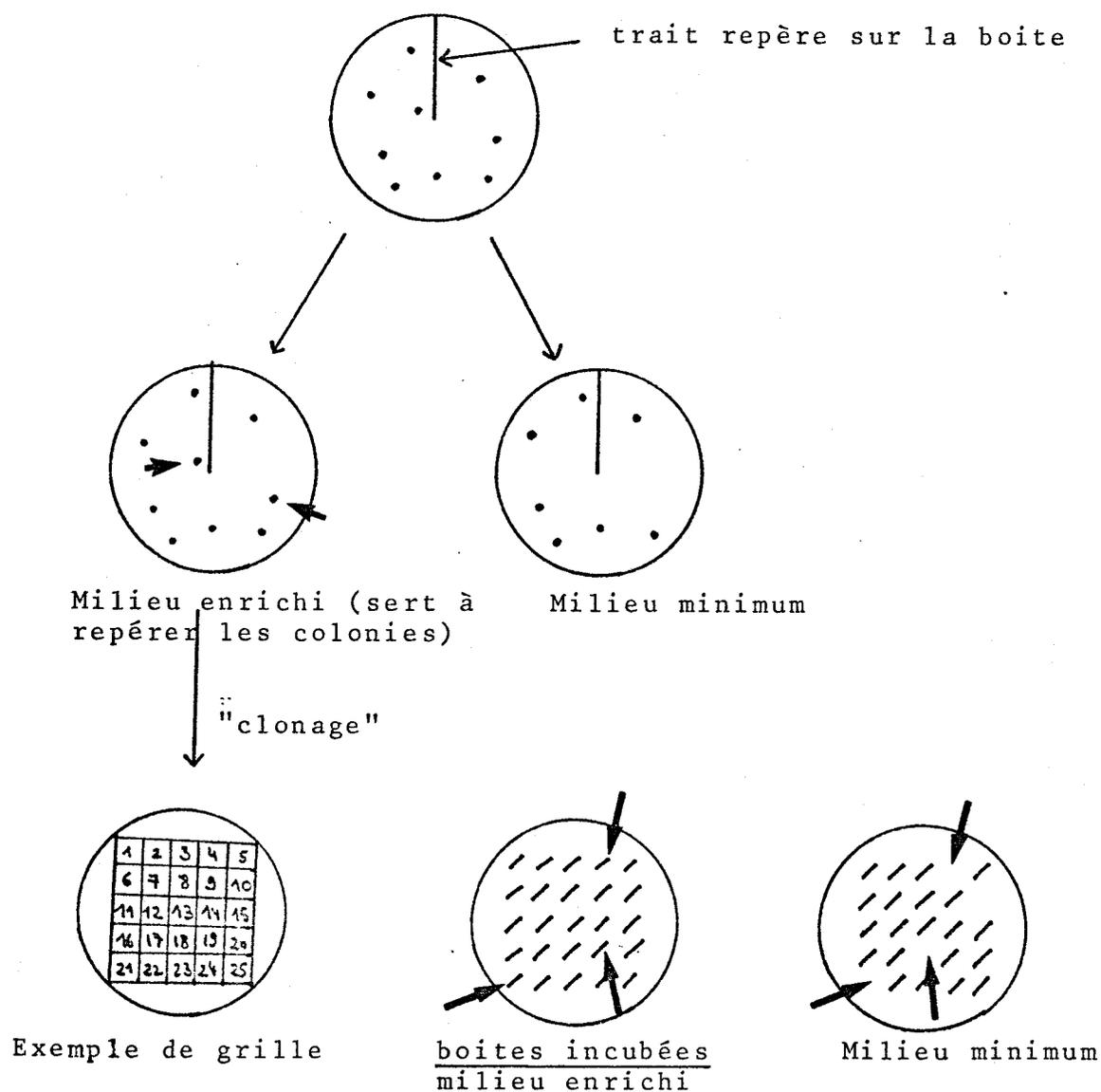
B) Sélection de souches auxotrophes :

Pour cette sélection nous avons en particulier utilisé la méthode des répliques de Lederberg (52) et des techniques d'enrichissement, en particulier par la pénicilline selon une technique dérivée de celle de Lederberg (53).

1) Méthode des répliques :

Cette méthode connue et généralisée (52) consiste à répliquer des colonies, en boîtes de Pétri sur milieu gélosé enrichi, sur des boîtes contenant des milieux dépourvus du métabolite dont on recherche l'exigence ou complétées de l'analogue structural pour lequel on recherche la résistance. Ces répliques se font à l'aide de velours stérile fixé sur un tambour cylindrique et sur lequel l'empreinte des colonies se dépose.

Les colonies ne se développant pas sur ces derniers milieux sont déficientes et sont testées à nouveau par repiquage, à l'aide d'une grille permettant de les repérer. On peut ainsi tester un grand nombre de colonies par boîtes.



Les colonies ainsi repiquées donnent naissance à des clones ou souches, individualisées dont on recherche la ou les exigences ou la résistance à un analogue.

Les clones dont le ou les caractères paraissent stables après plusieurs repiquages successifs sont alors conservées en tubes de gélose inclinée (milieu MSB₁ complété) et mises en collection après avoir reçu un numéro d'identification et l'abréviation de leurs caractères.

2) Sélection par la pénicilline :

Les mutations se faisant au hasard sous l'action des agents mutagènes, il est nécessaire de mettre en oeuvre des techniques de sélection ou d'enrichissement concernant le type de mutation recherchée.

En particulier la méthode de sélection par la pénicilline mise au point par Lederberg (53) et par Davis (23) se base sur le mode d'action de cet antibiotique qui est bactéricide seulement pour les cellules en cours de division.

Après action de l'agent mutagène il suffit de laver les cellules et parfois aussi de les épuiser en azote (en les plaçant une ou deux heures dans un milieu dépourvu de source d'azote), puis de les mettre en milieu complet (en rajoutant par exemple une source d'azote, dans le milieu d'incubation) contenant tous les facteurs de croissance (amino-acides et vitamines) sauf celui ou ceux pour lequel on recherche des mutants exigeants. Ce milieu est placé en incubation (sur table d'agitation à 30° C) en présence de pénicilline, à raison de 2000 U/ml en milieu hypertonique (saccharose à 60 %). Les cellules qui se divisent, donc les cellules non exigeantes, sont tuées et seules les cellules mutées sur le caractère recherché ne se développent pas et restent vivantes.

Après 2 à 3 heures d'incubation les cellules sont lavées trois fois et remises en suspension en milieu MSB₁ sans base. La méthode des répliques permet d'obtenir un taux plus important de colonies auxotrophes après utilisation de cette méthode de sélection.

3) Recherche d'exigence (s) chez les souches auxotrophes:

Cette recherche s'effectue après mutagenèse sur milieu MSB₁ gélosé complété par des séries d'exigences , par réplique ou par repiquage .Dans le cas où l'on recherche une seule exigence bien particulière ,cette technique n'est pas utilisée; il suffit simplement de répliquer les colonies obtenues sur milieu MSB₁ simple et de détecter les colonies exigeantes comme nous l'avons décrit précédemment.

Dans le cas d'une recherche de plusieurs types de mutants afin d'obtenir une collection de souches ou de tester l'aptitude à la mutagenèse d'une souche ,les colonies obtenues après numération sur boîtes de Pétri en milieu MSB₁ gélosé + Casamino-Acids(Bacto-Casamino-Acids Difco,Vitamin-free, qui est un hydrolysat acide de caséine contenant tous les amino acides) sont répliquées sur milieu MSB₁ complété de l'un des mélanges suivants:

Mélange A : Cystéine + Méthionine + Sérine + Glycocolle +
Arginine + Thréonine.

Mélange B : Tyrosine + Phénylalanine + Tryptophane + Lysine

Mélange C : Histidine + Leucine + Proline + Acide glutamique
+ Acide aspartique

Mélange D : Isoleucine + Valine

Des solutions à 1% sont faites pour chaque amino acide de type L (sauf la leucine) et les mélanges s'obtiennent en ajoutant des volumes égaux pour chaque amino acide . On ajoutera autant de millilitres d'un mélange que l'on aura de constituants par

flacon de 250 ml de milieu MSB₁. Ainsi l'on mettra 6 ml de mélange A ou 2 ml de mélange D, soit une concentration de 40 µg/ml pour chaque amino acide (20 µg/ml pour la leucine).

Chez *S.marcescens* nous avons doublé ces valeurs.

C. Sélection de souches productrices de lysine :

Cette technique n'a pas fait à notre connaissance l'objet d'une description détaillée mais a déjà été utilisée. Elle utilise des souches indicatrices exigeantes en l'acide aminé dont on recherche la production. Ceci a été rendu possible par l'obtention au cours de notre étude de deux souches exigeantes en lysine: la première était la souche TL 812 (Thr⁻ Lys⁻) qui a permis l'isolement des premières séries de souches productrices de type TA (Thr⁻ AEC^R); la seconde était la souche L 101 (Lys⁻) dont l'exigence était très spécifique pour la lysine, qui s'est avérée être stable et avoir une bonne croissance, comparable à celle de la souche sauvage K10.

Une culture en phase exponentielle de croissance (D.O = 1, environ) est diluée jusqu'à l'obtention d'une D.O = 0,1. Ces suspensions sont placées immédiatement à 4°C et peuvent se conserver ainsi plusieurs semaines. Il suffit d'ajouter 1 ml de suspension à 250 ml de milieu MSB₁ gélosé et complété de façon à permettre la croissance des souches auxotrophes productrices. Le milieu gélosé est préalablement maintenu à 45°C en Bain-marie avant de recevoir les bactéries indicatrices, puis doucement homogénéisé afin d'éviter la présence de bulles (impossibilité de les résorber à la flamme pour ne pas tuer les cellules) puis réparti en boîtes de Pétri.

Cette méthode donne des résultats très satisfaisants, répétitifs et même quantitatifs : de larges zones d'induction de la croissance de la souche Lys⁻ autour des colonies permettent de les sélectionner comme de bonnes souches productrices qui seront ensuite testées en milieu liquide.

D. Mise en évidence de la lysine-décarboxylase :

Plusieurs techniques ont été testées et comparées mais se sont montrées décevantes car ne permettant pas d'applications génétiques simples. Elles ont néanmoins servi à rechercher d'éventuelles souches mutantes dépourvues ou à faible activité lysine -décarboxylasique.

1) Méthode de Taylor:

Cette méthode est très utilisée en bactériologie médicale (113) et surtout dans les galeries d'identification de souches d'Entérobactériacées (8). Elle utilise un milieu riche en lysine et contenant comme indicateur de pH le pourpre de bromocrésol . Sa composition est la suivante:

L-lysine monochlorhydrate	5 g
Extrait de levures (Difco)	3 g
Glucose (RAL)	1 g
Pourpre de bromocrésol (solution éthylique à 1,6 %)	1 ml
Eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 7,2- 7,4 et le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C. Les tubes sontensemencés avec un peu de culture sur tube gélosé de 24 heures (à 37°C). Une coloration bleu-violet indique une décarboxylation de la lysine . Au contraire une

coloration jaune indique une absence de décarboxylation. Les résultats obtenus sont assez aléatoires et peu répétitifs et ne permettent pas, bien que ce test soit assez simple, d'être affirmatif quant au résultat obtenu.

2) Méthode de Taylor modifiée :

Nous avons testé le même milieu de Taylor mais sous forme gélosée (à 16 g/l d'agar Difco) en ajoutant non pas du BCP comme indicateur de pH mais 3 ml d'une solution à 0,02 % par flacon de 100 ml de milieu gélosé ,des indicateurs suivants:

- Tournesol
- Rouge de méthyle
- Bleu de bromothymol
- Rouge de phénol
- Hématoxyline
- Orange II
- Vert de bromocrésol

Un changement de couleur significatif est obtenu avec le bleu de bromothymol et l'hématoxyline . Cette coloration est peu stable et difficile à déceler au niveau des colonies isolées sauf dans le cas de germes nettement négatifs comme les Proteus. Pour les deux espèces de Proteus testées ,P.mirabilis et P.rettgeri la couleur du milieu passe du bleu-vert au vert-jaune avec le bleu de bromothymol et du mauve clair au rose avec l'hématoxyline après 48 heures d'incubation à 37°C.

Les couleurs obtenues n'étaient pas stables ni significatives avec d'autres genres pourtant négatifs au point de vue lysine-décarboxylase comme des Shigella ou des Citrobacter et avec certains mutants d'E.coli.

3) Méthode de Richard :

Cette méthode (86) utilise le milieu de Falkow (30) sans peptone et complétement selon les cas par de la lysine ,de l'arginine ou de l'ornithine. Dans le cas présent la composition du milieu est la même que celle du milieu de Taylor mais le pH est ajusté à 6,3 et une série de milieux témoins sont réalisés en omettant la L-lysine. L'ensemencement se fait à partir d'une culture pure récente sur gélose ordinaire ,en tubes de 16/160 à capsule métallique. La présence de décarboxylase se traduit par une couleur mauve du milieu après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C. Une coloration jaune indique une absence de décarboxylation. Ce test donne de meilleurs résultats pour les entérobactéries en ajoutant une couche de paraffine stérile sur le milieu d'incubation (anaérobiose) mais ce type d'essai est difficilement envisageable pour des recherches génétiques.

1.1.3. ETUDE DE LA PRODUCTIVITE DES SOUCHES :

Cette étude a porté sur l'ensemble des souches obtenues à l'aide d'un milieu minimum appelé MSB₁ (85) complétement selon les besoins des souches et sur lequel il est donc possible de faire toutes les modifications désirées et quantifiables. Les essais de sélection de souches ont été faites sur ce milieu sous forme gélosée et les essais de productivité sur ce milieu sous forme liquide (même composition) ,en fioles erlenmeyer puis en fermenteurs de laboratoire.

A) Milieu synthétique MSB₁

Le milieu MSB₁ (milieu synthétique à la vitamine B₁) complet se prépare au moment de son utilisation en mélangeant les solutions suivantes:

- solution minérale : 12,5 ml
- solution de tampon pH 8: 12,5 ml
- solution de lactose ou de glucose à 10 % : 25 ml
- solution de vitamine B₁ à 500 µg/ml 1 ml
- eau distillée 200 ml

La solution de vitamine B₁ se stérilise par passage au bain-marie à l'ébullition pendant une heure.

La composition des différentes solutions est la suivante:

- solution minérale (base):

- (NH₄)₂SO₄ 60 g
- Mg SO₄ 6 g
- Fe SO₄ (solution à 0,05%): 3 ml
- Mn Cl₂ (" " "): 6 ml
- Na Cl 0,3 g
- Eau distillée: q.s.p 1500 ml

Stérilisation par autoclavage (20 minutes à 120°C).

- Solution tampon à pH 8 :

- K₂ H PO₄ 360 g
- K H₂ PO₄ 40 g

Eau distillée : q.s.p 1000 ml

Stérilisation par autoclavage (30 minutes à 105°C).

- Composition globale du milieu (par litre de milieu complet):

$K_2 H PO_4$	18 g
$K H_2 PO_4$	2 g
$(NH_4)_2 SO_4$	2 g
$Mg SO_4$	0,2 g
$Na Cl$	0,01 g
$Fe SO_4$	0,5 mg
$Mn Cl_2$	1 mg
Vit. B ₁	5 µg
Lactose (ou glucose)	20 g

- Milieu modifié pour l'étude de la productivité des souches
(appelé MSB₁-PR)

Sa composition est celle du milieu de base mais complétée à 6 g/l de $NH_4 Cl$, de 80 mg/l de L-thréonine, de 40 mg/l de L-méthionine et la concentration en lactose est doublée (40g/l).

- Autres modifications :

Le milieu MSB₁ de base peut être complété en exigences particulières comme les amino acides pour les souches auxotrophes, ou enrichi en extrait de levures ou en "casamino-acids" (hydrolysat acide de caséine) selon les essais.

La concentration en sucre peut également être modifiée selon les expériences et divers sels peuvent aussi être ajoutés.

Toute modification du milieu de base sera précisée lorsqu'elle aura lieu.

Le milieu complet de base est limpide et incolore et il est aisé de suivre l'évolution des cultures simplement en suivant l'évolution de la D.O (Densité Optique = absorbance) mesurée à 600 nm

dans des cuves de 1 cm d'épaisseur.

Le milieu est également utilisable sous forme gélosée ,avec les mêmes concentrations qu'en milieu liquide, en ajoutant 18 g/l de Bacto-Agar Difco dissous dans des flacons de 500 ml et donc à raison de 200 ml de gélose blanche par flacon. Ces derniers sont stérilisés par autoclavage pendant 25 minutes à 120°C. La gélose est fondue en bain-marie à l'ébullition avant son utilisation puis complétement et homogénéisée avant d'être répartie en boites de Pétri.

B) Essais préliminaires en fiole erlenmeyer :

Après isolement des clones producteurs sur milieu gélosé , ceux ci sont testés en milieu liquide soit en flacons à transfusion, soit en fioles erlenmeyer de 500 ml (les performances des souches étant très comparables dans les deux cas).

Le milieu MSB₁ étant préparé en flacons (250 ml de milieu complet par flacon) , celui-ci est donc réparti , de préférence en chambre stérile, dans des fioles erlenmeyer , à raison de 20 ml par fiole de 500 ml. Des prélèvements d'échantillons sont effectués dans les cultures aux temps choisis et les paramètres suivants sont déterminés : pH, D.O , concentration de lysine extra-cellulaire synthétisée et éventuellement détection de cadavérine.

En effet l'accumulation de cadavérine dans les prélèvements est favorisée en milieu faiblement aéré , par la stimulation de la lysine-décarboxylase (responsable de la transformation de la lysine en cadavérine) qui se trouve alors, en absence d'agitation, fortement stimulée (111). Cette activité lysine-décarboxylasique peut être bloquée par des inhibiteurs spécifiques ou non (111) ajoutés au

prélèvement sitôt celui-ci effectué. Nous avons pour cela utilisé l'isoniazide (hydrazide de l'acide isonicotinique) à 10^{-3} M ou le chlorure mercurique à 10^{-4} M et constaté par des dosages sur des échantillons maintenus sur la paillasse que le taux de lysine restait constant, alors qu'en absence d'inhibiteur celui-ci diminuait de façon appréciable après seulement quelques heures.

Les clones s'avérant être les meilleurs en fioles de 500 ml sont ensuite testées de façon plus précise en fioles de 2000 ml ou en ballons de même volume, la productivité étant la même dans les deux cas. Pour favoriser l'aération et les échanges gazeux, 40 ml seulement de milieu de culture sont répartis par fiole.

Dans tous les cas l'incubation se fait sur table d'agitation (200 tours/minute) en chambre chaude thermorégulée à 30°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) pendant 48 à 72 heures.

C) Etudes en fermenteurs de laboratoire :

Le matériel utilisé dans notre laboratoire a fait l'objet d'une étude particulière (91) et se compose de petits modules de fermentation comprenant des cuves de fermentation de 15 litres, les accessoires et les modules de régulation correspondants (température, agitation, pH, antimousse, débits gazeux, etc...).

La température est fixée en début de fermentation (28°C ou 37°C , selon les essais) de même que les débits gazeux (mélange d'air et d'oxygène) qui peuvent être éventuellement modifiés en cours de fermentation.

Ces essais sont effectués en milieu MSB_1 modifié préparé de la façon suivante : les cuves montées avec leurs accessoires sont

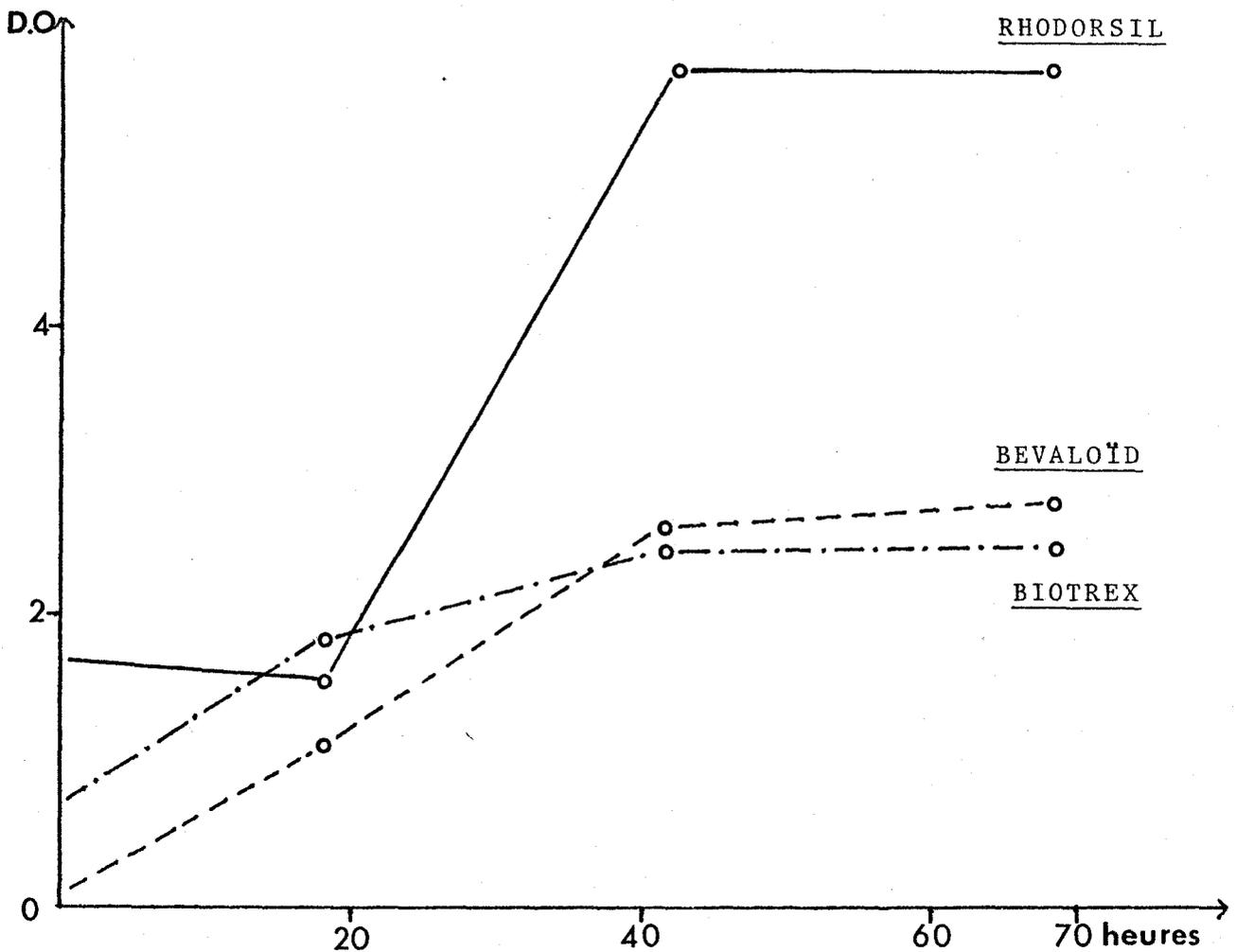
d'abord autoclavées à vide (une heure à 130°C) , puis à nouveau autoclavées avec l'eau et la solution tampon à pH 8 correspondant au volume final souhaité, pendant 30 minutes à 121°C.

La solution de lactose et la solution minérale sont autoclavées séparément en fioles erlenmeyer et ajoutées , en chambre stérile, à la préculture avant l'ensemencement du fermenteur. Les fioles de préculture sont en fait des fioles à toxine modifiées et comportent une tubulure de verre plongeant au fond de celle-ci. Ce système permet le transfert de la préculture dans le fermenteur à l'aide d'une pompe péristaltique. Les prélèvements d'échantillons en cours de fermentation sont également effectués en circuit fermé , à l'aide de cette pompe et les échantillons sont prélevés à la seringue stérile à travers un manchon de caoutchouc stérilisé à l'alcool.

L'antimousse utilisé est le Rhodorsil 426R : celui-ci peut être autoclavé, peut se diluer et ne se redépose en plusieurs phases qu'après plusieurs jours de repos; il reste donc, pour ces raisons, préférable à l'antimousse de type Bevaloïd qui présente les inconvénients cités. Pourtant des problèmes de contamination se sont révélés avec cet antimousse, et une solution plus simple que l'autoclavage s'est avérée être efficace. Elle consiste à ajouter de la β -propiolactone à l'antimousse , à la concentration finale de 0,2 % (le pH de l'antimousse est alors de 6,15) : des étalements sur gélose ordinaire (cf. plus loin) ont montré que la stérilisation était totale après deux heures et que la β -propiolactone ne perturbait pas la fermentation en se dégradant elle-même à la température ambiante et en se diluant dans le fermenteur avec l'antimousse. Des essais concernant l'influence de ces antimousses sur la croissance ont montré pour le Bevaloïd et le Biotrex (figure page suivante) le début de croissance était normal mais qu'ensuite la

présence de ces antimousses limitait celle-ci à une faible D.O , alors qu'en présence de Rhodorsil , le début de croissance est retardé mais ensuite celle-ci se fait normalement.

Nous avons contourné ces problèmes en utilisant le Bevaloïd (injecté à la seringue) en début de fermentation, puis le Rhodorsil 426R en cours de fermentation (après dix heures de culture) en régulation automatique .



Courbes de croissance obtenues en présence des divers antimousses

1.1.4. TECHNIQUES DIVERSES :

A) Mesure d'un poids sec de cellules:

Ces mesures sont effectuées dans des petits beechers de 25 ml par pesée du poids humide de départ de 10 ml de culture à D.0 connue, puis du poids sec après passage au four à 105°C, après 24,48, et 72 heures, jusqu'à stabilisation du poids sec correspondant.

B) Lyse des cellules par le lysozyme :

Les cellules sont lysées selon une technique dérivée de celle de Marmur (60). Elle nécessite la préparation des solutions suivantes:

- solution A : NaCl 0,15 M + EDTA 0,1 M ajustée à pH 8.

(EDTA = Acide Ethylène-Diamino-Tetra-Acétique)

- solution B : Saccharose 0,5 M dans du Tris-HCl 0,3 M

(Tris = Hydroxyméthylaminométhane).

Le protocole expérimental observé est le suivant : 20 ml de culture dont on note la D.0 sont centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes et repris dans 16 ml de solution B additionnée de 4 ml de solution A.

Le lysozyme (Sigma Grade I, cristallisé, dialysé et lyophilisé , du blanc d'oeuf) est ajouté à la suspension à raison de 10 mg soit à une concentration finale de 500 µg/ml.

L'ensemble est placé en incubation à 37°C en bain-marie agité, pendant deux heures . Cette technique permet ainsi de lyser la quasi-totalité des cellules. Les paramètres utilisés ont pu être déterminés après une série d'essais sur des cultures d'E.coli K10 dont la D.0 était comprise entre 2,25 et 2,50. Pour un même mélange de 16 ml de solution B et 4 ml de solution A les résultats étaient les suivants après une heure d'incubation (tris, sucrose, EDTA et

NaCl sont indiqués en molarité dans leurs solutions respectives B et A .

Tris	Sucrose	pH de la solutionB	EDTA	NaCl	Lysozyme $\mu\text{g/ml}$	Cellules viables par ml
0,3	0,75	7	0,1	0,15	500	N
0,3	0,75	8	0,1	0,15	500	N
0,3	0,50	8	0,1	0,15	1000	$2,5 \cdot 10^3$
0,3	0,50	8	0,1	0,15	500	3
0,3	0,50	8	0,1	0,15	250	60
0,3	0,50	8	0,05	0,15	250	96

Les meilleures conditions expérimentales sont donc celles décrites, le pH jouant un rôle très important, de même que la concentration en lysozyme : un excès de ce dernier l'empêche d'avoir une activité maximale. Les mêmes paramètres appliqués à *S. marcescens* ont donné des résultats similaires.

C) Milieux de culture :

Nous donnons ici brièvement la composition de quelques milieux de culture couramment utilisés en bactériologie et employés à divers titres au cours de cette étude.

1- Gélose ordinaire (G.O) :

La composition de ce milieu est la suivante:

Extrait de viande Liebig	4 g
Na Cl	5 g
Peptone	10 g

Eau distillée : q.s.p 1 litre ; ajuster le pH à 9, faire bouillir et filtrer puis ajuster à nouveau le pH à 7,2. Ajouter alors 13 g/l d'agar Biomar et autoclaver 20 minutes à 120°C (8).

2- Tryptose-Agar :

Tryptone Difco	10 g
Glucose R.A.L	1 g
Extrait de levures Difco	3 g
Amidon soluble R.A.L	2 g
$K_2 H PO_4$	1 g
Agar Biomar	15 g

Eau distillée : q.s.p 1 litre , pH = 7,2.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

3- Milieu de SANO :

Bacto Peptone Difco	10 g
Extrait de levures	10 g
Na Cl	5 g

q.s.p 1 litre d'eau du robinet .

Ajuster le pH à 7,2.

Ajouter 20 g/l de Bacto Agar Difco.

Ce milieu peut être utilisé sous forme liquide ou gélosée

(97).

1.2. TECHNIQUES D'ETUDE DE LA PERMEABILITE CELLULAIRE :

1.2.1. MATERIEL ET PRODUITS RADIOACTIFS :

Les amino acides radioactifs utilisés proviennent du C.E.A (Commissariat à l'Energie Atomique) et possèdent les caractères suivants :

- L-lysine ^3H -4(n) monochlorhydrate en solution à 22 Ci/mM
- L-arginine ^3H -4(n) chlorhydrate en solution à 22 Ci/mM
- L-aspartate ^{14}C (u) en solution dans HCl 0,01 N (66 mCi/mM)

Tous les amino acides non radioactifs utilisés au cours des mêmes essais proviennent de Sigma Chemical Company.

Les filtrations stériles sont effectuées sur un appareillage Millipore à l'aide de filtres dont le diamètre des pores est de 0,45 μ .

Les mesures de radioactivité sont réalisées à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide Beckman de type LS 100 à standardisation et comptage automatiques.

1.2.2. PERMEABILITE DES CELLULES AUX AMINO ACIDES :

Notre technique s'inspire en partie de celle de Knape (50) : des cultures d'une nuit en milieu MSB₁ complété en L-thréonine pour les souches exigeantes, sont diluées et remises en incubation jusqu'à l'obtention d'une D.O proche de 1,0 (phase exponentielle de croissance). Un échantillon de 10 ml de culture est alors prélevé et lavé deux fois en milieu MSB₁ sans base minérale puis remis en suspension en milieu complet, en présence ou non d'acide amino radioactif ou non. Une étude cinétique de perméabilité est alors effectuée en réalisant des prélèvements en tubes à

hémolyse auxquels sont ajoutés 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 5 % maintenu à 0°C en bain de glace pour arrêter l'incorporation.

La suspension est ensuite filtrée sur filtre Millipore puis le filtre est lavé abondamment au TCA froid et séché dans une enceinte sous lampe infra-rouge.

Les filtres secs sont alors placés dans des flacons échantillonneurs spéciaux avec 10 ml de solution toluène-PPO (2,5-diphényloxazole). Ces flacons sont ensuite disposés pour comptage dans le spectromètre. Les conditions particulières pour chaque essai seront spécifiés dans la deuxième partie.

1.2.3. INCORPORATION D' AMINO ACIDE RADIOACTIF :

Un échantillon de 50 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance (D.O proche de 1,0) est centrifugé et repris dans 5 ml de milieu MSB₁. Au temps t₀ l'on ajoute 0,05 ml de solution d'aspartate radioactif, l'incubation se faisant à température ambiante.

Quinze secondes plus tard l'incubation est arrêtée par de l'alcool chaud au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. La suspension est alors centrifugée (15 minutes à 12000 g) et le surnageant est concentré sur un évaporateur rotatif de type Büchi jusqu'à l'obtention de 2 à 3 ml de concentrat.

Une chromato-électrophorèse bidimensionnelle est alors entreprise par dépôt de 10 µl de concentrat et les amino acides recherchés sont détectés par rapport à un témoin.

1.3. TECHNIQUES DE DOSAGE ET DE CHROMATOGRAPHIE :

1.3.1. LACTOSE ET OSES TOTAUX :

La méthode utilisée est encore appelée méthode à l'orcinol (64):

A) Réactifs :

Orcinol : 1,5 g dans 100 ml d' H_2SO_4 à 30 %.

H_2SO_4 à 60 %.

Solution de lactose étalon à 300 $\mu g/ml$.

B) Mode opératoire :

Le dosage est réalisé dans des tubes de 20/200 à raison de 1ml de solution étalon pour 2 ml de solution d'orcinol et 15 ml de solution d' H_2SO_4 à 60 %. La réaction se développe à 80°C ($\pm 2^\circ C$) pendant 20 minutes puis les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 45 minutes. La lecture se fait à 510 nm avec des cuves de 1 cm d'épaisseur, par rapport à un tube témoin sans sucre. La D.O ainsi obtenue doit être comprise entre 0 et 0,50 soit jusqu'à une concentration de 300 $\mu g/ml$.

1.3.2. IONS AMMONIUM :

Cette technique utilise la réaction de Nessler

A) Réactifs :

Solution A : Iodure de potassium 20 g

Iodure mercurique 30 g

chauffer jusqu'à dissolution dans 50 ml d'eau distillée puis ajouter 150 ml d'eau, filtrer dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter. Cette solution doit être conservée à l'abri de la

lumière .

Solution B : NaOH à 20 % (Poids/Volume)

Le réactif final s'obtient en mélangeant à volume égal les solutions A et B.

B) Mode opératoire :

En tubes de 16/160 ajouter 0,3 ml de réactif à 3 ml de solution à doser , agiter; la réaction se développe à température ambiante. La lecture se fait après 5 minutes , à 420 nm en cuves de 1 cm d'épaisseur. Cette méthode est valable pour des solutions dont la concentration est inférieure à 10 $\mu\text{g/ml}$ d'ions NH_4 .

1.3.3. PHOSPHATES INORGANIQUES :

Cette méthode dérive de celle de Fiske et Subba-Row (54):

A) Réactifs :

- $\text{H}_2 \text{SO}_4$ 5 N

- Molybdate d'ammonium 2,5 %

- Réactif : mélanger dans un mortier 0,2 g d'acide 1-amino-2-naphtol 4 - sulfonique avec 1,2 g de bisulfite de sodium et 1,2 g de sulfite de sodium. Dissoudre ensuite 0,25 g de cette poudre dans 10 ml d'eau (conservation maximale : une semaine à 4° C).

B) Mode opératoire :

En tubes de 16/160 l'on mélange 1 ml de solution à doser, 1 ml d' $\text{H}_2 \text{SO}_4$ 5 N, 1 ml de solution de molybdate ; agiter puis ajouter 0,1 ml de réactif ; agiter puis compléter à 10 ml avec de l'eau

distillée ; agiter et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.

- Gamme étalon : elle s'obtient avec une solution de $K H_2 P O_4$ analytiquement pur (1,3613 g pour 100 ml d'eau distillée) et diluée au 1/10 : un millilitre de cette solution correspond alors à 1 μM de phosphate.

- Lecture : elle se fait à 660 nm dans des cuves de 1 cm d'épaisseur par rapport à un témoin sans phosphate.

1.3.4. LYSINE :

Cette méthode a été mise au point par Chinard (14) et discutée par Work (126) . Elle est valable dans le cas d'un amino-acide en solution pure ou lorsque les risques d'interférence avec d'autres amino-acides sont quasiment nuls.

A) Réactifs :

- Mélange d' $H_3 P O_4$ 6 M (60 %) et d'acide acétique glacial à 40 %.
- Solution de ninhydrine : 25 mg/ml du mélange précédent.

B) Mode opératoire :

En tubes de 16/160 on mélange 1ml de solution à doser, 1 ml d'acide acétique glacial et 1 ml de solution de ninhydrine. Un témoin est effectué pour chaque solution à doser en omettant la ninhydrine et en la remplaçant par 1 ml de mélange.

Les tubes sont placés pendant une heure à 100° C puis refroidis et complétés à 5 ml avec de l'acide acétique glacial.

- Gamme étalon : elle se réalise avec une solution de lysine à 1 mg/ml de dosage étant valable pour des solutions de concentration inférieure à 1 - 1,2 mg/ml.
- La lecture se fait à 515 nm dans des cuves de 1 cm d'épaisseur par rapport au tube témoin correspondant à chaque essai.

C) Interférences :

La présente technique décrite par Chinard (14) peut aussi être utilisée pour le dosage d'autres amino-acides en particulier la proline et l'ornithine. Ces derniers n'étant pas, dans les conditions normales présents dans le milieu de culture, les interférences ont peu de chance d'intervenir dans le présent dosage. Tout risque est éliminé par l'examen des solutions riches en lysine en chromatographie sur couche mince. En particulier la proline est ainsi facilement décelable.

Une comparaison des gammes étalon permet d'apprécier ce risque d'interférence :

	$\mu\text{g/ml}$	D.O
<u>L-lysine</u>	100	0,16
	250	0,41
	500	0,81
	750	1,21
	1000	1,62

	$\mu\text{g/ml}$	D.O
<u>L-Proline</u>	25	0,76
	50	1,48
	100	1,95

Des solutions de cadavérine ont également été testées à l'aide de ce dosage et ont montré une absence totale de coloration : la cadavérine n'intervient donc pas sur le dosage de lysine.

1.3.5. METHIONINE :A) Réactifs :

- NaOH 5 N
- Nitroprussiate de sodium 10 %
- Glycocolle 3 %
- $H_3 PO_4$ concentré

B) Mode opératoire : (6)

1 ml de solution à doser et dilué à 5 ml ; l'on ajoute alors 1 ml de soude et 0,1 ml de solution de nitroprussiate. Agiter 10 minutes à température ambiante puis ajouter 2 ml de solution de glycocolle. Après 10 minutes verser goutte à goutte 2 ml d' $H_3 PO_4$ et laisser la coloration se développer pendant 5 minutes. Un témoin sans méthionine sert de référence pour l'ensemble des essais. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère à 200 $\mu g/ml$ et la lecture se fait à 540 nm.

1.3.6. TEST CADAVERINE :

Cette méthode ne permet pas une détermination quantitative du taux de cadavérine présent dans un milieu de culture mais donne une idée approximative de la concentration de celle-ci (33) .

A) Réactifs :

KOH 40 %

Chloroforme concentré

Solution de ninhydrine à 4 % dans du diméthylsulfoxyde (DMSO)

CH_3COOH glacial.

Mélange : 1,5 ml de solution de ninhydrine, 1 ml d'acide acétique,

q.s.p 100 ml de chloroforme.

B) Mode opératoire :

A 2 ml de culture non centrifugée ajouter 1 ml de KOH à 40 % et agiter vigoureusement, au vortex si possible, puis compléter avec 2 ml de chloroforme et agiter vigoureusement. Laisser reposer et ajouter doucement 1 ml de réactif à la ninhydrine dans la phase inférieure ; agiter doucement et laisser la réaction se développer pendant 3 minutes à 65° C. Cette coloration n'est pas lisible au spectrophotomètre car trop fugace et n'est pas strictement proportionnelle à la concentration. Les résultats peuvent néanmoins se traduire de la façon suivante :

- + + coloration mauve intense
- + faible coloration mauve
- + très légère coloration violette
- absence de coloration.

- Mise au point de la technique : celle-ci a été réalisée sur des cultures en tubes (milieu MSB₁) à l'aide de souches de référence. Après 24 heures d'incubation on ajoute dans les tubes de culture de la L-lysine afin que la concentration de celle-ci soit de 10 mg/ml ; 4 heures plus tard la présence ou non de cadavérine peut être détectée par la méthode précédente, en particulier sur des cultures d'Entérobactéries: E.coli, S. marcescens, Klebsiella aerogenes et Salmonella typhi qui sont très nettement positifs alors que Citrobacter freundii et une souche de Bacillus, B. megatherium, sont négatifs. Les Proteus, qui poussent très lentement sur le milieu MSB₁ donnent un résultat négatif, en particulier sur P. vulgaris, P. rettgeri et P. mirabilis.

De façon quantitative nous avons pu déceler une très faible concentration de cadaverine (25µg/ml) par cette technique, à l'aide de cadavérine pure (Sigma) et lui donner le résultat : \pm . Ce test a donc pu être appliqué de façon très satisfaisante sur les souches mutantes d'E. coli, en particulier pour détecter les souches ne formant pas ou peu de cadavérine, donc à faible activité lysine-décarboxylasique.

- Remarques : une autre technique est proposée par Lu et Mallette (57) mais nécessite une purification préalable de l'extrait enzymatique, ce qui ne peut convenir dans notre recherche d'un test rapide.

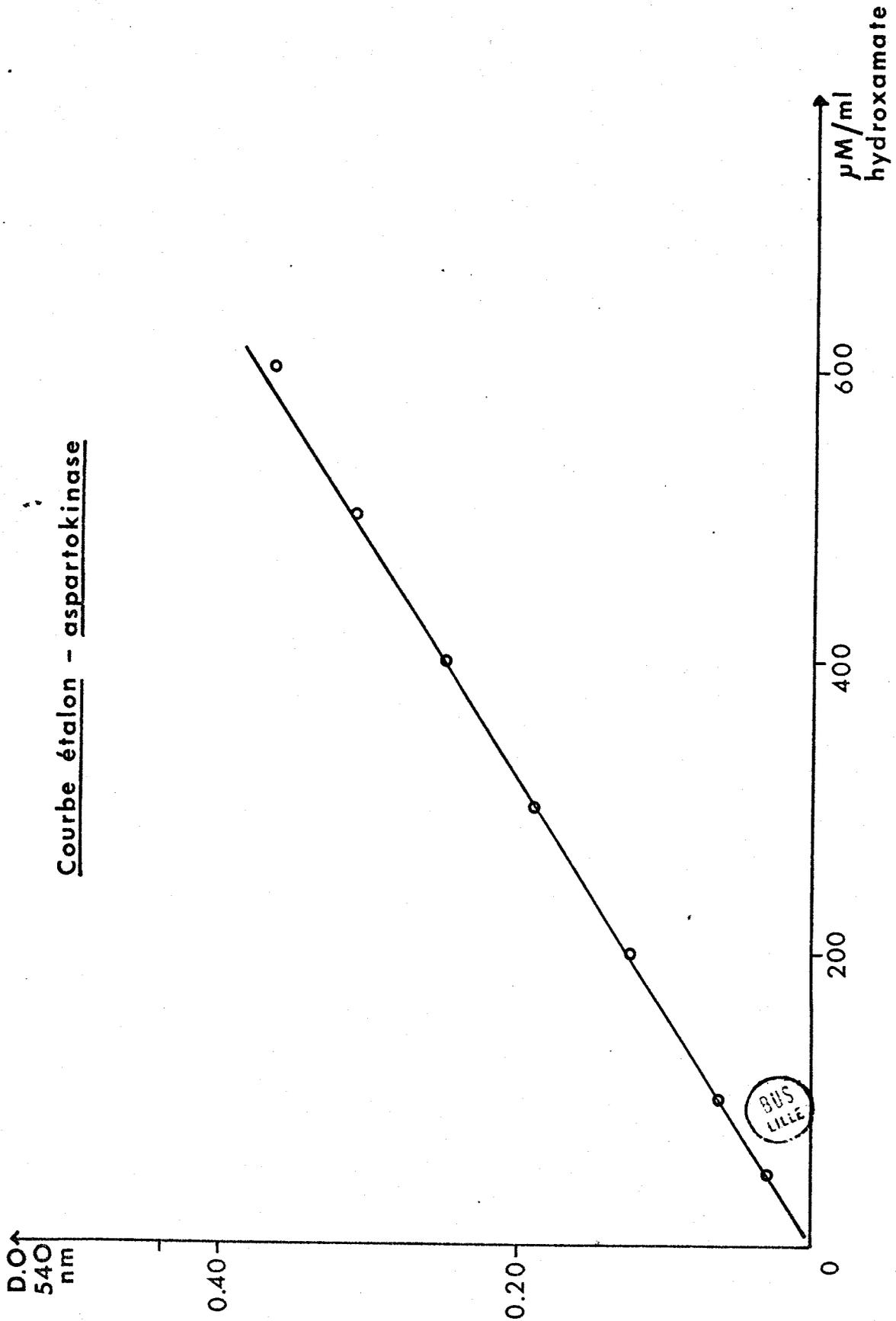
1.3.7. ASPARTOKINASE :

La méthode décrite ici s'inspire de celle de Stadman (112), reprise par Truffa-Bachi et Cohen (117) et qui nous a été procurée par J.C. Patte, collaborateur de G.N. Cohen. Cette dernière technique a également, après plusieurs séries d'essais, subi quelques modifications. Signalons également que la méthode de Black (5) n'a pas donné de résultats satisfaisants.

A) Réactifs :

Aspartate de potassium	0,1 M
ATP (di-sodium)	0,2 M ajusté à pH 7
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,3 M
NH ₂ OH , H Cl	8 M
KOH	12 M
Tris, H Cl	1 M ajusté à pH 8,1
Fe Cl ₃ , 6H ₂ O à 5 % dans H Cl	0,1 N.

Courbe étalon - aspartokinase



Mélange : 9 ml de Tris, H Cl + 0,5 ml de Mg SO₄ + 5 ml d'ATP.
L'hydroxylamine 8 M est neutralisée par KOH 12 M immédiatement avant son utilisation.

B) Mode opératoire :

En tubes de 16/160 on ajoute :

0,9 ml de mélange

0,6 ml d'hydroxylamine

0,3 ml d'aspartate

0,3 ml de solution à doser

0,9 ml d'eau -Agiter.

La réaction se fait à 27° C pendant 30 minutes. Ajouter ensuite 3ml de solution ferrique, centrifuger et filtrer le surnageant sur papier Whatman I. La lecture se fait à 540 nm par rapport à un témoin eau + solution ferrique. On mesure ainsi la quantité de L- Aspartate - β - hydroxamate obtenu en incubant l'enzyme avec les réactifs et l'hydroxylamine. Une courbe témoin réalisée avec de l'hydroxamate pur (Sigma) montre (page précédente) que ce dosage reste proportionnel dans la gamme où nous l'avons utilisé (D.O entre 0 et 0,30) soit 500 μ M/ml d'hydroxamate aspartique.

1.3.8. CHROMATOGRAPHIE D'ACIDES AMINES SUR PAPIER :

Elle a été réalisée selon la technique classique, sur papier Whatman I et en utilisant le solvant de Partridge : N- butanol, acide acétique, eau (5-1-5).

Le révélateur est une solution de N- butanol contenant 1 % de ninhydrine et 1 % d'acide acétique.

Le fixateur est obtenu en ajoutant 1 ml d'une solution saturée de

nitrate de cuivre et 0,2 ml d'acide nitrique R.P à 1 % à 100 ml d'alcool éthylique à 96 %.

1.3.9. CHROMATO-ELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE SUR PAPIER:

Elle s'effectue sur papier Whatman I par dépôt de 10 µl de solution en effectuant d'abord la chromatographie comme ci-dessus puis en effectuant une électrophorèse dans l'autre sens à l'aide d'une solution d'ammoniaque R.P diluée au 1/10 et dont le pH est ajusté à 8,0. La migration se fait pendant 24 heures puis le chromatogramme est séché et la révélation se fait à la ninhydrine comme précédemment, par comparaison avec un essai témoin réalisé avec un mélange connu de solutions d'amino acides.

1.3.10. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE :

Ce type de chromatographie s'effectue sur des plaques toutes faites de type Silica-Gel G dans des cuves à chromatographie spéciales pour les essais en couche mince (Shandon). Les dépôts sont de 5 ou de 10 µl de solution à analyser. La migration est arrêtée à 3-4 cm de l'autre extrémité de la plaque.

Les solvants utilisés sont les suivants:

- n-butanol, acide acétique, eau (8,2,2)
- méthanol, chloroforme, ammoniaque à 17 % (2,2,1)
- crésol, acide acétique, eau (2,1,2) (33)

Les chromatogrammes sont séchés à température ambiante puis révélées en pulvérisant une solution révélatrice à la ninhydrine (0,3 g de ninhydrine dans 100 ml de n-butanol additionnés de 3 ml d'acide acétique glacial) et placés dans une étuve à 105°C

jusqu'à ce que les taches mauves apparaissent.

Après révélation il est possible de préserver quelque temps la plaque en y pulvérisant une solution de fixateur (1 ml de solution saturée de nitrate de cuivre et 0,2 ml d'acide nitrique à 10 % pour 100 ml d'éthanol à 96 %).

2.

CHOIX DE LA SOUCHE :

ETUDE PHYSIOLOGIQUE COMPAREE ENTRE

S.MARCESENS ET E.COLI.

La recherche d'une souche facilement utilisable pour des expériences de génétique faisant intervenir en particulier son aptitude à la mutagenèse , à subir des modifications à différents niveaux sur ses mécanismes de régulation et ayant de plus une bonne croissance, nous a amené à envisager quelques types bactériens, en particulier parmi les Entérobactériacées.

Notre choix s'est très vite trouvé limité à deux espèces: Escherichia coli et Serratia marcescens, cette dernière étant peu utilisée en microbiologie appliquée. Les faibles connaissances concernant S.marcescens nous ont amené à étudier plusieurs aspects fondamentaux de sa physiologie et à les comparer à ceux d'E.coli, puis à choisir parmi ces deux espèces celle qui conviendrait le mieux au but recherché.

2.1. CHOIX DES SOUCHES :

2.1.1. CARACTERES RECHERCHES :

Le but de notre étude a été défini précédemment et il s'agissait donc de rechercher une souche à croissance rapide ,capable d'utiliser le lactose comme source de carbone et susceptible de subir des modifications génétiques.

Notre prospection a porté tout d'abord sur des espèces d'entérobactéries connues comme étant lactose + :

	<u>Escherichia coli</u>
<u>Lactose + :</u>	<u>Citrobacter freundii</u>
	<u>Klebsiella</u>
	<u>Enterobacter aerogenes</u>

Serratia marcescensLactose ⁺

Coliformes

Arizona

Compte tenu des souches à notre disposition et des critères de pouvoir pathogène de certaines espèces , deux souches se sont avérées être intéressantes.

L' une d'entre elles était Escherichia coli K10, à croissance rapide, capable d'utiliser le lactose comme seule source de carbone grace à une importante synthèse de β -galactosidase , comme l'a montré Lenoir (55) et dont l'aptitude à la mutagenèse est bien connue. De plus la plupart des brevets portant sur la production de lysine par E.coli arrivant à expiration ,cette perspective était très intéressante.

L'autre souche retenue était une souche sauvage de S.marcescens à croissance rapide sur milieu lactosé .Les réticences concernant cette espèce portaient sur le caractère semi-pathogène attribué à celle-ci par certains auteurs (31,122) et le peu de connaissances concernant la physiologie de cette espèce.De ce fait nous avons entrepris de cerner certains aspects de sa physiologie et de tester son aptitude à la mutagenèse.

Une autre espèce, Brevibacterium flavum, bien que déjà très utilisée pour la production de lysine (106) et dont une étude préliminaire avait été entreprise dans notre laboratoire par Murgov (67) n'a pu être retenue pour la simple raison qu'elle est incapable d'utiliser le lactose.

2.1.2. VERIFICATION ET CARACTERES DES SOUCHES UTILISEES :

A) Souches utilisées pour notre étude :

- E.coli K10 provient de la collection du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de Lille. Cette souche est lactose +, sensible à la streptomycine et prototrophe.
- S.marcescens LT₁ a été isolé d'un échantillon de beurre par le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Institut Pasteur (Unité au CERTIA). Cette souche est prototrophe et pigmentée à 30°C sur milieu gélosé (Tryptose Agar) mais non en milieu liquide.

B) Souches de référence :

Les souches suivantes ont pu être comparées aux souches précédentes:

- E.coli HFr C : prototrophe, sensible à la streptomycine.
- E. coli FAB : auxotrophe, sensible à la streptomycine. Cette souche est Met⁻, Leu⁻, His⁻, Thr⁻, Pro⁻, Lac⁻.

Ces deux souches proviennent du laboratoire de microbiologie (Université des Sciences et Techniques de Lille).

- S.marcescens IPL 1148, prototrophe, pigmentant à 30°C, provient de la collection de l'Institut Pasteur de Lille.

C) Propriétés de la souche de S.marcescens (LT₁):

Cette souche appelée LT₁ possède tous les caractères requis et définis par Buttiaux (8) et son aptitude à la mutagenèse a été testée avec la NTG selon la technique standard décrite précédemment. Le pH optimum pour la mutagenèse est de 6 pour la mortalité des cellules et l'utilisation de la pénicilline donne de bons

résultats. Par la technique de recherche de souches auxotrophes à l'aide de mélanges d'acides aminés (cf. 1.1.2.B.3) nous avons pu identifier près de 25 souches auxotrophes d'abord par leur groupe d'exigence puis par leur exigence particulière.

Parmi ces clones, 19 étaient stables après plusieurs repiquages. Nous avons ainsi décelé 3 souches Pro^- , 2 souches Leu^- , 9 souches Met^- ou Cys^- , 2 souches Thr^- , et 1 souche à polyexigences du groupe A. Ces résultats ont été obtenus après une série de mutagenèse, après sélection à la pénicilline et nous ont permis de constater que *S. marcescens* peut facilement subir des mutations et que la plupart de celles-ci sont stables après plusieurs repiquages successifs.

2.2 . ETUDE DE LA CROISSANCE EN PRESENCE D'INHIBITEURS :

2.2.1. GENERALITES ET PRESENTATION DU TRAVAIL :

L'obtention par mutagenèse de souches mutantes résistantes à des analogues structuraux d'acides aminés a permis l'obtention de souches productrices de l'acide aminé correspondant à l'analogue utilisé (1,68). Rappelons ici que les analogues structuraux sont des anti-métabolites (120) et peuvent être définis comme des molécules biologiquement anormales, le plus souvent de synthèse et capables d'interférer avec les réactions du métabolite normal par suite de leur incorporation dans les protéines bactériennes qui deviennent alors létales pour la cellule (66).

Lorsque la résistance à de tels analogues n'est pas due à une faible perméabilité des cellules donc à un transport membranaire déficient

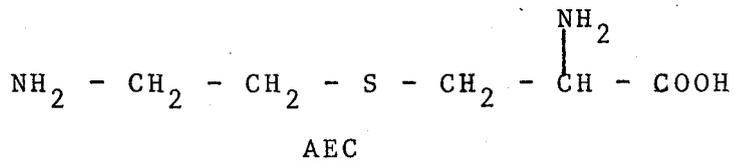
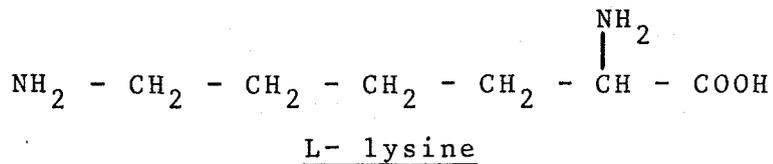
(58) à la fois pour l'acide aminé et pour son analogue, cette résistance est due à la perte des mécanismes de régulation intervenant sur la chaîne de biosynthèse de cet amino-acide (1,65) . De nombreuses souches productives d'acides aminés ont pu ainsi être obtenues par cette méthode (1,68) qui a, entre autres, été utilisée pour l'obtention de souches productrices de lysine. Des souches ont été rendues résistantes à l'AEC(S-(2-Aminoéthyl)-L-Cystéine) en particulier chez Brevibacterium flavum (99) et chez Corynebacterium (38) . Ainsi la sensibilité d'une souche aux analogues structuraux d'un amino-acide permet d'envisager la recherche de souches mutantes résistantes à ces analogues et d'avoir ainsi toutes les chances d'obtenir des souches productrices de l'acide naturel correspondant. Cette résistance à un ou plusieurs analogues structuraux rend également la souche mutante résistante à l'accumulation dans le milieu de culture de grandes quantités de l'acide produit, à des concentrations qui inhibent ou retardent fortement la croissance de la souche sauvage (68) .

A partir de cette perspective de travail nous avons testé la sensibilité de *S. marcescens* et *E. coli* à deux analogues structuraux de la L- lysine, l'AEC et la L- canavanine (qui est plus particulièrement un analogue structural au niveau des processus de transport membranaires), puis nous avons testé également l'influence de fortes concentrations de L-lysine sur la croissance.

2.2.2 INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR L'AEC :

L'AEC ou S- (2-Aminoéthyl)-L-Cystéine, découverte par Cavallini en 1955 (12) est connue en tant qu'analogue structural de la

L- lysine. Sa formule chimique est voisine de celle de la lysine :



Cet analogue inhibe la croissance chez Leuconostoc mesenteroides et Lactobacillus arabinosus (7), chez Escherichia coli et chez Bacillus subtilis (99) cet de plus inhibe l'activité aspartokinase chez E. coli, en particulier au niveau de l'aspartokinase III (116) .

A) Protocole expérimental :

Les cultures sont réalisées en tubes de verre de 20/200 cotonnés, en milieu MSB₁ normal complété selon les cas par 40 µg/ml d'acide aminé (pour les souches auxotrophes). Chaque tube contenant 10 ml de milieu réparti à la pipette en chambre stérile, est ensemencé puis placé 18 heures en incubation dans un bain-marie agité à 37° C. La densité optique de chaque culture est mesurée en général après 18 heures d'incubation, à 600 nm dans des cuves de 1 cm d'épaisseur par rapport à un témoin (eau distillée). L'inoculum pour une même espèce est le même et sert à ensemencer tous les tubes avec la même quantité de suspension.

Dans certains cas nous avons suivi l'évolution de la croissance en fonction du temps, en particulier chez S. marcescens en raison de sa résistance, et pour cette étude les cultures sont été réalisées en fioles erlenmeyer de 500 ml avec 100 ml de culture.

B) Etude sur E. coli K 10 :

Les cultures obtenues en tubes à essais après 18 heures d'incubation donnent les résultats suivants, en fonction de la concentration en AEC dans le milieu de culture :

AEC mg/ml	0	0,05	0,10	0,125	0,250
D.O	1,14	0,22	0,16	0	0
pourcentage d'inhibition	0	80,7	85,9	100	100

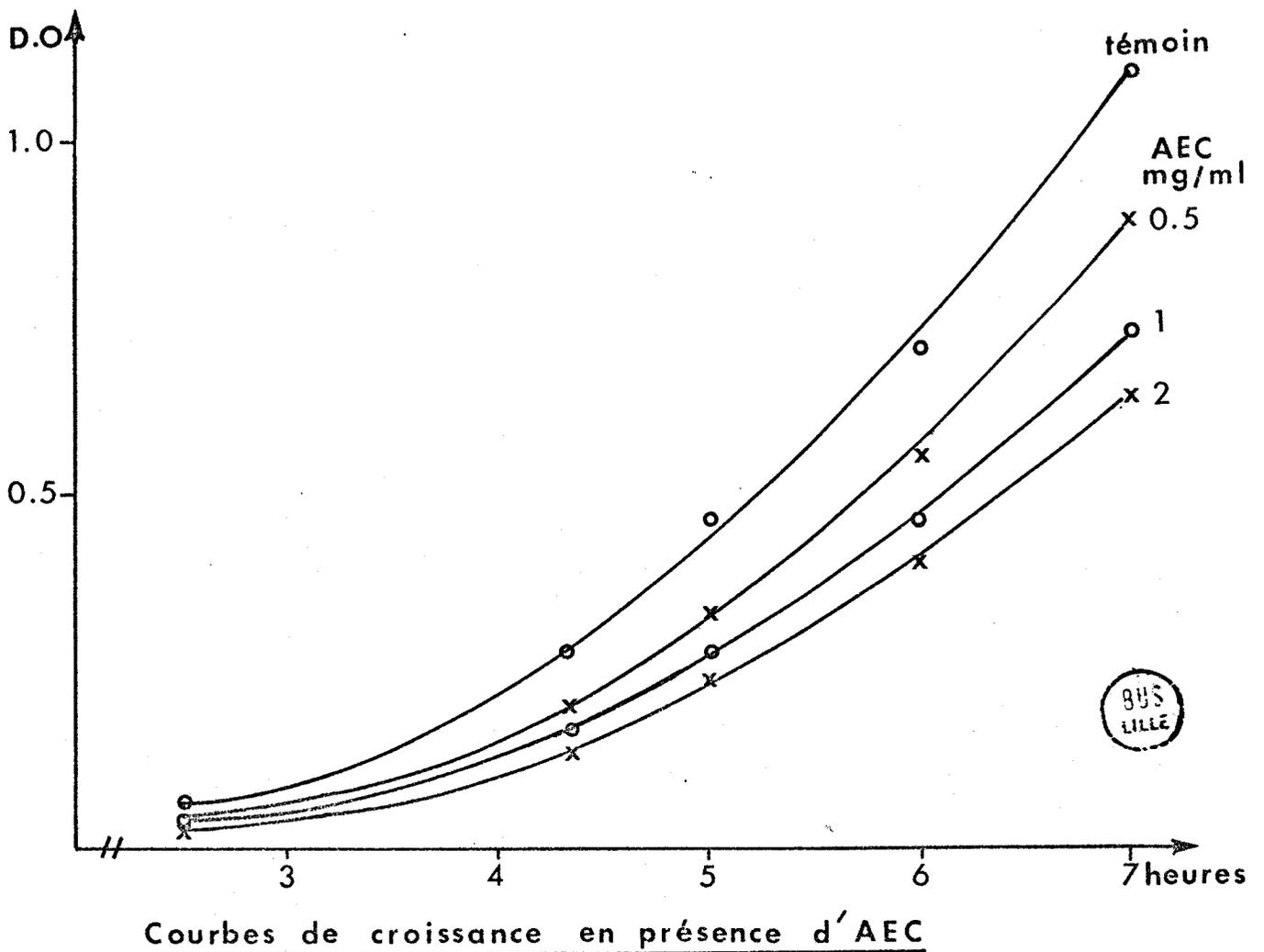
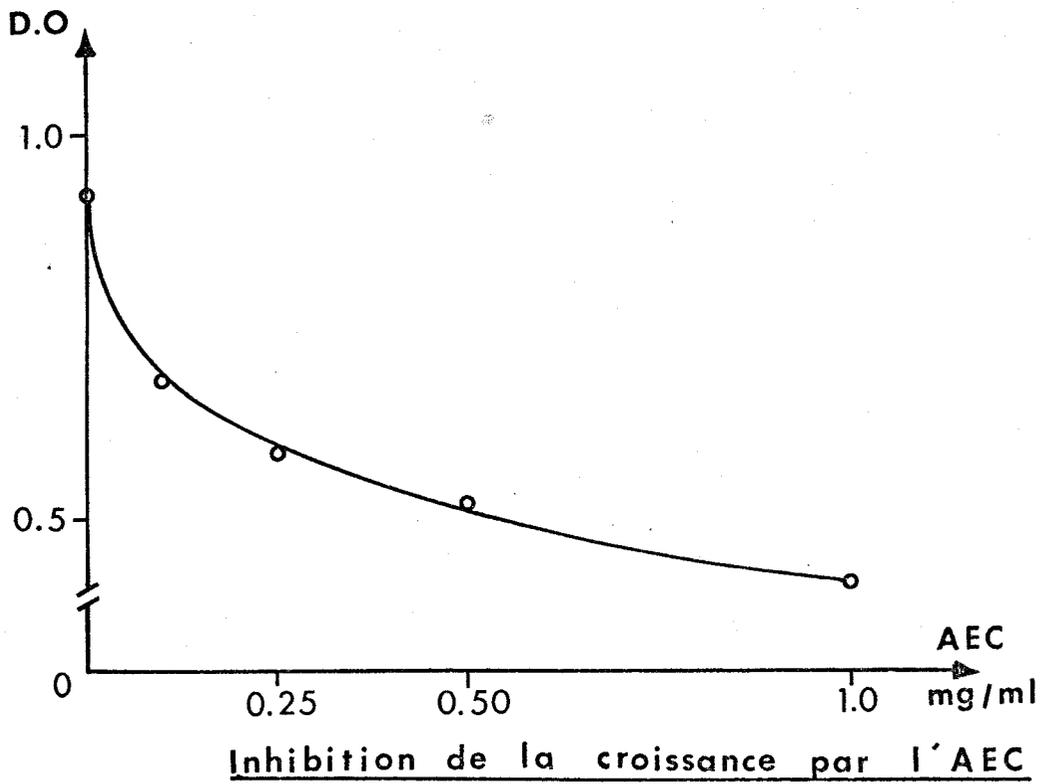
E. coli est donc très sensible à l'AEC et l'inhibition est totale dès 0,125 mg/ml d'AEC.

C) Etude sur S. marcescens :

Le même type d'essai réalisé sur S. marcescens a donné les résultats suivants :

AEC mg/ml	0	0,10	0,25	0,50	1
D.O	0,92	0,68	0,59	0,52	0,42
pourcentage d'inhibition	0	26,3	34,7	43,4	54,3

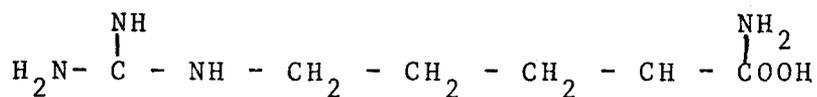
S. marcescens est donc plus résistant qu'E. coli et même à 1 mg d'AEC par ml de culture, l'inhibition obtenue n'est que de 54,3 %. Pourtant l'inhibition est d'autant plus forte que la concentration en inhibiteur est élevée et la courbe obtenue (page suivante) le montre bien. Nous avons donc observé la croissance de S. marcescens en présence de concentrations d'AEC allant de 0 (témoin)



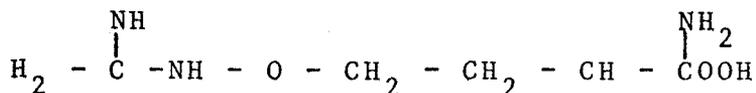
à 2 mg/ml , en fonction du temps et nous avons pu observer (figure page précédente) que les courbes obtenues étaient d'autant plus limitées en D.O pour un même temps de culture que la concentration en analogue était élevée. L'AEC n'inhibe pas totalement la croissance chez *S.marcescens* mais la retarde. Quelques essais complémentaires ont également montré qu'à des concentrations de 5 et 10 mg/ml la croissance était partiellement inhibée et pouvait atteindre une D.O de 1,50 après 48 heures d'incubation.

2.2.3. INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR LA L-CANAVANINE :

La L-canavanine est plutôt un analogue de la L-arginine comme le montre l'examen comparé de leurs formules:



Arginine



Canavanine

Elle s'incorpore dans les protéines qu'elle rend létales, à la place de l'arginine (88,89) .

La L- canavanine est surtout l'analogue de la lysine pour les mécanismes de transport en entrant en compétition avec celle-ci au niveau perméasique (cf. plus loin).

Les essais de cultures en tubes ont montré une grande sensibilité d'*E. coli* K 10 à la L- canavanine, confirmant ainsi les essais de Schwartz (101) sur *E. coli* W, la concentration

minimale inhibitrice étant de 10 µg/ml. Chez *S. marcescens* la croissance est très peu perturbée par la canavanine, même à la concentration de 3 mg/ml (cf. 2.3). Cette propriété a été utilisée lors des essais de compétition entre acides aminés et inhibiteurs pour les sites perméasiques en comparant l'inhibition de la croissance en résultant.

2.2.4 INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR LA L- LYSINE :

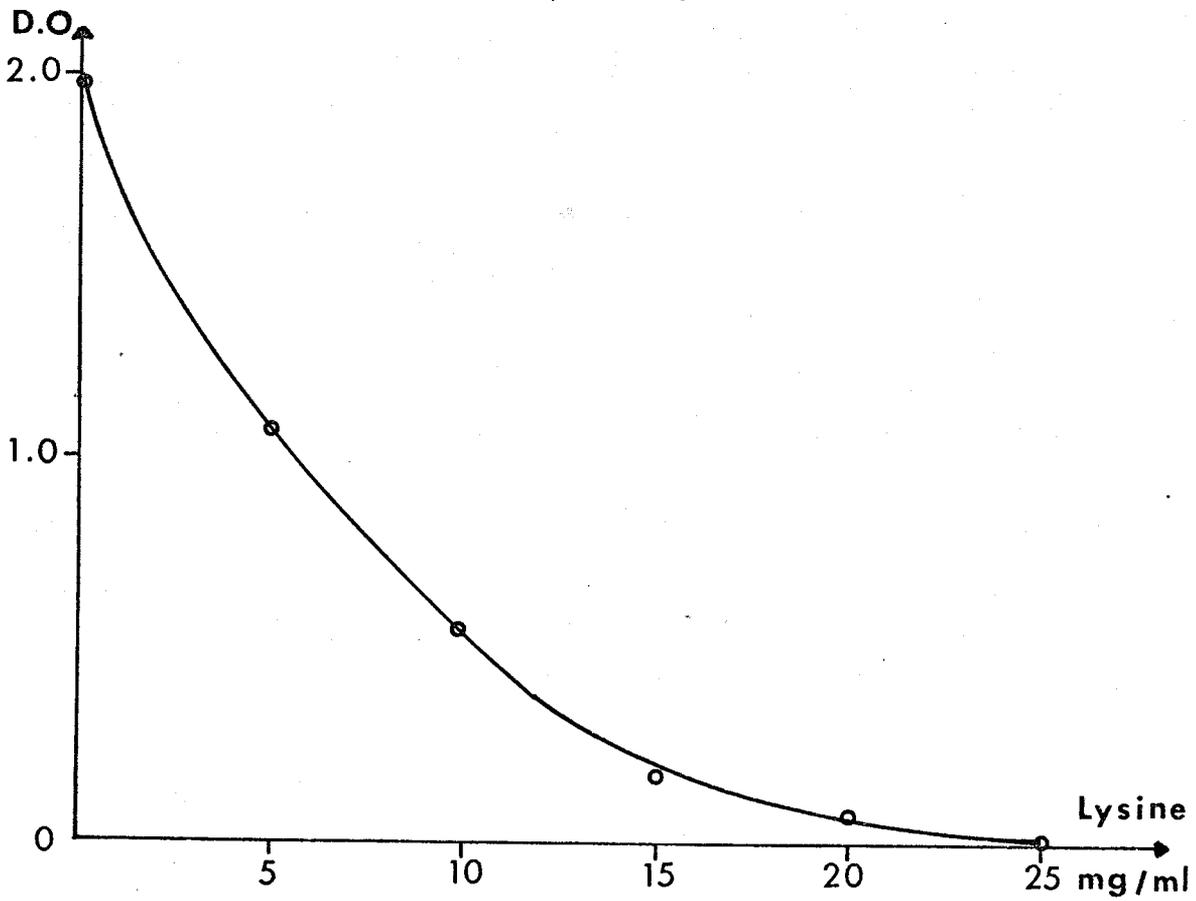
Nous avons constaté que la présence d'un excès de L- lysine dans les milieux de culture retarde considérablement la croissance chez *E. coli* et même chez *S. marcescens*. Cette observation a été faite par divers auteurs, (dans le cas général (68) , chez Rhodopseudomonas (7) , chez Pseudomonas capsulatus et d'autres genres (20) .

Cependant à forte concentration les amino-acides et leurs analogues structuraux pénètrent, en plus des mécanismes de transport actif, par simple diffusion (39) et les mécanismes de régulation sont alors perturbés et se traduisent par une inhibition de la croissance (7) .

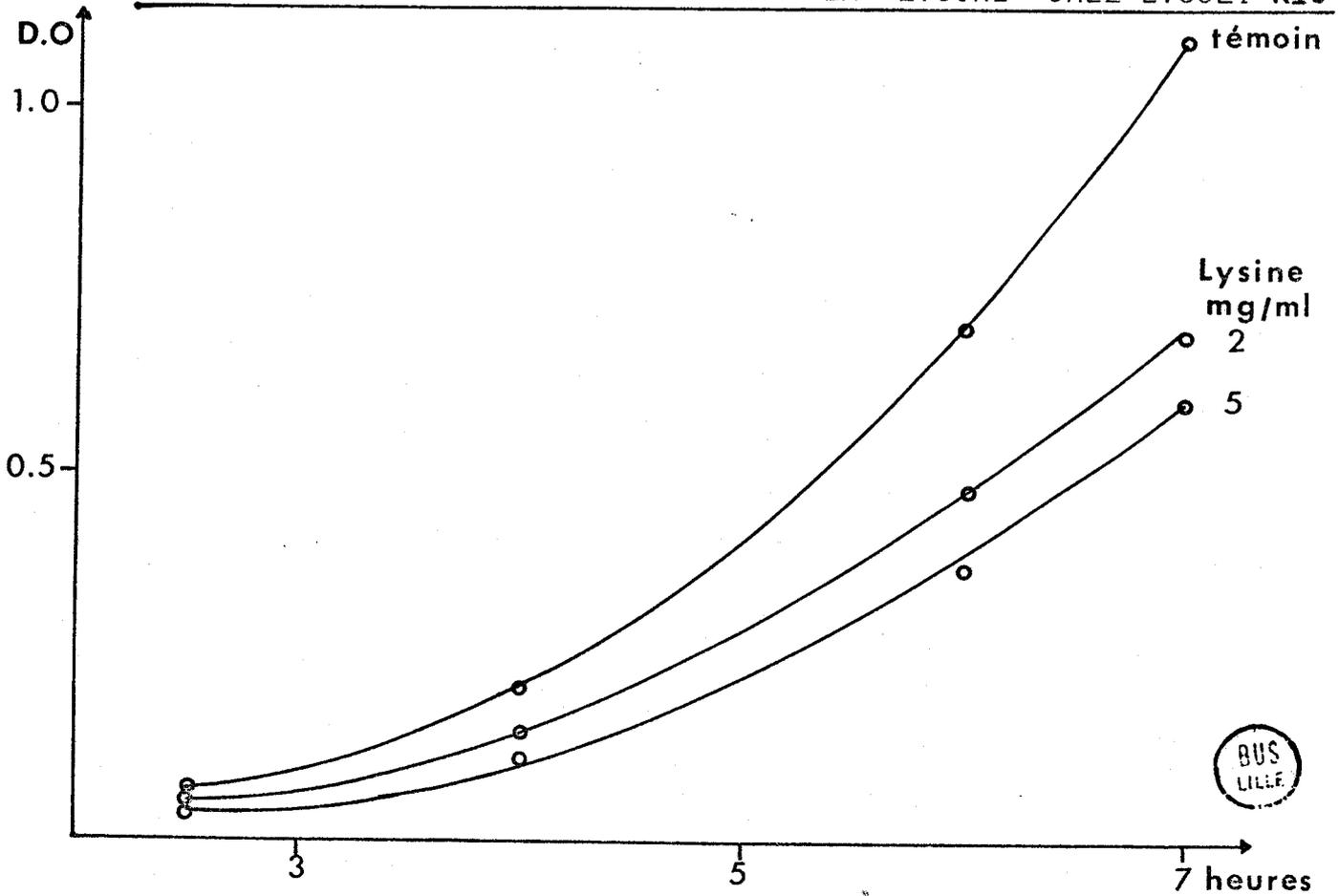
A) Etude sur E. coli K 10 :

Après 15 heures d'incubation, les essais de cultures (cf. 2.3.2) ont donné les résultats suivants :

L- lysine mg/ml	0	2	5	10	15	20	25
D.O	1,98	1,51	1,07	0,56	0,18	0,06	0,02
Pourcentage d'inhibition	0	23,7	45,9	71,7	90,9	96,9	98,9



INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR LA LYSINE CHEZ E. COLI K10



COURBES DE CROISSANCE EN PRÉSENCE DE LYSINE (S. MARCESCENS).

La croissance d'E. coli K 10 subit donc une inhibition assez sensible en présence de L- lysine dans le milieu de culture ; celle-ci est assez peu perturbée jusqu'à 5 mg/ml, puis celle-ci est ensuite assez fortement inhibée. Sur milieu gelosé cette résistance est beaucoup plus limitée et dès 5 mg/ml de L- lysine la croissance est très ralentie. (page précédente)

B) Etude sur S. marcescens :

La première série d'études entreprise sur S. marcescens en tubes à essais n'a pas donné de résultat lisible par suite de cultures très denses dans tous les tubes (mêmes conditions expérimentales que pour E. coli), après 18 heures d'incubation, même à 25 mg/ml de lysine.

L'inhibition de la croissance a pu être mise en évidence seulement en suivant l'évolution de cultures en fioles d'erlenmeyer, en présence de 2 et 5 mg/ml de L- lysine :

Lysine	2h30	4h	5h	6h	7h
Témoin	0,06	0,21	0,48	0,70	1,10
2 mg/ml	0,05	0,14	0,35	0,48	0,63
5 mg/ml	0,04	0,12	0,22	0,37	0,60

Inhibition de la croissance par la lysine

Les courbes de croissance obtenues (page précédente) rappellent celles rencontrées avec l'AEC : la L- lysine retarde la croissance et ceci d'autant plus que sa concentration est élevée mais l'inhibition reste limitée, même à de très fortes concentrations et se trouve annulée après quelques heures supplémentaires de croissance.

Conclusion : E. coli est très sensible à de faibles concentrations d'analogues structuraux de la L- lysine et à de fortes concentrations de L- lysine elle même alors que S. marcescens voit sa croissance beaucoup moins perturbée même à de très fortes concentrations.

Cette résistance de S. marcescens pouvait être due à une faible perméabilité vis à vis de la lysine et de ses analogues donc à une déficience de son système perméasique par rapport à celui d'E. coli, ce que nous avons étudié.

2.3. ETUDE DE LA PERMEABILITE CELLULAIRE :

2.3.1. GENERALITES :

Les mécanismes régissant la perméabilité aux acides aminés chez les bactéries sont assez complexes et restent encore assez mal connus. Ce furent Cohen et Rickenberg qui mirent en évidence les premiers des mécanismes intervenant dans la perméabilité des cellules, en particulier au niveau de leur capacité de concentrer un substrat donné (19) même si celui-ci se trouve en très faible concentration dans le milieu de culture et ceci de façon réversible (78) . Schwartz et al (101) mirent ensuite en évidence un système spécifique de concentration pour l'arginine, l'ornithine et la lysine et un autre système pour l'alanine et le glycolle. Ces systèmes concernent le transport des amino-acides à travers la membrane bactérienne et furent appelés perméases par Cohen et Monod (17) . Ces systèmes peuvent être perturbés et devenir déficients par mutagenèse et l'on obtient alors des bactéries dites à transport négatif (Tr^-) ou

déficient pour un ou plusieurs amino-acides selon le système qui est perturbé (13,58) : ces cellules sont alors résistantes aux analogues structuraux de ces amino-acides (58,101).

Plusieurs systèmes de transport ont pu être décrits (84) en particulier un système commun aux amino-acides basiques (13, 15, 62, 78, 83, 92, 93).

La mise au point de préparations de membranes cytoplasmiques (37) et plus particulièrement obtenues après une série de chocs osmotiques et capables de fixer les amino-acides de façon spécifique (83,125), ont permis de mettre en évidence l'existence de systèmes spécifiques de transport et de proposer un modèle (82). Chez E. coli le système de transport commun à la lysine, l'arginine et l'ornithine, le système LAO, serait complété par des systèmes plus spécifiques, en particulier par une perméase spécifique de la lysine et une autre spécifique de l'arginine (92). Celis et al (13) ont démontré que le système commun LAO aurait une forte affinité pour les trois amino-acides qu'il transporte alors que les systèmes spécifiques auraient une faible affinité pour leur substrat et que les deux systèmes pouvaient être portés par une même protéine (93). Seul le système commun LAO peut être bloqué par des compétiteurs ou des analogues (13) alors que les systèmes spécifiques ne subiraient pas d'inhibition. Un simple couplage d'énergie permettrait à l'un des systèmes de fonctionner sur la même protéine (13) et si l'un des systèmes n'est plus fonctionnel, par mutation par exemple, seul l'autre système fonctionne : ainsi la perte du système LAO entraînerait la présence d'une seule perméase spécifique à faible affinité mais insensible à la canavanine ce qui rendrait la souche

résistante. Une lésion au niveau du gène responsable de ce couplage pourrait aussi expliquer la résistance à la canavanine et aux autres analogues structuraux de la lysine.

Les systèmes perméasiques fonctionnent selon un modèle décrit par Cohen et Monod (17) repris par Penrose en 1970 et la pénétration d'un substrat se ferait en trois étapes (82) : fixation réversible du substrat sur une macromolécule spécifique, passage du complexe formé à travers la barrière osmotique de la cellule et son couplage au métabolisme énergétique (irréversible) (78) .

2.3.2. PRESENTATION DE L'ETUDE EFFECTUEE :

Nous avons entrepris l'étude de la perméabilité des cellules chez *S. marcescens*, par rapport à celle d'*E. coli*, vis à vis de la L- lysine, de la L- arginine et de l'acide L- aspartique, puis nous avons vérifié par ce moyen la voie de biosynthèse de la lysine chez *S. marcescens* après incorporation d'acide aspartique radioactif dans les cellules et détection de la lysine radioactive synthétisée, par chromatographie et passage au spectromètre à scintillation.

2.3.3. PERMEABILITE A LA L- LYSINE :

L'étude cinétique de la perméabilité concerne en fait la rétention ("uptake") de cet amino-acide par les cellules en fonction du temps. 10 ml de culture à D.O = 1 sont mis en présence de 0,1 ml de solution de lysine marquée à 20 Ci/ml et de 1 ml de solution de lysine non radioactive à 40 µg/ml. La technique standard est celle décrite au paragraphe 1.2.2. L'étude cinétique a porté sur *S. marcescens* et *E. coli* K 10 dans les mêmes

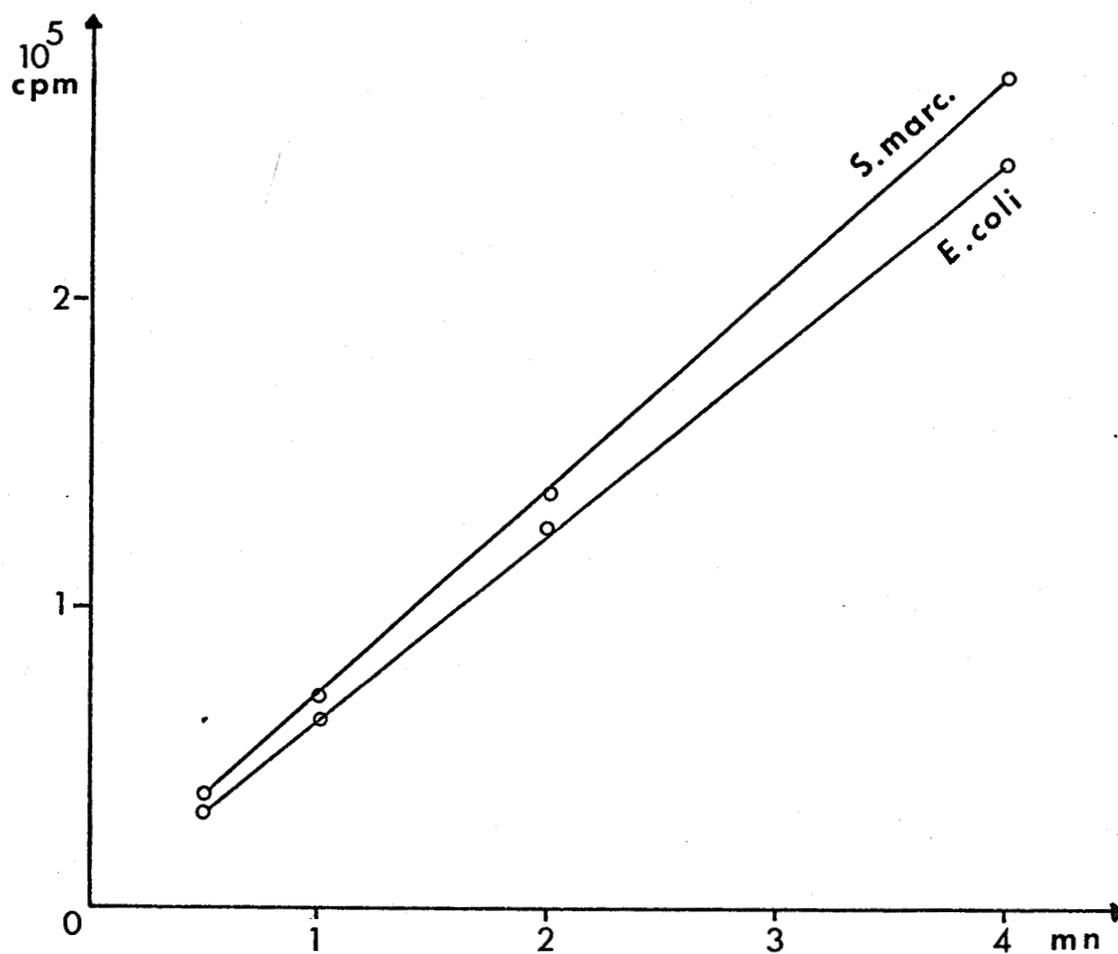
conditions. Les courbes d'incorporation obtenues sont très similaires et montrent que la pénétration de l'acide-amino est régulière et très progressive (fig page suivante).

Cependant si la concentration en L-lysine du milieu d'incubation augmente il est possible de remarquer qu'il s'établit pour chaque concentration un équilibre entre la concentration interne des cellules et la concentration du milieu extérieur en lysine (tableau page suivante).

Sur le tableau, les taux de rétention sont donnés en $\mu\text{M/g}$ de poids sec de cellules après des temps d'incorporation de 1 et 2 minutes en tenant compte de la dilution de la lysine radioactive par rapport à la lysine non marquée. L'équilibre est très vite atteint et il est stable, mais fonction de la concentration en lysine du milieu ambiant. Il est intéressant de remarquer que la concentration interne des cellules devient très élevée et qu'elle est alors inhibitrice pour *E. coli* alors qu'elle ne l'est pratiquement pas chez *S. marcescens* ce qui nous permet d'entrevoir que la résistance à de telles concentrations et aux inhibiteurs se situerait au niveau des mécanismes de régulation des voies métaboliques.

2.3.4. PERMEABILITE A LA L- ARGININE :

En utilisant le même protocole expérimental que celui utilisé pour la lysine, l'étude cinétique permet également de constater un parallélisme très net entre les courbes obtenues pour *E. coli* et pour *S. marcescens* (fig page 64). Les D.O des cultures étant les mêmes au départ et très proches de 1, la perméabilité des deux souches est donc semblable, la pénétration étant régulière



Perméabilité à la lysine

Concentration en lysine (mM)	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$	0,2	2	20
Temps d'incorporation						
1 mn <i>S. marcescens</i>	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$	0,32	3,25	30,67	299,5
2 mn	$10,1 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	0,35	3,02	29,23	297,4
1 mn <i>E. coli</i>	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	0,14	1,17	13,40	113,9
2 mn	$9,1 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	0,14	1,20	13,13	118,9

Perméabilité à la lysine en $\mu\text{M/g}$ de poids sec en fonction de la concentration du milieu d'incubation.



et progressive dans l'intervalle de temps observé. Cette constatation sera utile lors de l'examen du système de résistance de *S. marcescens* à la canavanine.

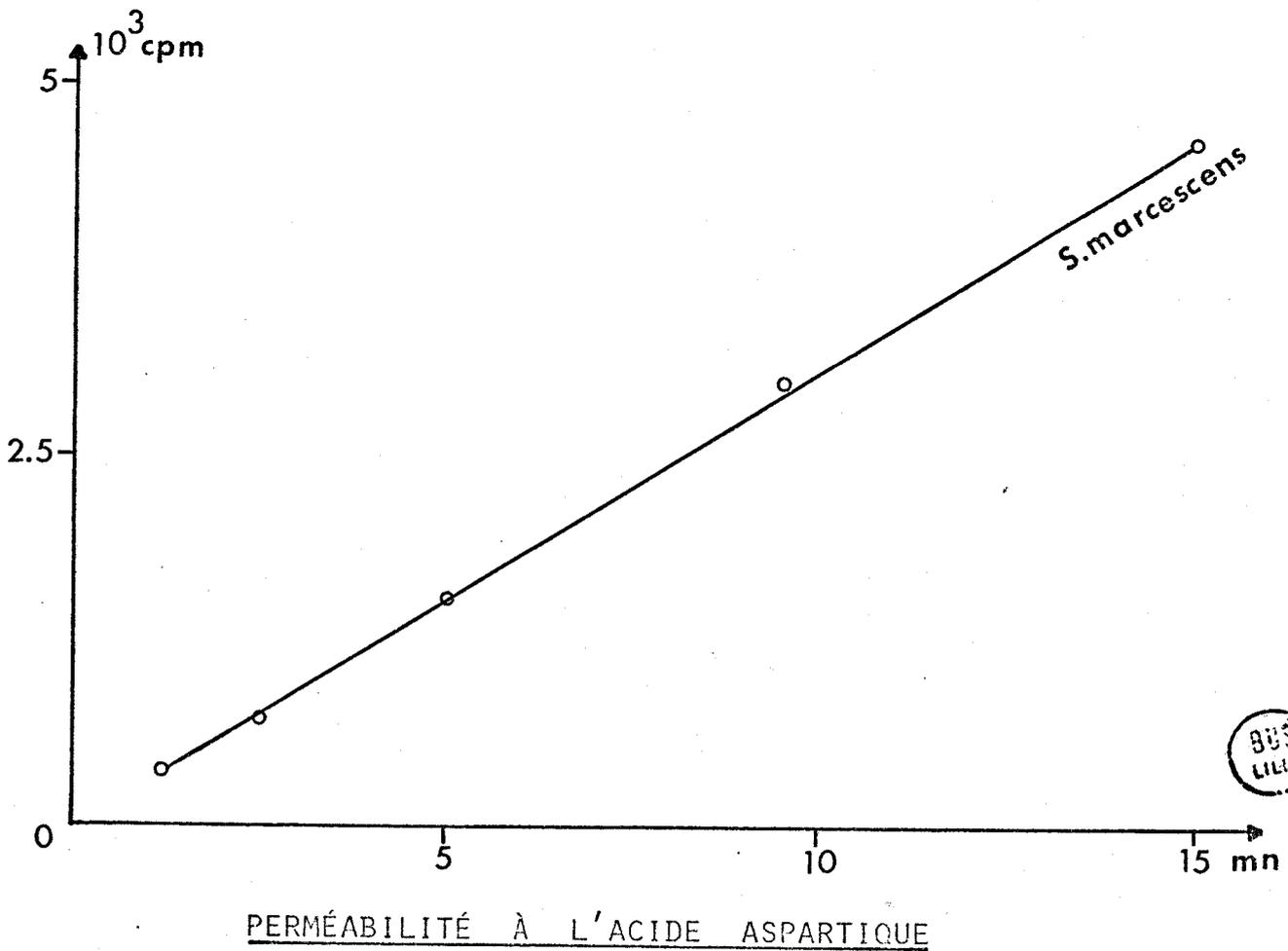
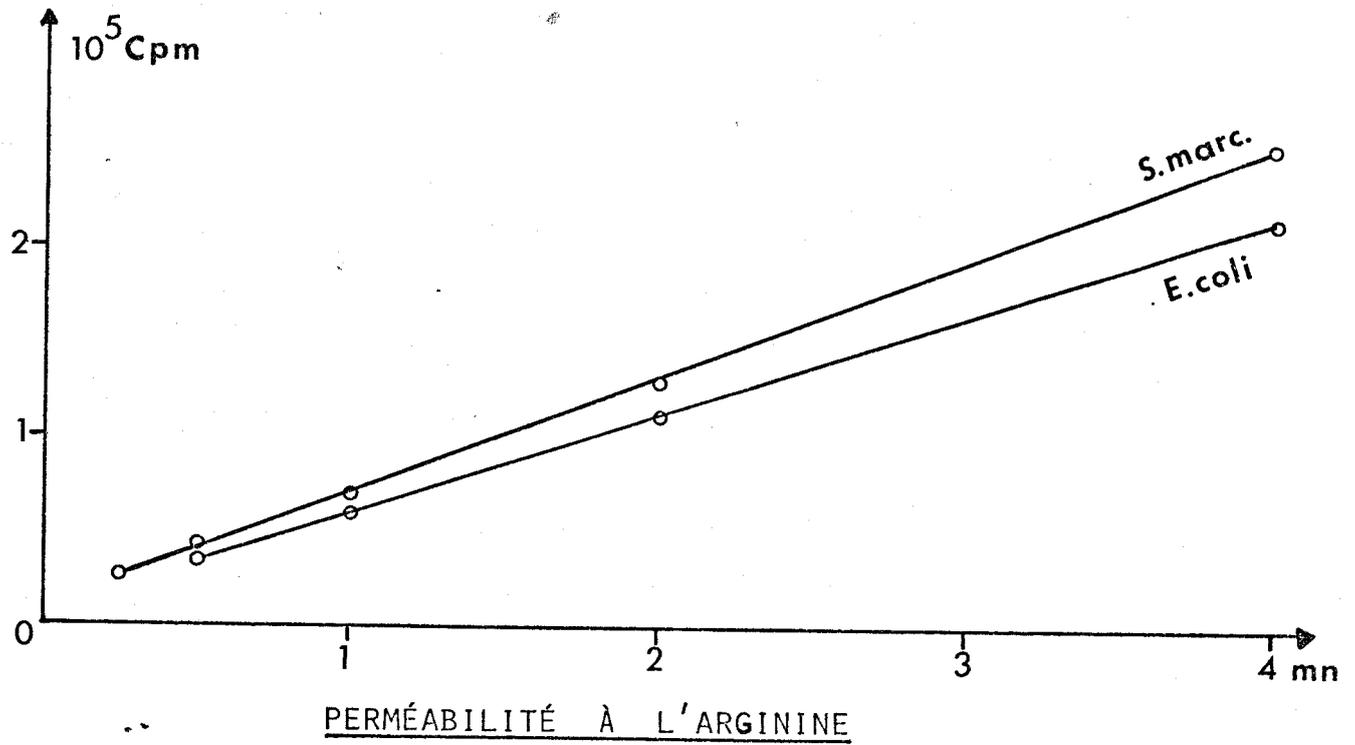
2.3.5. PERMEABILITE A L'ACIDE L- ASPARTIQUE :

Cet essai a été réalisé sur *S. marcescens* en particulier afin d'envisager la vérification de la voie de biosynthèse de la lysine après incorporation d'aspartate radioactif. L'échantillon de 20 ml de culture à D.O = 0,40 est repris dans 20 ml de milieu MSB₁ complété d'1 ml de solution d'aspartate à 2 mg/ml et de 10 µl de solution d'aspartate radioactive soit $\frac{14 - \text{ASP}}{\text{ASP}} = \frac{1}{100}$.

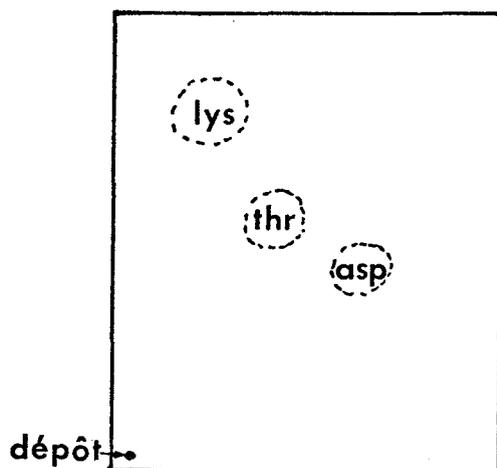
L'étude cinétique est réalisée comme les précédentes et la courbe d'incorporation (page suivante) obtenue montre que les cellules de *S. marcescens* sont perméables à l'acide aspartique et que l'incorporation est régulière, permettant d'envisager l'étude de son devenir dans le métabolisme.

2.3.6. VERIFICATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA LYSINE CHEZ S. MARCESCENS :

Les voies métaboliques n'ont pas été prouvées chez *S. marcescens* mais sont supposées être les mêmes chez toutes les Enterobactéries (16), aussi le but de cette étude était de vérifier que chez *S. marcescens* la biosynthèse de la lysine passait, comme chez *E. coli*, par l'acide aspartique afin de pouvoir ultérieurement comparer un aspect des mécanismes de régulation des biosynthèses, en particulier au niveau de l'aspartokinase, avec celui d'*E. coli*.

BUS
LILLE

Après 15 secondes d'incorporation d'aspartate dans les mêmes conditions qu'au paragraphe précédent, on réalise le protocole expérimental décrit au paragraphe 1.2.3. La comparaison entre le chromatogramme témoin où figure l'acide L-aspartique, la L-lysine et la L-thréonine, et le chromatogramme essai, permet de constater après découpage du chromatogramme en carrés de taille identique et leur incorporation dans les flacons échantillonneurs pour passage sur spectromètre à scintillation, un très net marquage radioactif de la thréonine et de la lysine, prouvant ainsi l'analogie des voies de biosynthèse chez ces deux espèces.



Aspect du
chromatogramme obtenu.

2.4. ETUDE DU SYSTEME DE TRANSPORT DE LA LYSINE ET DE L'ARGININE

CHEZ S. MARCESCENS :

Des essais de compétition entre divers amino acides et analogues nous ont permis de tirer quelques conclusions intéressantes quant au système perméasique intervenant chez *S. marcescens* par analogie avec celui, mieux connu, du système LAO d'*E. coli* (92).

2.4.1. GENERALITES :

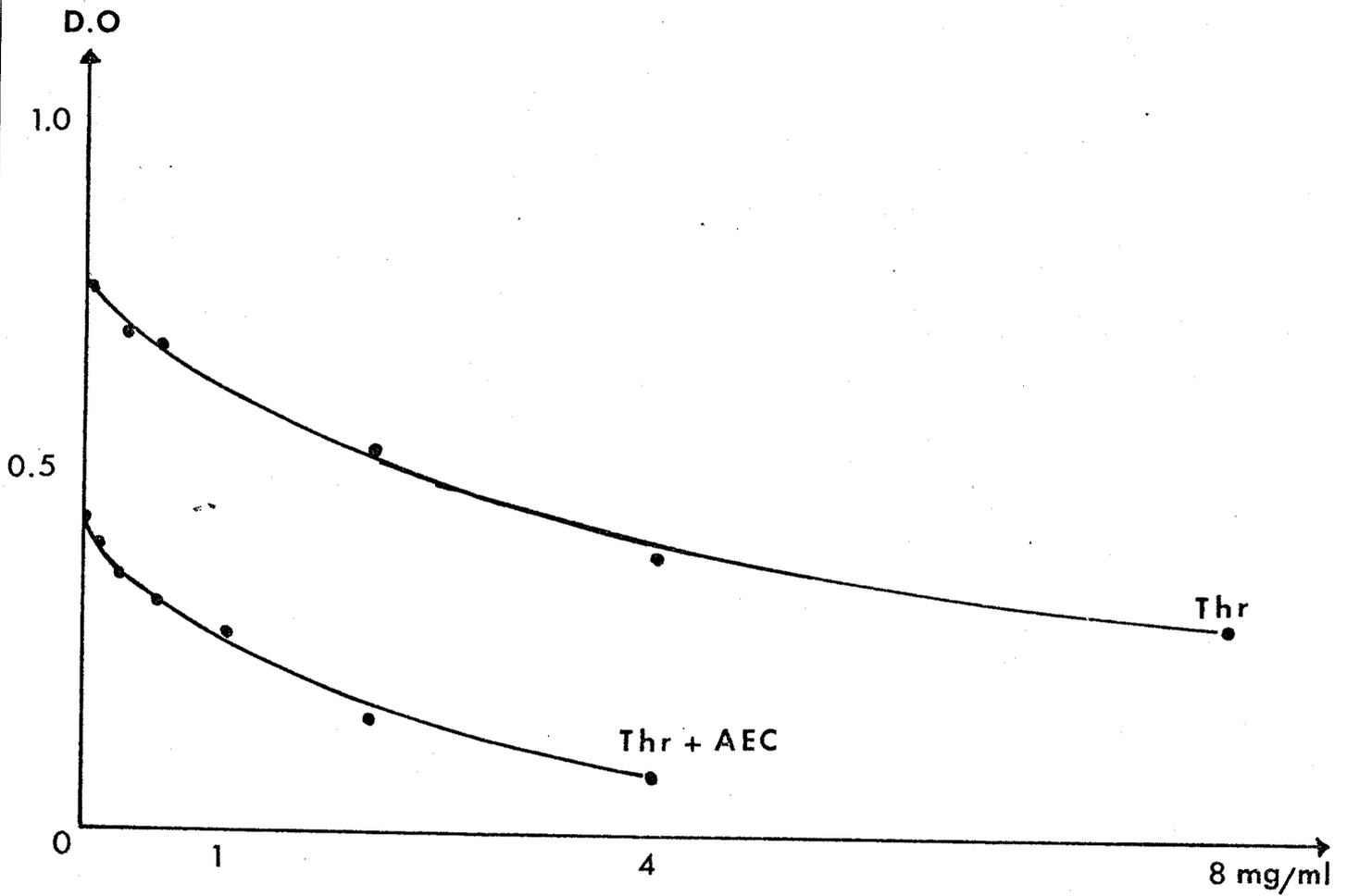
La revue bibliographique du paragraphe 2.2.1 nous a permis de dégager un système commun, chez *E.coli* et chez *Pseudomonas*, de transport des amino acides basiques et en particulier un système LAO (Lysine-Arginine-Ornithine) complété par des systèmes spécifiques à la lysine et à l'arginine. Ces derniers systèmes semblent constitutifs et non inductibles (13,92) alors que le système commun est inductible, en particulier par la lysine (40,72) mais aussi répressible par celle-ci (13) et pouvant être inhibée par des compétiteurs ou des analogues structuraux (13).

La lysine et l'arginine entrent en compétition avec la canavanine qui n'inhibe que modestement leur transport; par contre la lysine inhibe le passage de l'arginine (125). L'AEC interviendrait sur le système commun, de même que la canavanine qui inhiberait également ce système LAO (92,93).

Sur *S.marcescens* nous avons testé ces différentes possibilités par un travail d'approche de son système perméasique, en étudiant notamment les possibilités de compétition entre amino acides et analogues, et les perturbations en résultant au niveau de la croissance.

2.4.2. RECHERCHE D'UNE INTERACTION ENTRE LA THREONINE ET L'AEC :

Chez *Brevibacterium flavum*, l'AEC lorsqu'elle est seule dans le milieu de culture est un faible inhibiteur de la croissance, alors qu'à 1 mg/ml, *B.subtilis* et *E.coli* sont inhibés (99). En présence de 3 mg/ml d'AEC l'inhibition de la croissance n'était que de 50%. L'addition de L-thréonine augmentait considérablement l'inhibition



Inhibition de la croissance par la thréonine
et l'AEC.



et permettait dans ce cas la recherche de clones mutants résistants. Nous avons recherché un phénomène semblable chez *S.marcescens* en effectuant des cultures en tubes (milieu MSB₁) contenant ou non 1 mg/ ml d'AEC, en partant d'un même inoculum et en ajoutant dans le milieu de culture différentes concentrations de L-thréonine. La courbe tracée à partir des différentes D.O obtenues (voir page suivante) nous permet de constater que l'inhibition en présence de thréonine avec l'AEC reste faible tout en étant fonction de la concentration en thréonine du milieu d'incubation. Cette inhibition n'est pas très supérieure à celle rencontrée en présence d'AEC seule .Il n'y a pas ici d'effet additif entre la thréonine et l'AEC et ce résultat peut être comparé plutôt à celui d'*E.coli*, qui est sensible séparément à l'AEC et à de fortes concentrations de thréonine.

2.4.3. RECHERCHE D'UNE COMPETITION ENTRE LA LYSINE ET L'AEC :

Chez *E.coli*, l'AEC est un analogue structural pour les mécanismes de transport de l'arginine et de la lysine (92) en pénétrant dans les cellules par le système LAO et en bloquant l'aspartokinase (116). Une compétition entre l'AEC et la lysine a pu être mise en évidence chez *E.coli* mais aussi chez *S.marcescens*.

A) Etude sur *E.coli* K10 :

Nous avons constaté rapidement une compétition entre la lysine et l'AEC chez *E.coli* en réalisant des microcultures, en présence d'AEC et de lysine à des concentrations différentes, et en observant ou non l'apparition d'une culture après 18 heures d'incubation à 37° C en bain-marie agité. Les concentrations, sur le tableau

suivant sont indiquées en $\mu\text{g/ml}$:

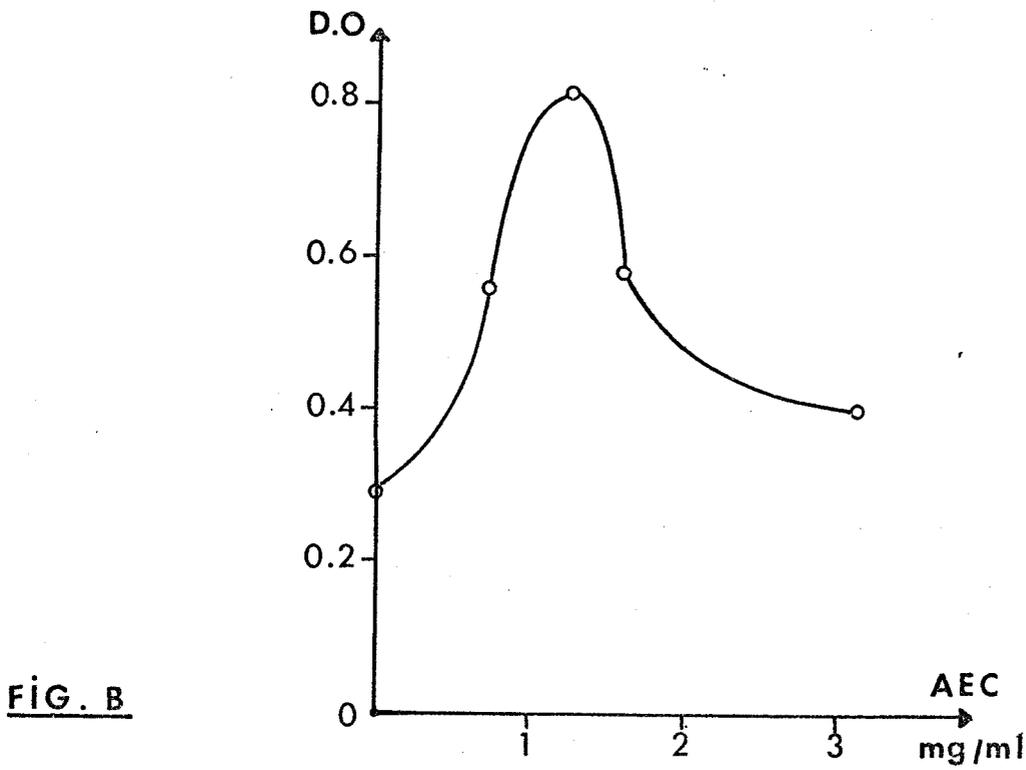
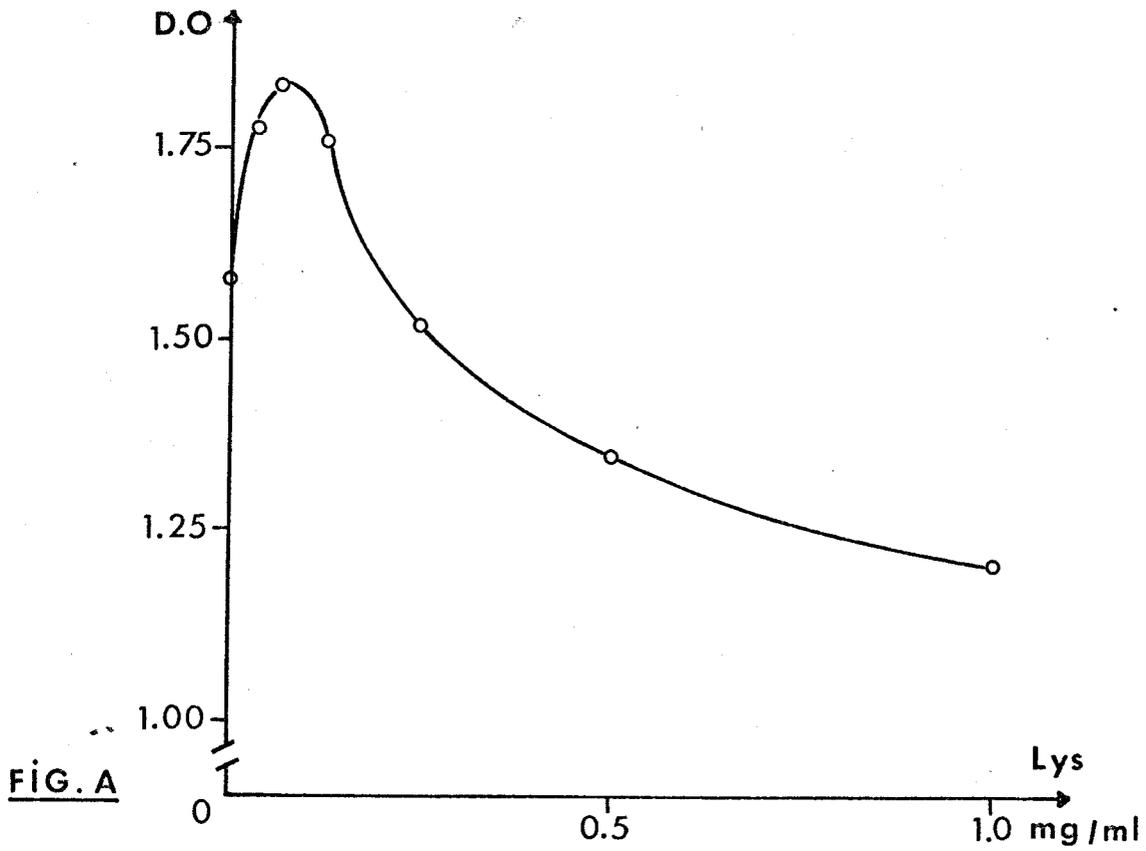
AEC	LYSINE	CROISSANCE
10	0	+
30	0	+
50	0	-
50	50	+
100	50	+
50	100	+

L'inhibition de la croissance constatée à $50 \mu\text{g/ml}$ d'AEC est annulée par l'addition de $50 \mu\text{g/ml}$ de lysine, et même à cette concentration, $100 \mu\text{g/ml}$ d'AEC ne sont plus inhibiteurs.

L'occupation des sites de transport par la lysine empêcherait l'AEC de pénétrer ou celle-ci ne pénétrerait qu'en infime quantité, non inhibitrice.

B) Etude sur S.marcescens :

Le protocole expérimental observé avec S.marcescens est le même que pour E.coli mais cette fois la D.O des cultures est mesurée après 10 heures d'incubation en présence de 1 mg/ml d'AEC et de différentes concentrations de lysine. La courbe obtenue avec ces différentes valeurs (voir page suivante) est surprenante et différente de celle obtenue pour la thréonine, la partie gauche de la courbe étant en forme de cloche. Ceci revient à dire que sans lysine la D.O est de 1,58 et que celle-ci augmente si l'on ajoute un peu de lysine, donc que l'inhibition diminue : dans ce cas la lysine empêche une partie de l'AEC de pénétrer et d'être



inhibiteur; puis la concentration de lysine augmentant, jusqu'à 0,1 mg/ml, les deux produits agissent comme inhibiteurs et la D.O diminue régulièrement. On peut en déduire que la lysine pénètre mieux que l'AEC et qu'elle est plus compétitive.

Si l'on fait l'expérience contraire, en réalisant des cultures en présence de 0,5 mg/ml de lysine et de diverses concentrations d'AEC, il est possible d'obtenir le même genre de courbe : l'addition d'un peu d'AEC stimule la croissance (jusqu'à 1,25 mg/ml) puis l'inhibition se fait ressentir très vite (fig.B page précédente).

2.4.4. INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR LA CANAVANINE EN PRESENCE

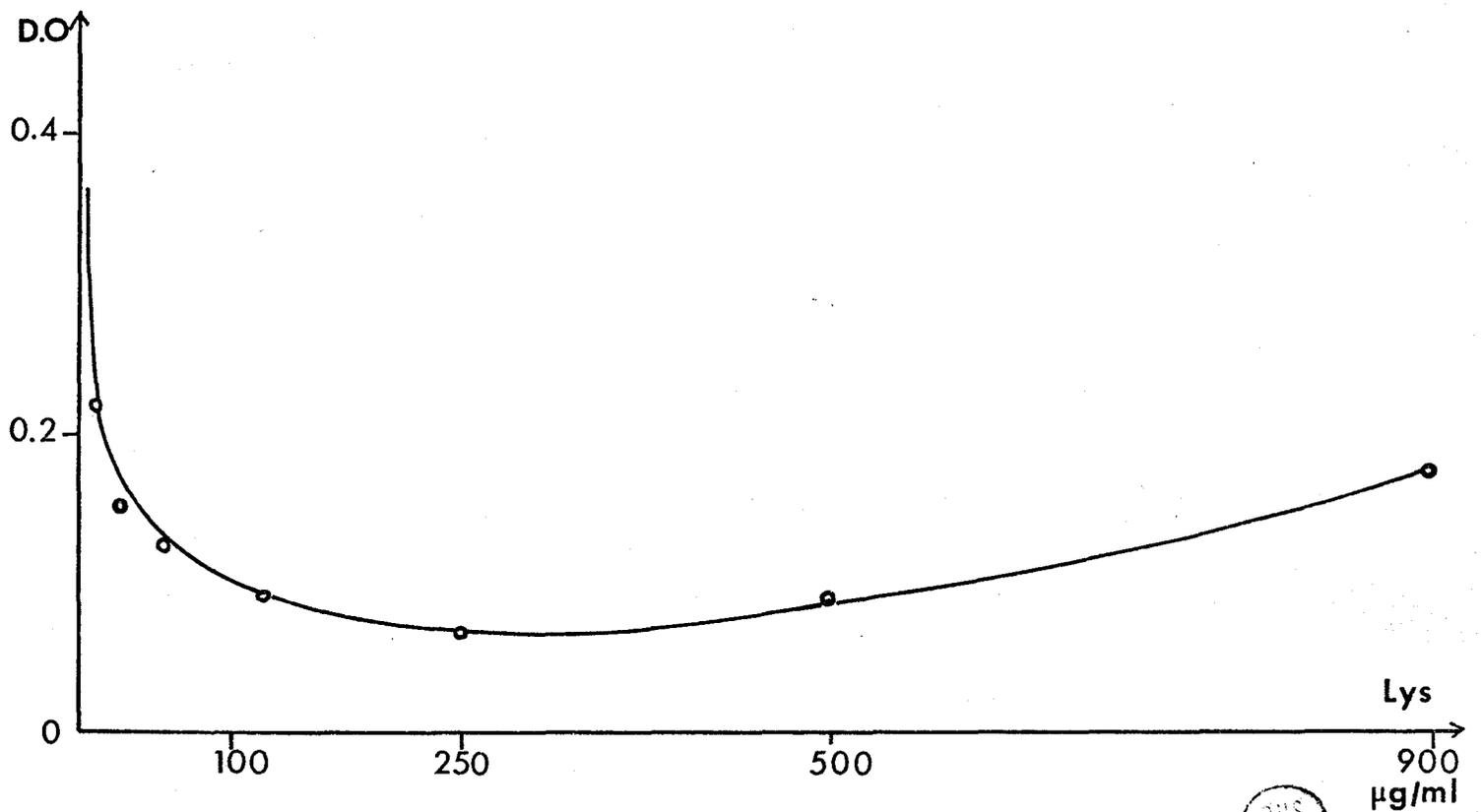
DE LYSINE :

Chez E.coli la canavanine intervient au niveau du transport de l'arginine et de la lysine (78) et se trouve être inhibitrice de la croissance à très faible concentration (5-10 µg/ml) alors que S.marcescens résiste même à 3 mg/ml. Une compétition entre la canavanine et la lysine a été envisagée et a donné des résultats très intéressants. Des cultures en tubes sont réalisées, à partir d'un même inoculum, en milieu MSB₁ et en présence d'1 mg/ml de L-canavanine. Différentes concentrations de L-lysine sont ensuite réalisées dans les différents tubes. Les D.O des cultures sont mesurées après 18 heures d'incubation en bain-marie agité à 37°C et les résultats obtenus ont été transcrits sous forme de courbe (page suivante) : en absence de L-lysine la croissance est bonne et les cellules sont indifférentes à la canavanine alors qu'en ajoutant au milieu un peu de lysine, la D.O des cultures chute

Lysine μg/ml	0	15	30	60	125	250	500	900
% inhibition	0	89,5	93,3	94,2	95,2	97,0	95,7	91,6

Inhibition de la croissance par la lysine en présence
de canavanine (1 mg/ml).

S. marcescens



305
1112

brusquement et l'inhibition obtenue est importante même en présence de seulement 15 $\mu\text{g/ml}$ de L-lysine. Cette inhibition devient maximale pour 250 $\mu\text{g/ml}$ et s'atténue en présence d'une forte concentration de lysine. Ce résultat intéressant ne peut s'interpréter qu'en admettant que seule la canavanine n'est pas inhibitrice car ne pénétrant pas dans les cellules alors qu'en présence de lysine la canavanine est inhibitrice, donc a pu pénétrer à l'intérieur des cellules par le moyen d'une perméase qui aurait été induite par la présence de lysine. Dans ce dernier cas la canavanine pourrait utiliser le système de transport de la lysine pour pénétrer et il est aussi possible d'en conclure que la perméabilité à la lysine est induite chez *S.marcescens* comme chez *Pseudomonas* (62).

2.4.5. INTERFERENCES AVEC L'ARGININE:

Divers essais ont été réalisés afin de comparer chez *S.marcescens* l'influence de l'arginine sur le transport de la lysine. A partir d'inoculum identique, les D.O des cultures sont examinées après 18 heures d'incubation en bain-marie agité à 37°C en présence de lysine, de canavanine et d'arginine à diverses concentrations. Cette série d'essais peut être résumée sur un tableau (page suivante) où les concentrations en arginine, canavanine et AEC sont indiquées en mg/ml et les D.O mesurées comme d'habitude à 600 nm. Plusieurs conclusions se dégagent des résultats obtenus :

1- en présence de l'arginine seule la canavanine ne pénètre pas, donc l'arginine ne semble pas être inductrice de perméase qui

pourrait être utilisée par la canavanine.

Arginine	Canavanine	Lysine	D.O
0,1	0,5	0	2,18
0,5	1	0	1,56
0,5	2	0	2,05
0,5	3	0	2,10
0	1	0,5	0,07
0,5	1	0,5	2,20
0	3	0	2,15

2- l'arginine annule l'inhibition obtenue en présence de lysine et de canavanine et de ce fait pénètre dans la cellule par le même système de transport que la canavanine et que la lysine en étant compétitive par rapport à la canavanine. On peut donc conclure de ceci qu'il existe aussi chez Serratia un système de transport commun pour la lysine et l'arginine et que celui-ci est inductible par la lysine.

Conclusion:

Cette étude de la perméabilité et des mécanismes de transport de la lysine chez *S.marcescens* nous amène à tirer plusieurs conclusions, en particulier qu'il existe comme chez *E.coli* une perméase commune à l'arginine et à la lysine qui est inductible et qui permet également le transport de la canavanine et de l'AEC.

Les amino acides naturels sont plus compétitifs pour l'occupation des sites perméasiques que leurs analogues structuraux, et l'arginine ne semble pas induire le système commun.

L'AEC pénètre sans induction préalable par la lysine et pourrait

être inducteur ou pénétrer par la perméase spécifique à la lysine comme chez E.coli(40).

Cette insensibilité à l'AEC peut être comparée à celle obtenue chez des souches mutantes d'E.coli résistantes à l'AEC sachant que le mécanisme de résistance peut avoir deux causes : soit une dérégulation des voies de biosynthèse ou leur absence de rétro-inhibition ,ou une déficience au niveau des mécanismes de transport (39).

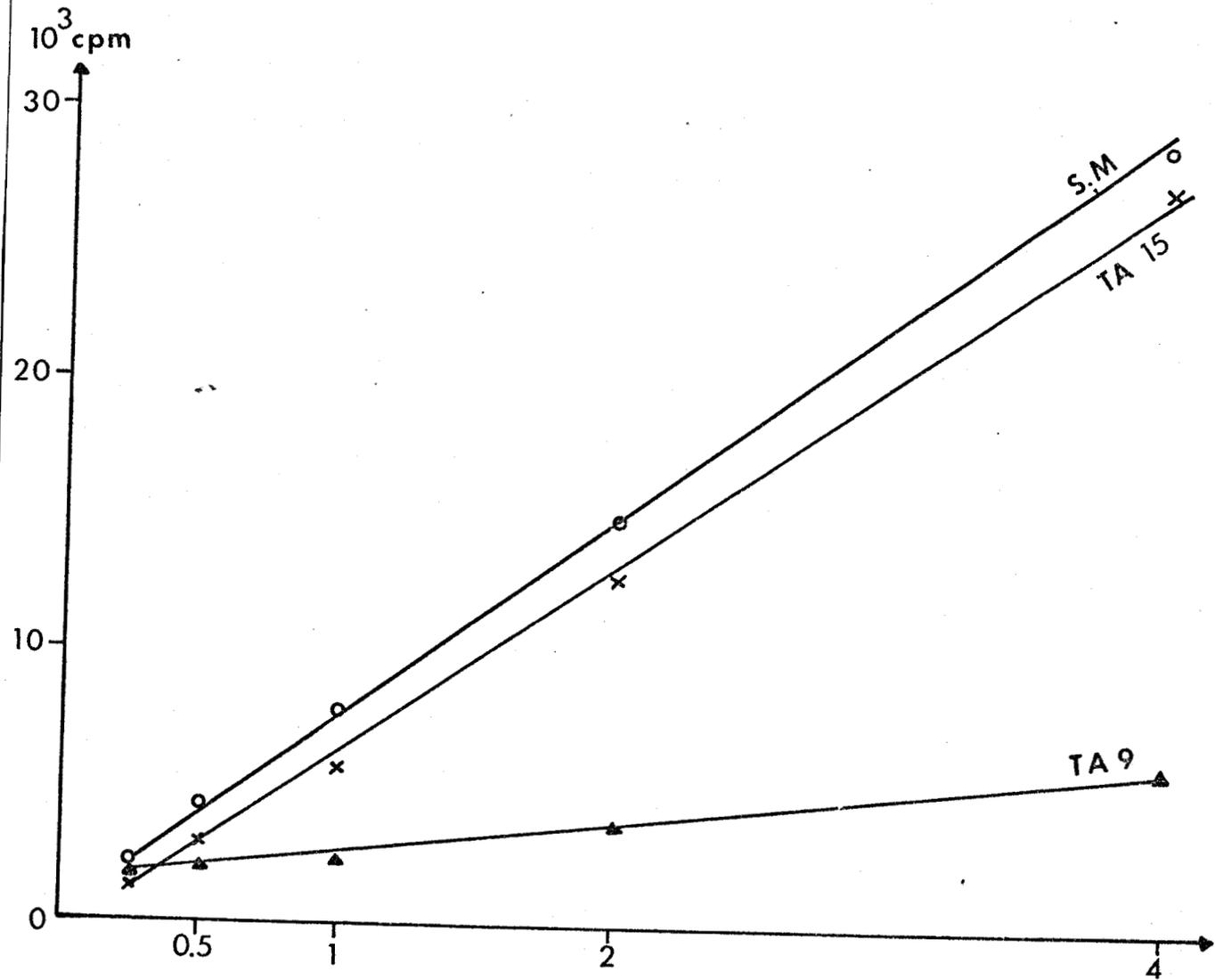
2.5. COMPARAISON ENTRE S. MARCESCENS ET DES SOUCHES MUTANTES

D'E.COLI RESISTANTES A L'AEC :

Cette comparaison a été menée sur deux plans : la perméabilité à l'arginine, qui est l'analogue perméasique de l'AEC et la comparaison au niveau de la régulation de l'enzyme principale de la chaîne de biosynthèse de la lysine et des amino acides dérivant de l'acide aspartique, à savoir l'aspartokinase.

2.5.1. PERMEABILITE A L'ARGININE :

En utilisant la technique déjà employée au paragraphe 2.3.4 et décrite au paragraphe 1.2.2, nous avons comparé dans des mêmes conditions expérimentales la perméabilité à l'arginine de notre souche de S.marcescens et de deux souches mutantes d'E.coli K10 appelées selon notre nomenclature TA9 et TA15 (cf.1.1.2 et 3.3.2) isolées au cours de la recherche de souches productrices de lysine. La D.O des cultures utilisées est de 0,8 à 1,0 et le protocole expérimental observé est celui décrit au paragraphe 2.3.4. Les cinétiques de perméabilité ainsi obtenues sont comparables et il est possible de remarquer la différence existant entre les



PERMEABILITE A L'ARGININE CHEZ S. MARCESCENS ET
LES SOUCHES TA 9 ET TA 15 D'E. COLI.



deux souches mutantes d'E.coli .L'une d'entre elles, la souche TA 15 a une perméabilité comparable à celle de S.marcescens (et donc de la souche sauvage K10, cf.2.3.4) tandis que la souche TA 9 montre une déficience au niveau de la perméabilité à l'arginine qui dans ce cas peut expliquer sa résistance à l'AEC(page 78). La souche TA 15 ayant une perméabilité normale, est résistante à l'AEC par la perte de certains mécanismes de régulation (répression ou rétro-inhibition) et plus particulièrement au niveau de l'aspartokinase qui est directement affectée par l'AEC chez la souche sauvage (88) ce qui à priori pouvait aussi être le cas chez S.marcescens.

2.5.2. INHIBITION DE L'ACTIVITE ASPARTOKINASIQUE :

Sur des lysats bactériens (cf.1.1.4) de S.marcescens et E.coli TA 15 nous avons effectué des dosages d'activité enzymatique sur l'aspartokinase , directement sur des extraits bruts . Les résultats se sont avérés être satisfaisants bien qu'une perte importante de l'activité soit observée après congélation des échantillons. Aussi pour des raisons de commodité nous avons exprimé les résultats en pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité totale sur un essai témoin non inhibé. L'inhibition est obtenue par addition dans le milieu réactionnel d'acide aminé de façon que sa concentration finale soit de 10^{-2} M. Ce même type d'essai a également été réalisé sur différents types de souches mutantes productrices de lysine (cf.3°partie). Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau suivant:

	K10	TA 15	S.marcescens
Témoin	100	100	100
Lysine	86,5	98,6	139,2
AEC	88,2	98,9	126,2
THR	51,5	56,1	57,2

% d'activité aspartokinasiqne en présence d'inhibition

Les résultats indiqués en activité résiduelle obtenue après addition de lysine, thréonine et AEC permettent de mettre en évidence une activité identique dans le cas d'une inhibition par la lysine et l'AEC, aussi bien chez S.marcescens que chez E.coli. Cette inhibition est de 13,5 % pour la lysine et de 11,8 % pour l'AEC chez E.coli, elle est quasiment nulle pour TA 15 et chez S. marcescens (insensibilité de l'activité aspartokinasiqne à l'AEC et à la lysine). Chez cette dernière souche l'activité obtenue est même supérieure à celle du témoin et n'est donc pas inhibée par la lysine mais se trouve même stimulée par cette dernière (+26,2 et 39,2 % d'activité). Par contre l'activité en présence de thréonine est assez comparable chez les deux espèces et surtout entre TA 15 et S.marcescens et pourrait correspondre à une inhibition sur l'aspartokinase I. La lysine d'intervient donc pas, ni l'AEC sur les mécanismes de régulation des voies de biosynthèse de la lysine, en particulier sur l'aspartokinase, par l'absence de retroinhibition et probablement de répression.

Conclusion :

L'ensemble des résultats obtenus et la comparaison menée sur plusieurs aspects de leur physiologie susceptible de nous intéresser quant au but recherché nous ont amenés à préférer *E. coli* K 10 à *S. marcescens*. En effet *S. marcescens* s'avère être difficilement utilisable génétiquement, notamment en vue de lui faire produire de la lysine. En effet *S. marcescens* semble avoir un système de régulation quelque peu différent de celui d'*E. coli* au niveau des mécanismes de régulation, avec insensibilité de l'aspartokinase envers la lysine et l'AEC, et au niveau perméasique avec un système commun de transport pour la lysine et l'arginine, système qui serait inductible et serait aussi responsable du transport d'analogues comme l'AEC et la canavanine.

De ce fait l'utilisation de *S. marcescens* pose de nombreux problèmes, et il nous aurait fallu mieux connaître plusieurs de ces aspects fondamentaux de la physiologie de *S. marcescens* pour pouvoir les exploiter afin de lui faire produire de la lysine. Aussi avons-nous préféré utiliser *E. coli* dont la régulation était bien connue et sur lequel nous pouvions entreprendre de suite des essais d'amélioration génétique.

3 .

PRODUCTION DE LYSINE

PAR ESCHERICHIA COLI

La présente étude menée sur E. coli K 10 a consisté, à partir d'une souche non productrice de lysine, à obtenir par des manipulations génétiques des souches mutantes (portant une ou plusieurs mutations) capables de produire de la L- lysine.

Cette étude s'est déroulée en plusieurs étapes décrites dans ce mémoire et consistant en des améliorations successives des souches productrices obtenues. Les paramètres intervenant dans les essais de cultures sur la productivité des souches ont fait l'objet d'essais complémentaires, et une étude des perturbations créées au niveau des mécanismes de régulation et plus particulièrement au niveau de l'aspartokinase ont permis une meilleure compréhension des raisons métaboliques de cette production de lysine.

3.1. CONDITIONS OPTIMALES DE MUTAGENESE :

Ces conditions ont pu être déterminées au début de notre étude et améliorées au cours de celle-ci. Les meilleures conditions de mutagenèse avec les divers agent mutagènes sont celles décrites au paragraphe 1.1.1.

3.1.1. MUTAGENESE PAR LA NTG :

De nombreux essais de mutagenèse ont été entrepris avec la NTG et nous ont donné des résultats très satisfaisants. A titre comparatif, quelques modifications de paramètres peuvent se résumer sur le tableau suivant :(cf. 1.1.1. A).

Paramètres	0,1 ml de solution de NTG 20 mn à 37° C	0,2 ml de solution de NTG 20 mn à 30° C	0,2 ml de solution de NTG 30 mn à 30° C
t ₀ (avant mutagenèse)	1,7.10 ¹⁰	2,7.10 ⁹	2,5.10 ⁹
après mutagenèse	2,7.10 ⁶	1,4.10 ⁶	6,5.10 ⁴
après sélection par la pénicilline	4,8.10 ³	3,5.10 ⁴	2,1.10 ²

Evaluation de paramètres de mutagenèse (bactéries survivantes par ml de suspension).

Des critères qualitatifs (stabilité des mutations, % de mutants stables, etc...) nous ont fait choisir les paramètres figurant sur la droite du tableau. Ces paramètres ont parfois subi quelques modifications, qui seront précisées le cas échéant.

3.1.2. MUTAGENESE PAR LA 2-AP :

Les paramètres obtenus seront précisés lors de son utilisation, en particulier au paragraphe 3.2.2. lors de la recherche de clones mutants Hse⁻ ou lys⁻, recherche qui s'est avérée être positive avec l'obtention d'une souche lys⁻ et qui nous a permis de mettre au point cette technique de mutagenèse.

3.1.3. MUTAGENESE PAR LES RAYONS UV :

Peu utilisée au cours de cette étude, cette technique n'a été utilisée que sur la souche mutante 2 TA 15 dans les conditions décrites au paragraphe 1.1.1. Des numérations en fonction du temps ont donné les résultats suivants (sur milieu MSB₁ + Thr).

Temps d'irradiation :	15"	1500	cellules	survivantes/ml
	30"	700	"	"
	45"	160	"	"
	60"	35	"	"

Le témoin de départ était à 4.10^7 bactéries/ml.

3.2. OBTENTION ET SELECTION DE SOUCHES INDICATRICES :

Les méthodes de sélection de souches productrices ont été décrites (1.1.2. C) et n'ont été envisageables qu'après l'obtention des souches indicatrices, d'abord la souche TL 812 puis la souche L 101.

3.2.1. OBTENTION DE LA SOUCHE TL 812 :

Cette souche a été obtenue après mutagenèse sur la souche T2 qui est Thr⁻ (cf. 3.3.1) par la NTG (conditions standard), puis sélection par la pénicilline pendant 3 heures en présence de L-Thréonine (40 µg/ml). La culture de départ était à D.O = 0,65 et la numération sur milieu MSB₁ Thr-Lys a révélé 6.10^7 bactéries par millilitre de suspension.

Après sélection portant sur plusieurs milliers de colonies répliquées du milieu MSB₁+Thr+Lys sur milieu MSB₁+Thr nous avons pu sélectionner un clone Thr⁻ Lys⁻ stable et répertorié sous le numéro TL 812.

Ce clone nous a permis l'obtention des premières séries de mutants producteurs, la stimulation de la croissance de cette souche, par la technique d'inclusion dans le milieu de culture (cf. 1.1.2. C), étant décelable après 24 heures d'incubation à 37° C, notamment pour les souches productrices de la série 2TA (cf. 3.3.2.). Par contre si l'on imprègne les disques de papier filtre d'une solution

de lysine et que l'on dispose ceux-ci sur le milieu gelosé, la lysine diffuse dans le milieu et permet, autour du disque, une croissance de la souche TL 812. Si l'on ajoute de l'AEC dans le milieu de culture il y a compétition entre celle-ci et la lysine synthétisée par les colonies productrices (cf. 2.4.3.). Cette technique aurait pu permettre la recherche directe de clones fortement producteurs (eux seuls stimulant alors la croissance de TL 812) mais les résultats pratiques se sont montrés assez décevants et n'ont pas été exploités. Nous avons donc préféré la révélation directe, quantitative et la rapidité d'apparition des cultures de TL 812 autour des colonies productrices pour mettre en évidence ces dernières.

3.2.2. OBTENTION DE LA SOUCHE L 101 :

Deux séries d'essais ont été entreprises pour obtenir une souche strictement lys⁻ et n'ayant pas d'autre exigence afin d'éviter tout risque d'interférence et toute confusion.

A) Mutagenèse par la NTG :

Dans les conditions standard de mutagenèse et de sélection par la pénicilline nous avons obtenu à partir d'une culture à D.O = 0,61 d'E.coli K 10, une numération sur milieu MSB₁ + C.A (casaminoacids) de 2.10^5 bact/ml. Ces boîtes ont été répliquées après 48 heures d'incubation à 30° C sur milieu MSB₁ + Hse, et MSB₁ + Lys.

Le taux brut à la première sélection de colonies auxotrophes était alors de 1,7 % (par réplique sur milieu MSB₁ simple).

Sur 6240 colonies testées, 106 clones étaient auxotrophes et 37 clones se montraient stables après 3 repiquages successifs sur

milieu MSB₁ + CA. Sur ces 37 clones, 2 étaient exigeants en thréonine, aucun en lysine, aucun en homosérine, les autres exigences n'ayant pas été recherchées.

B) Mutagenèse par la 2-AP :

La technique standard (1.1.1. B) a été utilisée pour la recherche des mutants exigeants en lysine et d'autres en homosérine au cours d'une recherche simultanée ; puis une sélection par la pénicilline a été effectuée pendant 3 heures.

Les paramètres observés au cours des 2 séries sont les suivants :

- Séries Homosérine : (en nombre de cellules survivantes par ml de suspension).

	Série A	Série B	Série C
culture départ	$5 \cdot 10^7$	10^8	$3 \cdot 10^6$
après mutagenèse	$4,5 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^6$
après sélection	$3,2 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^4$

- Séries Lysine :

	Série A	Série B	Série C
culture départ	$5 \cdot 10^7$	10^8	$3 \cdot 10^6$
après mutagenèse	$3,5 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^6$
après sélection	$2,8 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^5$

La série C a consisté à reprendre 10 ml de la série B et de lui faire subir une nouvelle sélection par la pénicilline mais cette fois en milieu MSB_1 + 18 amino acides (donc sauf Hse et Lys) pendant 2 heures à 30°C.

Résultats :

Ces séries de mutagenèse à la 2-AP n'ont pas permis l'isolement de clones Hse^- stables. Respectivement, au cours de ces trois séries de mutagenèse, 1730, 4660 et 6820 colonies ont été testées et répliquées soit plus de 13000 colonies, et 14 seulement ont été sélectionnées comme susceptibles d'être exigeantes en homosérine. Malheureusement aucune d'entre elles ne s'est avérée être stable après plusieurs repiquages successifs.

Par contre la recherche de clone exigeant en lysine a permis de tester 3010, 12250 et 1610 colonies soit près de 17000 colonies répliquées et sélectionnées, parmi lesquelles 10 colonies étaient potentiellement exigeantes en lysine et dont une seule s'est montrée stable mais a exigé une purification.

Purification de la souche Lys^- :

Après quelques repiquages de cette souche des colonies révertantes sont apparues parmi les cultures et une purification a été entreprise. Elle a consisté à réaliser une culture en milieu MSB_1 + lys puis, à $D.O = 0,25$, à centrifuger 10 ml de culture et de le reprendre en milieu MSB_1 simple en présence de pénicilline et de sucrose (cf. 1.1.2.B) pendant 2 heures. Puis la culture est lavée deux fois et numérée sur milieu MSB_1 gélosé + lys. Un enrichissement en cellules auxotrophes exigeantes en lysine a ainsi été effectué et une série de boîtes de Pétri a été répliquée après 48 heures

d'incubation et les colonies auxotrophes sélectionnées. Plusieurs clones ont ainsi été testés et leur stabilité éprouvée après plusieurs repiquages. Parmi ces clones, la souche L101 était très stable et donnait, après 18 heures d'incubation en milieu MSB_1 + lys sur table d'agitation à 30°C, une D.O de 2,60 alors que des cultures d'autres clones testés n'avaient que de 1,40 à 1,80 de D.O. Nous avons donc sélectionné cette souche L 101, vérifié son origine (cette souche pousse sur milieu lactosé-bilié au vert brillant (112) spécifique des coliformes et possède le caractère indole +) et testé la souche comme souche indicatrice sur les souches productrices 2 TA 3 , MTA 65, MTA 88 et MTA 117 avec un résultat très satisfaisant, beaucoup plus rapide et plus visible qu'avec la souche TL 812 .

3.3. OBTENTION DE SOUCHES PRODUCTRICES DE LYSINE :

3.3.1. METHODES DE TRAVAIL :

Les techniques utilisées sont celles décrites au paragraphe 1.1.2.C. La plupart des séries de mutagenèse ont été effectuées à la NTG selon la technique standard.

Des souches mutantes $Thr^- AEC^R$ puis $Thr^- Met^- AEC^R$ ont été obtenues et ont subi des améliorations successives, après une mise en évidence de leur productivité sur milieu gélosé MSB_1 contenant la souche indicatrice (d'abord la souche TL 812 puis la souche L 101) et des séries d'essais de productivité sur milieu liquide MSB_1 diversement complémenté .

3.3.2. RELATIONS PHYLOGENETIQUES ENTRE LES SOUCHES :

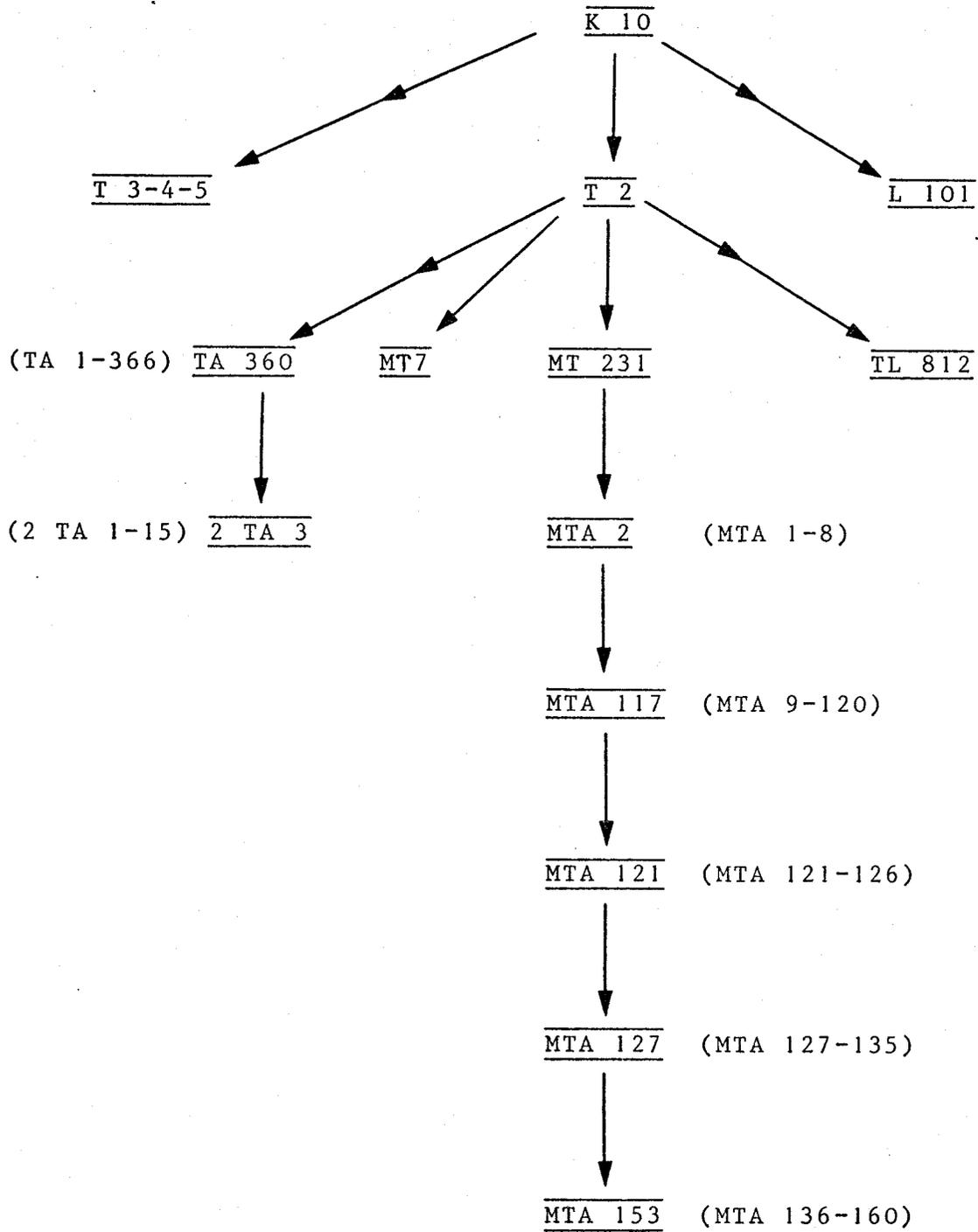
Afin de rendre plus clair l'exposé des différentes étapes d'obtention de souches productrices , nous avons préféré résumer celles-ci sous la forme d'un tableau qui permettra au lecteur de mieux comprendre la filiation entre les différentes souches productrices et pouvoir ainsi suivre la progression de l'étude effectuée. Cette filiation part de la souche sauvage E.coli K10 , passe par la souche T 2 (Thr⁻), puis la souche MT 231 (Met⁻ Thr⁻) puis par toutes les souches de type MTA (Met⁻ Thr⁻ AEC^R) . Sur ce même tableau (page suivante) figurent également d'autres types de souches mutantes obtenues lors des diverses séries de mutagenèse.

3.4. SOUCHES PRODUCTRICES DE LYSINE DE TYPE TA :

3.4.1. PREMIERE SERIE DE SOUCHES (TA 1-360) :

A) Obtention et sélection :

Nous sommes partis pour cette étude d'une souche mutante exigeante en thréonine, obtenue au cours d'essais précédents (cf.3.2.1) identifiée T 2, et nous avons recherché par mutagenèse à obtenir des clones mutants résistants à l'AEC donc qui pourraient être réprimés et dans ce cas auraient toutes les chances de produire de la lysine, ou auraient une déficience perméasique les rendant résistants à l'AEC et dans ce cas ne produiraient pas plus de lysine que la souche sauvage K10. Ces deux types de mutants ont pu être obtenus (cf.2.5.1). Après mutagenèse à la NTG dans les conditions standard mais sans sélection par la pénicilline, la suspension de cellules est étalée sur milieu MSB₁ gélosé + Thr



Relations phylogénétiques entre les souches productrices

(40 $\mu\text{g/ml}$) + AEC (200 $\mu\text{g/ml}$). Après 2 jours d'incubation à 37°C des colonies résistantes apparaissent, très grosses par rapport à un tapis bactérien diffus constitué par les cellules sensibles. Ces colonies sont repiquées et numérotées, puis testées en fioles erlenmeyer. La plupart d'entre elles ne produisaient pas plus de lysine que la souche K 10 et des essais de sélection ultérieurs ont alors été entrepris après "clonage" sur milieu contenant la souche indicatrice TL 812.

B) Productivité en fiole erlenmeyer :

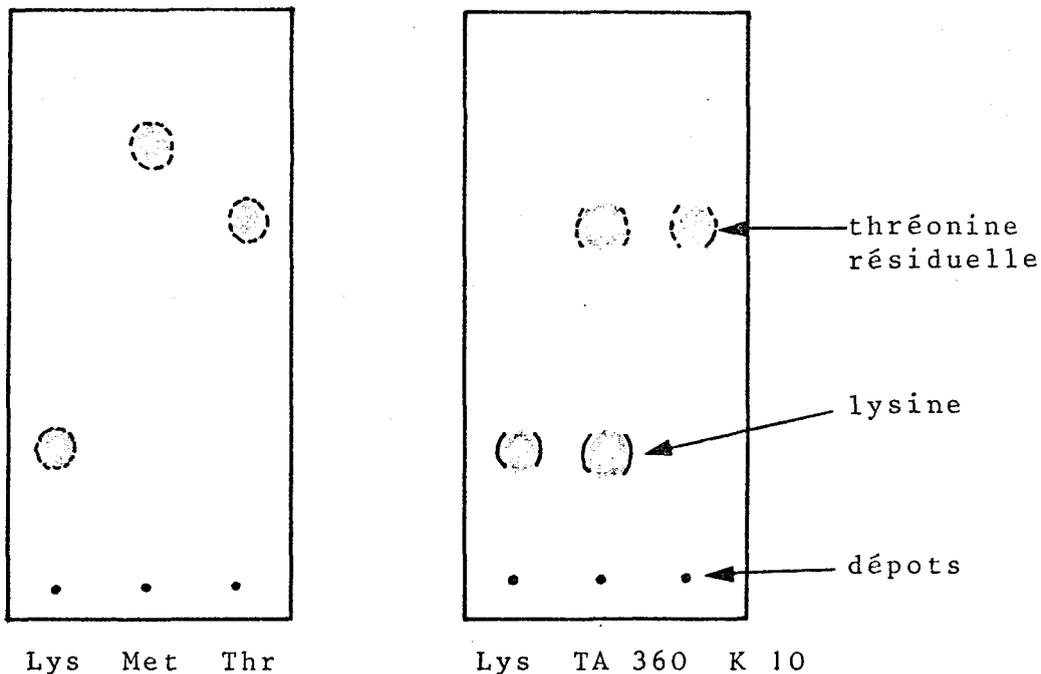
Des cultures en fioles de 250 ml sont effectuées en milieu MSB₁ + Thr avec 20 g/l de lactose et la productivité est mesurée après 65 heures de culture. Un aperçu des résultats obtenus est donné sur le tableau suivant où quelques clones seulement ont été retenus, avec parmi ceux-ci des clones producteurs et des clones non producteurs:

clone	pH	D.O	Lys	clone	pH	D.O	Lys
30	6,35	5,20	150	238	5,10	7,44	159
62	5,05	7,52	43	240	4,85	7,60	43
83	6,40	8,80	87	242	6,00	6,92	175
97	5,50	8,88	131	243	5,00	7,92	93
134	5,00	5,95	137	250	5,70	5,60	212
141	4,90	8,68	81	251	5,15	8,60	187
153	6,20	5,04	193	318	4,90	7,84	43
155	6,20	5,52	212	322	4,70	8,76	31
162	6,25	7,08	168	350	4,95	7,88	243
193	4,95	7,28	47	360	5,50	6,20	281
201	4,85	7,36	31	366	5,70	6,44	200
228	4,85	7,56	87	K10	5,90	5,70	45

Productivité des clones

Les clones producteurs montrent un pH de 5,50 à 6,20 alors que les autres ont un pH plus faible (4,85 à 6,50).

Une chromatographie sur couche mince du milieu de culture (65 heures d'incubation) centrifugé, en solvant méthanol/chloroforme/ammoniaque (cf.1.3.10) après 3 heures de migration, permet de révéler une légère production de lysine:



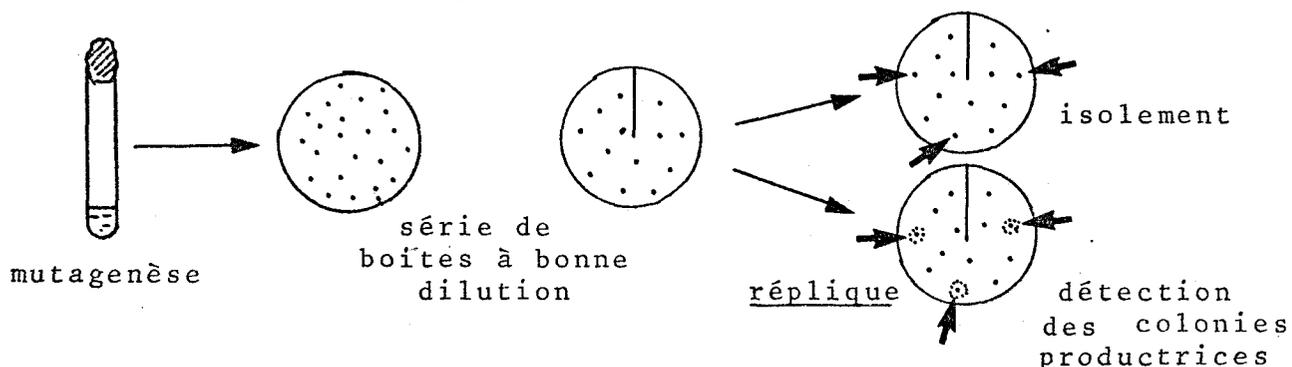
Des problèmes de stabilité se sont très vite posés pour la meilleure souche, TA 360, par l'apparition de colonies réverses Thr⁺ mais toujours AEC^R et à croissance plus rapide que la souche initiale. Rappelons aussi l'existence parmi cette série de souches, de souches déficientes au niveau de la perméabilité (ex: TA 9, cf. 2.5.1).

3.3.2. SECONDE SERIE DE SOUCHES (2 TA 1-16) :

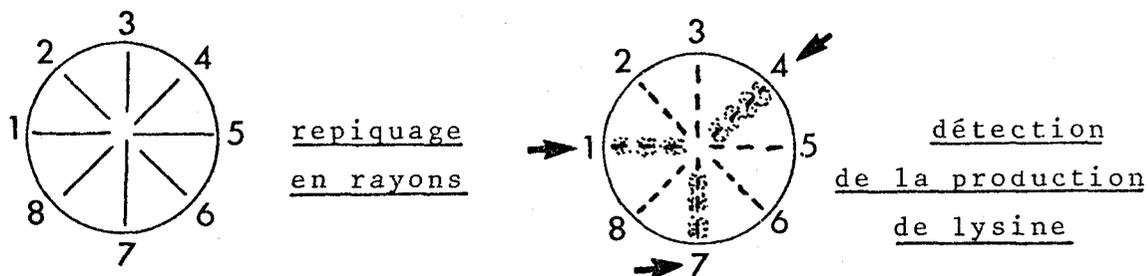
A) Obtention et sélection :

La meilleure souche de la première série, TA 360, a été soumise à une mutagenèse par la NTG suivie d'une numération sur milieu MSB₁

+ Thr puis, la bonne dilution connue, une série de boîtes est alors ensemencée sur milieu MSB_1 + Thr puis répliquée sur milieu MSB_1 + Thr et sur MSB_1 + Thr + TL 812 après 36 à 48 heures d'incubation. Le schéma suivant de travail est le même pour les diverses séries de recherche de souches productrices :



Le présent plan de travail mis au point au cours de cette série permet l'isolement de clones producteurs sans que ceux-ci aient eu un contact avec la souche indicatrice, ce qui n'est pas possible si on isole directement les clones producteurs à partir des boîtes MSB_1 + Thr + TL 812. Les clones ainsi sélectionnés sont repiqués sur boîtes MSB_1 + Thr en "rayons" et testés sur boîtes avec souches indicatrices en rayons discontinus (l'expérience nous a montré qu'en strie continue la stimulation de croissance de TL 812 est plus faible qu'en stries discontinus ou en pointillés) :



Un grand nombre de colonies a été isolé au cours de cette série mais peu de clones ont été retenus et leur productivité testée :

B) Productivité des meilleurs clones :

Des cultures en fioles de 500 ml en milieu MSB₁ lac (20g/l) + Thr nous ont permis avec deux clones, d'obtenir plus de 400 µg/ml de L- lysine. L'évolution de ces cultures figure sur le tableau de la page suivante, et permet à nouveau de constater que le pH de celles-ci reste relativement élevé, au-dessus de 6,0. La meilleure souche observée est la souche 2 TA 15.

Souche	pH	D.O	lys	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys
2 TA 1	7,45	0,87	83	7,20	2,85	205	6,60	2,60	429
2 TA 3	7,55	0,90	96	6,95	2,00	173	6,75	5,95	346
2 TA 13	7,20	1,37	77	6,55	3,05	-	6,00	2,80	384
2 TA 14	7,25	1,50	38	6,85	2,65	192	6,60	2,55	358
2 TA 15	7,30	0,82	25	6,95	2,90	275	6,50	2,60	435
2 TA 16	7,35	0,65	38	7,10	1,15	192	6,70	2,85	397
Temps	21 heures			45 heures			69 heures		

Le taux de lysine produit est indiqué en µg/ml. Les D.O observées sont faibles mais n'ont jamais été beaucoup plus fortes en fioles avec cette série de souches, sauf en fermenteur.

C) Productivité en fermenteur :

Une étude des souches 2 TA 3 et 2 TA 15 sur fermenteur de laboratoire a permis de mettre au point quelques paramètres intéressants concernant ces mutants d'E. coli. La souche 2 TA 3 isolée avant la souche 2 TA 15 a donné des résultats plus intéressants que ceux obtenus avec cette dernière et nous avons pu suivre l'évolution de

plusieurs paramètres au cours de la meilleure fermentation réalisée avec 2 TA 3.

- Exemple de fermentation obtenue avec la souche 2 TA 3 :

le milieu de culture utilisé est le milieu MSB₁ avec 40 g/l de lactose, 200 µg/ml de thréonine et 3 g/l d'(NH₄)₂ SO₄.

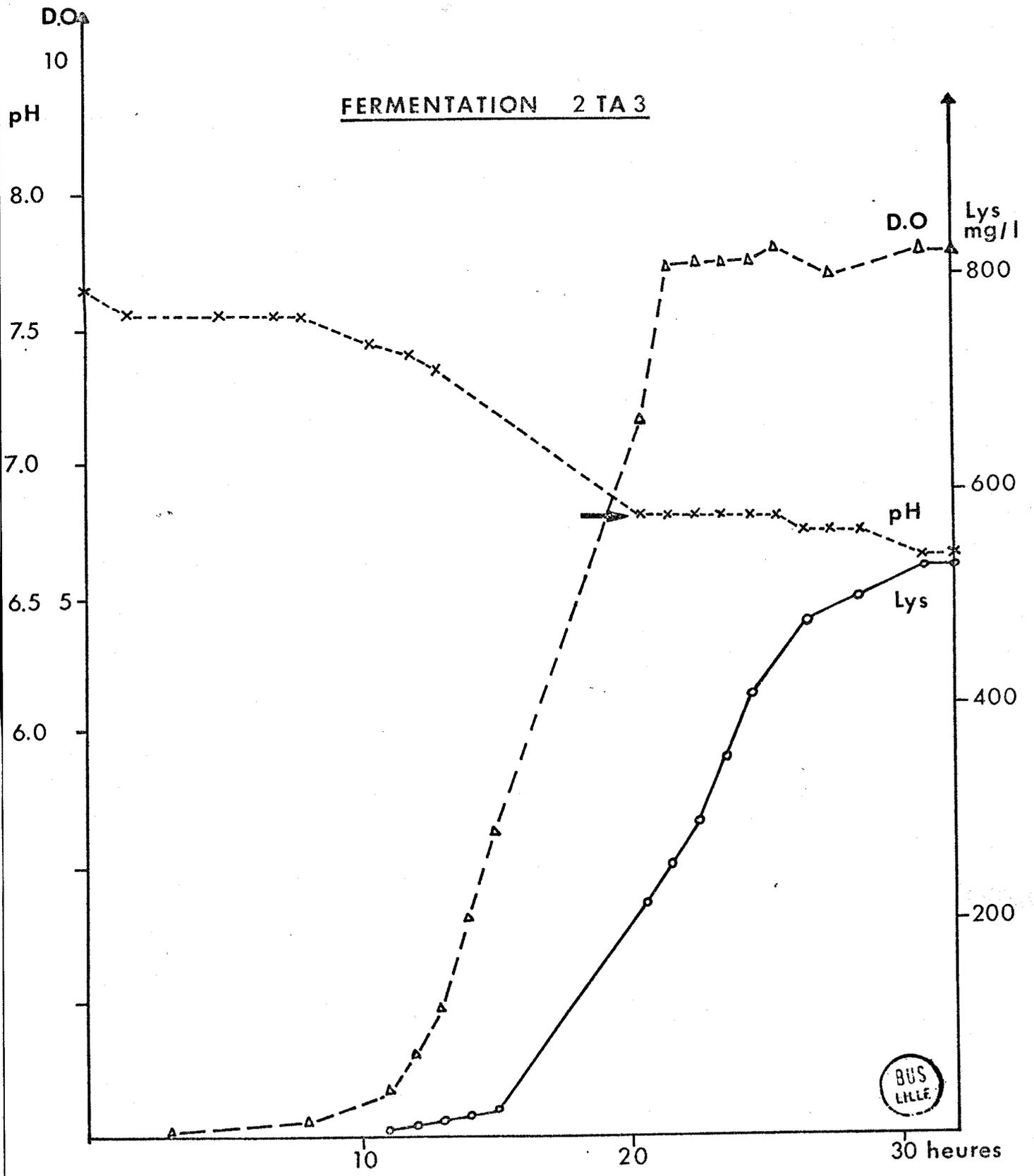
De façon plus pratique on stérilise d'abord le fermenteur à vide, puis à nouveau le fermenteur avec 10 l d'eau et 1,25 l de tampon pH₈ (cf. 1.1.3), la solution de lactose (1,25 l à 40 %) et la solution de vitamine B₁ étant stérilisées séparément en fioles erlenmeyer. La préculture qui a un volume de 1 litre estensemencée à partir d'une culture sur tube gélosé récente et sert à ensemen- cer le fer- menteur après 18 heures d'incubation sur agitateur rotatif à 30° C (D.O = 2 à 3). Au cours de cette fermentation la température est maintenue à 37° C et la vitesse d'agitation à 500 tours/mn, l'aé- ration étant maintenue à un débit de 5 litres par minute avec de l'air au départ, puis un mélange d'air et d'oxygène. Les paramètres observés en fonction du temps de fermentation sont les suivants (voir tableau page suivante).

Sur un même graphe (voir page 98) nous avons tracé les courbes de pH, de D.O et de production de lysine. La D.O ne monte pas très haut (7,50 au maximum) avec en contrepartie une faible consom- mation de lactose et d'NH₄⁺. Il est aussi possible de constater que la D.O évolue en même temps que le pH. Celle -ci est en effet sta- bilisé à 6,80 après 20h30 de culture et dès lors la D.O de la cul- ture cesse de monter alors que la production continue encore à croître pendant près de 10 heures et la courbe de production de lysine est assez semblable à la courbe de D.O avec un décalage dans le temps.

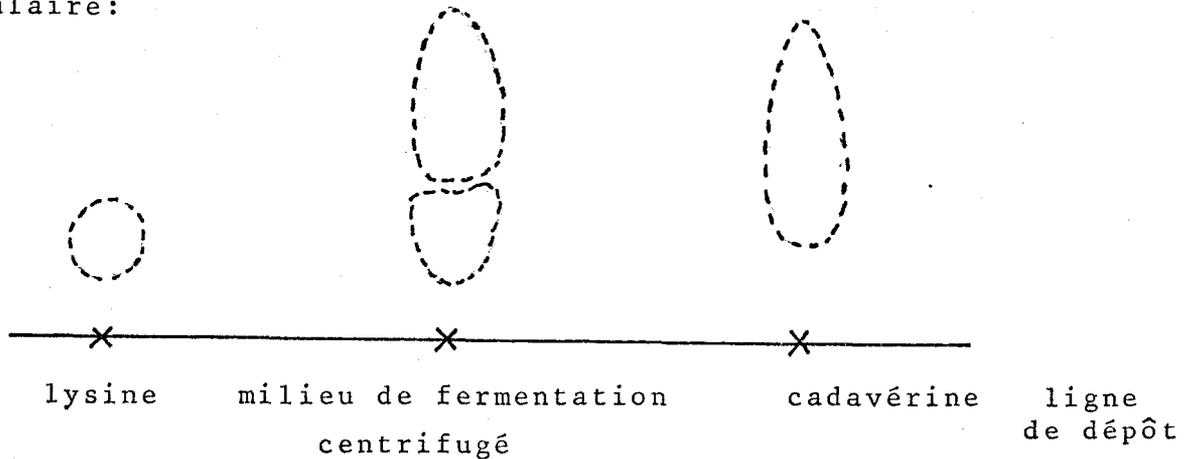
Temps en heures	pH	D.O	Lys	Lac	NH ₄ ⁺	mélange gaz % O ₂
0	7,65	0,01		36	4,24	21
1,5	7,55	0,01				
5	7,55	0,04				
7	7,55	0,04				
8	7,55	0,12				
11	7,45	0,36	5			
12	7,40	0,61	10			
13	7,35	0,95	15	32,8		37
14		1,62	20			
15		2,28	25	32,2	3,92	
20,5	6,80	6,33	215	28,8	3,86	37
21	6,80	7,45				
22,5	6,80	7,50	290			
23,5	6,80	7,50	350			
24,5	6,80	7,50	410			
25,5	6,80	7,55	415			37
26,5	6,75	7,55	475	26,8		
27,5	6,75	7,40	500			
31	6,65	7,55	530	26	3,76	
32,5	6,65	7,55	535		3,44	



Paramètres obtenus en fermentation sur la souche



Une chromatographie sur papier (cf.1.3.9) a montré nettement la présence de lysine mais aussi de cadavérine sous forme de tache lenticulaire:



Le taux de lysine est meilleur qu'en fiole et atteint 575 $\mu\text{g/ml}$ en fin de culture.

D) Paramètres de productivité de la souche 2-TA-3 :



Deux séries d'essais concernant notamment l'influence d'une complémentation éventuelle en amino acides dont la biosynthèse passe par l'aspartate (Met, Ile), l'aspartate lui-même et la valine ont été réalisés, mais concernant aussi le rôle des concentrations en thréonine et en base minérale du milieu de culture ont été envisagées. Le premier essai est réalisé en milieu MSB_1 + Thr (40 $\mu\text{g/ml}$) et complété de 1 ou plusieurs amino acides à la concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ en fioles d'un litre contenant 40 ml de milieu. Les paramètres observés après 28 heures de culture figurent sur le tableau suivant:

complément	pH	D.O	Lys $\mu\text{g/ml}$
0	7,05	4,30	150
Met	7,00	4,25	135
Val	7,45	5,85	93
Ile	7,15	4,05	157
Asp	7,05	5,05	152
Val+Ile	7,15	4,15	143

L'addition d'acides aminés et même d'aspartate ne vient pas améliorer (en temps et en quantité) la productivité de la souche. Le second essai est réalisé sur milieu MSB₁ à 20 ou 40 g/l de lactose, à 1 ou 2 fois la concentration normale en base minérale et en présence de 20, 40 ou 80 µg/ml de L-Thréonine. Les paramètres habituels (pH, D.O et lys) sont déterminés après 48 et 89 heures d'incubation (40 ml de milieu par fiole de 1 l). La composition des milieux (A à E) est la suivante (le lactose est indiqué en g/l, la base minérale en concentration par rapport à celle du milieu standard et la thréonine en µg/ml):

milieu	lactose	thréonine	base
A	20	20	1
B	20	40	1
C	20	80	1
D	20	40	2
E	40	40	2

Composition des milieux

Résultats obtenus :

milieu	pH	D.O	lys	pH	D.O	lys
A	7,00	2,00	111	6,05	4,55	216
B	6,95	2,45	216	5,90	6,35	321
C	6,90	1,90	160	6,70	4,70	345
D	6,90	4,05	198	5,95	5,60	341
E	6,95	1,95	221	5,10	5,80	277

Les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration normale de base , 20 g/l de lactose et 80 µg/ml de thréonine. Une double concentration de base minérale ou de lactose n'améliore pas les résultats.

E) Problèmes d'amélioration des souches 2 TA :

De nombreux essais de mutagenèse sur la souche 2 TA 15 qui était, en fiole, la meilleure souche productrice de la série 2 TA, n'ont pas permis l'isolement de nouveaux clones supérieurs à celle-ci. Notamment les essais à la NTG n'ont permis aucune amélioration et toutes les souches testées sur les milieux de Taylor (cf.1.1.2.D.1) et de Taylor modifié (cf.1.1.2.D.2) possédaient une activité lysine-décarboxylasique. Un essai de mutagenèse avec les rayons U.V n'a pas apporté d'amélioration à cet état de fait. Devant cette situation de blocage génétique ,d'impossibilité d'amélioration des souches obtenues, nous avons entrepris la recherche d'autres types de mutations notamment avec en plus des caractères Thr⁻ et AEC^R, le caractère Met⁻, selon une autre filiation de souches.

3.5. SOUCHES PRODUCTRICES DE TYPE MTA :

3.5.1. OBTENTION DE SOUCHES DE TYPE MT :

Sur une culture de 18 heures diluée et remise en incubation jusqu'à un D.O= 0,50, on effectue une mutagenèse à la NTG selon la technique standard, puis une sélection par la pénicilline en milieu MSB₁ + 18 amino acides (donc sauf Thr et Met).

Une numération sur MSB₁ + C.A donne alors 2.10³ bactéries/ml.

Des répliques à partir du milieu $MSB_1 + Thr + Met$ sur milieu simple et sur milieu contenant de la thréonine ont permis de sélectionner plusieurs clones supposés être à la fois Thr^- et Met^- . Deux clones se sont montrés stables : MT 7 et MT 231.

Ces clones ne poussent pas sur milieu $MSB_1 + Hse$ et ont donc deux niveaux de mutation : l'un sur la chaîne de biosynthèse de la thréonine et l'autre sur la chaîne de la méthionine.

3.5.2. PREMIERE LIGNEE DE SOUCHES (MTA 1-8) :

A) Obtention :

Après mutagenèse sur la souche MT 231 par la NTG (conditions standard) sur une culture relancée à $D.O = 0,60$, une série d'étalements sur milieu $MSB_1 + Thr + Met + AEC$ a permis d'isoler des souches dans les mêmes conditions que pour la série TA (cf.3.4.1). De plus la souche initiale, MT 231 n'est pas productrice de lysine. Les colonies résistantes à l'AEC sont repiquées au fil droit sur milieu $MSB_1 + Thr + Met + AEC$ plusieurs fois afin d'éliminer d'éventuelles cellules sensibles prélevées en même temps que les colonies résistantes. Ces clones ont reçu la nomenclature MTA . Sur 50 boîtes de Pétri observées, 40 colonies ont été sélectionnées puis repiquées et testées sur milieu gélosé contenant la souche indicatrice TL 812. Deux colonies étaient de bonnes productrices et quatre avaient une productivité moyenne. Les autres colonies ne stimulaient pas la croissance de la souche TL 812.

Une série parallèle de recherche de souches productrices à partir de MT 231 et menée directement sur milieu contenant la souche TL 812 a permis l'isolement de 2 clones producteurs sur 6500 colonies testées. Ces deux colonies se sont également montrées résistantes à l'AEC.

B) Productivité :

Ces 8 souches testées en fioles erlenmeyer (20 ml de milieu par fiole de 500 ml) ont donné les résultats suivants :

souche	pH	D.O	lys µg/ml	pH	D.O	lys
MTA 1	6,90	2,16	400	6,75	3,44	500
MTA 2	6,90	3,70	512	6,50	4,04	720
MTA 3	6,75	6,70	150	6,50	6,85	380
MTA 4	6,75	7,35	100	6,35	7,10	240
MTA 5	6,70	3,80	87	6,35	7,35	306
MTA 6	6,55	6,60	287	6,45	5,90	310
MTA 7	7,30	1,05	55	6,05	3,97	118
MTA 8	6,80	7,15	165	6,55	6,90	314
temps	48 heures			72 heures		

La meilleure production est obtenue avec la souche MTA 2 après 72 heures d'incubation, le pH des cultures restant assez élevé.

Des essais complémentaires en vue d'améliorer la productivité de la souche MTA 2 ont été réalisés. En particulier l'apport de chlorure d'ammonium, qui est utilisé pour la production de lysine par Micrococcus glutamicus (56) a été testée, la lysine étant synthétisée sous la forme monochlorhydrate. Aussi 15 milieux différents en concentration de lactose, de thréonine, de méthionine et de NH_4Cl ont été testés.

Les résultats obtenus et la composition des milieux se trouvent sur le tableau de la page suivante. Ces résultats permettent de confirmer le rôle des ions NH_4^+ et Cl^- sous forme NH_4Cl avec un optimum de productivité à 6 g/l mais un excès inhibe non seulement la croissance mais aussi la production de lysine:

milieu	Lactose g/l	thréonine µg/ml	méthionine µg/ml	NH ₄ Cl g/l
1	20	40	40	0
2	40	40	40	0
3	20	80	40	0
4	20	40	40	0
5	20	160	40	0
6	20	80	40	0
7	40	80	40	2
8	40	80	40	4
9	40	80	40	6
10	40	80	40	8
11	40	80	40	16
12	40	80	40	24
13	40	80	40	32
14	40	80	80	6
15	40	160	40	6

Résultats

milieu	48 heures			72 heures		
	pH	D.O	lys	pH	D.O	lys
1	6,60	3,55	565	5,60	5,05	625
2	6,50	4,05	555	6,40	5,20	582
3	6,60	4,85	480	5,50	4,65	458
4	6,00	4,90	495	5,30	4,60	458
5	5,60	5,75	205	6,25	5,30	294
6	6,30	5,40	415	5,50	5,05	382
7	5,90	5,60	580	5,25	5,45	900
8	6,25	4,60	520	5,70	6,10	910
9	5,90	5,90	755	5,20	6,00	1047
10	5,80	6,30	610	5,25	6,05	664
11	6,35	5,30	308	5,25	5,85	463
12	6,75	2,70	21	6,35	4,50	255
13	6,95	0,57	0	6,70	1,90	2
14	5,30	10,85	764	4,70	10,50	617
15	4,85	9,75	983	4,75	9,00	959
Temps	48 heures			72 heures		



Un excès de méthionine semble stimuler la croissance mais non la productivité de lysine, de même qu'un excès de thréonine.

C) Etude en fermenteur :

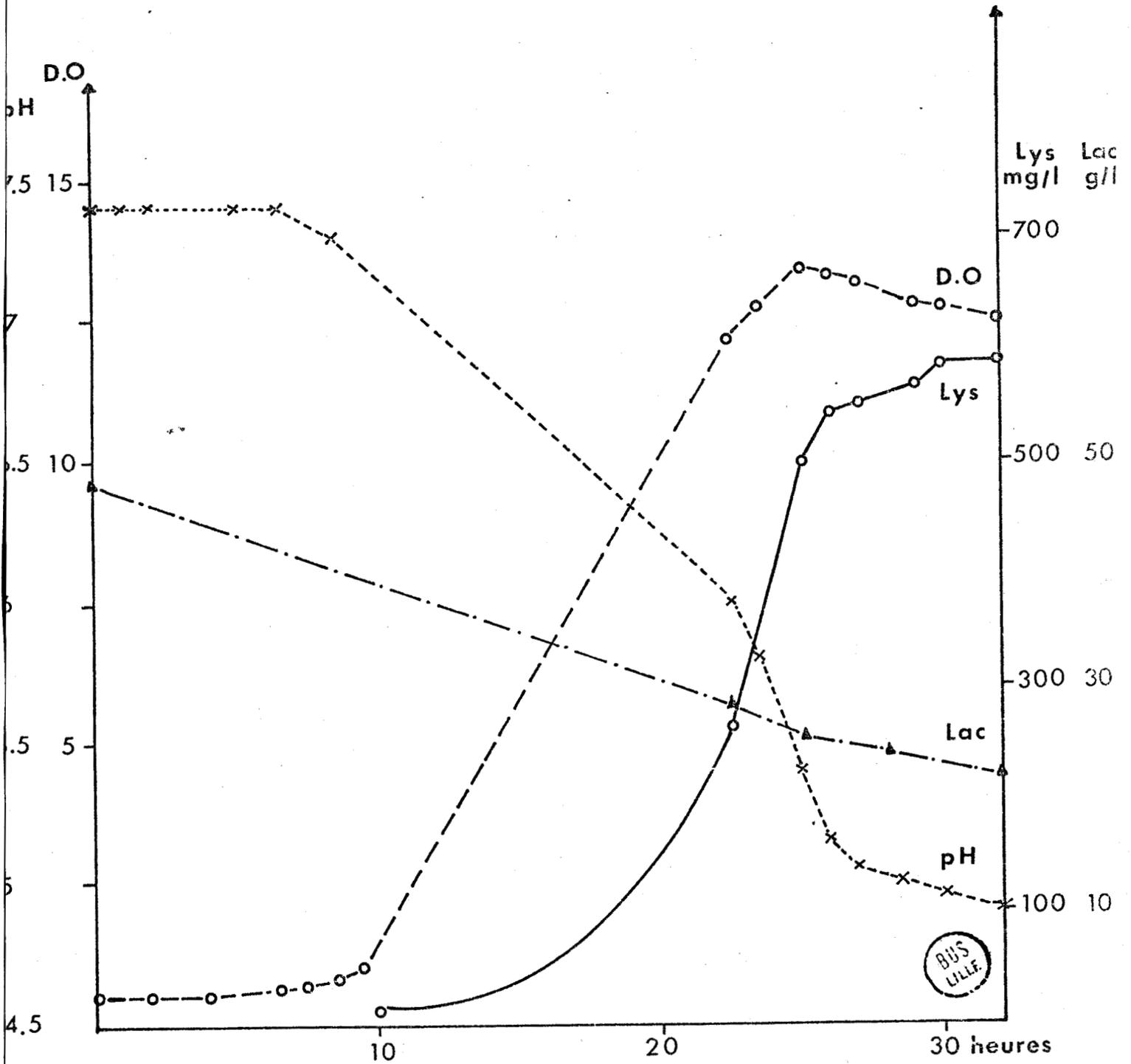
Elle a été réalisée sur la souche MTA 2 en milieu MSB₁ lactosé à 50 g/l + NH₄Cl à 3 g/l + 400 mg/l de DL-thréonine et 100 mg/l de DL-méthionine. Les paramètres observés sont ceux portés sur la figure de la page suivante. Au cours de cette fermentation la production de lysine suit également la courbe de D.O. Le pH n'a pas été stabilisé en cours de fermentation et a donc évolué de 7,40 à 4,90 et la D.O de la culture ne s'est pas stabilisée mais a passé par un maximum avant de décroître assez rapidement. La consommation de lactose est régulière mais ne tombe pas très bas. Cet essai en fermenteur n'a pas permis de produire plus de 587 µg/ml de lysine probablement à cause de l'emploi d'acides aminés sous la forme DL: en effet seule la forme L est consommée et il ne reste que la forme D qui peut être inhibitrice à forte concentration. Les résultats obtenus ont été transcrits sous forme de courbes sur la page suivante.

3.5.3. DEUXIEME LIGNEE DE SOUCHES (MTA 9-117) :

A) obtention :

Une culture de MTA 2 à D.O = 0,80 a été soumise à la mutagenèse par la NTG et a donné après numération $1,6 \cdot 10^5$ cellules survivantes par ml de suspension. Cette suspension a été utilisée pour la recherche de clones résistants à de plus fortes concentrations d'AEC après avoir constaté que les souches de la série MTA de la

Fermentation MTA 2



première lignée avaient une résistance limitée à l'AEC; en effet elles poussaient en présence de 200 µg/ml d'AEC mais non en présence de 1 mg/ml d'AEC. Nous avons donc recherché des clones plus résistants à l'AEC selon deux méthodes.

1- Méthode directe: elle s'effectue par étalement direct de la suspension mutée sur le milieu MSB₁+Thr+Met et complété par de l'AEC (1 mg/ml). On obtient alors environ 200 colonies résistantes par ml de suspension. Ces colonies répliquées sur milieu contenant la souche TL 812 se sont avérées être de bonnes productrices.

2- Méthode par enrichissement : 0,1 ml de suspension ayant subi la mutagenèse sert à ensemercer 5 ml de milieu MSB₁ + Thr + Met + AEC (1 mg/ml, 1,5 mg/ml et 2 mg/ml). Le tube témoin ensemençé avec la souche MTA 2 ne montre pas de culture à ces trois concentrations. Les autres tubes laissent apparaître une culture après 24 à 72 heures d'incubation. Cette culture est alors diluée et numérotée sur milieu MSB₁ + Thr + Met + AEC puis le lendemain répliquée sur ce même milieu et sur milieu contenant la souche TL 812. Cette technique a permis l'isolement de nombreuses souches productrices à un taux plus élevé qu'avec la technique précédente.

B) Productivité :

1- Sélection des meilleurs clones producteurs:

Cette sélection a été faite après 66 heures de culture en milieu MSB₁- PR (cf.1.1.3.A) en flacons de 500 ml contenant 25 ml de culture, à 30°C. Un grand nombre de clones ont été testés au cours de cette série et sur le tableau de la page suivante nous ne donnerons que les performances des meilleures souches qui ont été isolées.

Souche MTA	pH	D.O	Lys µg/ml	CAD
12	5,40	7,00	1325	+
13	5,60	4,50	1293	+
19	5,40	5,60	1038	±
25	5,35	7,30	1005	+
26	5,10	6,40	1179	-
31	5,80	4,60	1090	+
35	5,35	8,20	1047	+
36	5,35	6,00	1011	+
37	5,40	7,20	1101	+
38	5,35	6,50	1179	+
39	5,35	6,40	1332	++
44	5,15	7,20	1107	++
48	6,25	8,40	1107	+
51	5,40	7,50	1381	+
56	5,60	9,05	1175	±
57	5,40	8,00	1331	+
58	5,35	7,05	1250	+
62	5,35	6,80	1325	+
65	5,35	6,20	1263	+
72	5,30	7,10	1219	++
73	5,40	6,00	1150	++
89	6,35	6,75	1327	+
105	6,25	7,35	1222	+
107	6,50	8,35	1265	+
117	6,35	6,30	1316	++



2) Productivité en milieu MSB₁ - PR :

La productivité de 4 clones parmi les meilleurs a été testée en ballons de 2 litres et en milieu MSB₁ - PR sur 3 prélèvements :

MTA	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	CAD	pH	D.O	Lys
39	6,10	4,65	529	5,90	8,30	1158	+	6,25	8,60	1340
89	6,50	4,15	442	6,05	7,70	1306	++	6,60	6,90	1000
107	6,40	4,05	436	6,30	6,90	1082	+	6,20	7,20	1270
117	7,05	1,95	112	6,40	7,80	1167	+	6,25	7,00	1354
Temps	24 heures			48 heures				66 heures		

La production est supérieure à celle rencontrée pour la souche MTA 2 bien que l'amélioration soit encore limitée. La souche MTA 39 testée en fermenteur n'a pas donné de résultat satisfaisant mais des problèmes de stérilité et d'autoclave se sont posés au cours de ces essais. Les présentes souches testées sur milieu MSB₁ + Thr + Met + TL 812 donnent de bons résultats après quelques repiquages de ces dernières, avec une bonne stimulation de croissance de la souche indicatrice.

C) Rôle de quelques paramètres sur la productivité de la souche

MTA 117 :

1 - Rôle du chlorure d'ammonium :

En milieu MSB₁ lac(20 g/l) + Thr(80 µg/ml) + Met (40 µg/ml) et en fioles erlenmeyer de 2 litres (40 ml de culture), différentes concentrations d'NH₄ cl sont ajoutées au milieu de culture. Les résultats obtenus sont les suivants :

NH ₄ Cl g/l	46 heures				68 heures			
	pH	D.O	Lys µg/ml	CAD	pH	D.O	Lys	CAD
0	6,65	7,30	361	+	6,50	6,50	335	+
2	6,40	8,10	1013	+	6,60	6,50	1063	++
4	6,45	8,30	1316	++	6,50	6,45	1323	+
6	6,45	8,40	1354	+	6,45	5,80	1323	+
8	6,55	8,10	1158	+	6,40	6,30	1272	+
Temps	46 heures				68 heures			

Sur cette souche MTA 117, l'addition d'NH₄ Cl est également très efficace et stimule favorablement la production de lysine, à la même concentration optimale que sur MTA 2 : 6 g/l. Cette concentration sera celle utilisée pour le milieu de production optimal (MSB₁ - PR).

2 - Rôle des phosphates :

En modifiant la concentration en phosphates du milieu de culture nous avons modifié la productivité de la souche. Ces ^{con}tractions sont exprimées par rapport à la concentration normale du milieu 1/2, 1, 1 1/2 et 2, en fioles de 2 l (50 ml de culture) de milieu MSB₁ lac (20 g/l) Thr (80 µg/ml) Met (40 µg/ml).

Phosphates	48 heures				68 heures			
	pH	D.O	Lys	CAD	pH	D.O	Lys	CAD
0,5	5,85	8,80	574	±	4,60	9,20	710	±
1	6,75	7,70	753	±	6,50	7,35	1228	+
1,5	7,00	6,60	346	±	6,80	8,45	1043	+
2	7,35	2,30	31	-	7,15	7,45	802	±
Temps	48 heures				68 heures			

Ainsi la concentration optimale en phosphates est celle utilisée habituellement dans le milieu MSB₁ simple. Un excès ou un défaut de phosphates fait diminuer la D.O et la productivité.

3 - Rôle de la thréonine :

Des cultures en fioles de 2 litres (50 ml de milieu) ont été réalisées en milieu MSB₁ lac (20 g/l) Met (40 µg/ml). On y ajoute de la thréonine à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont les suivants :

Thréonine µg/ml	pH	D:O	Lys µg/ml	CAD	pH	D.O	Lys	CAD
0	6,95	2,80	253	±	6,50	3,70	358	±
020	6,30	6,75	555	++	6,35	6,90	1259	++
40	6,70	7,00	660	++	6,30	6,85	1265	++
80	6,55	8,10	728	+	6,20	7,55	1370	++
160	6,65	7,70	586	+	6,40	7,20	1130	++
240	6,60	7,90	500	±	6,15	9,00	802	+
Temps	48 heures				68 heures			

La concentration optimale est de 80 µg/ml : elle permet d'obtenir un taux de 1,37 g/l de lysine. Il est intéressant de noter l'apparition d'une culture en absence de thréonine : on favorise ainsi la prolifération de cellules révertantes ou de contaminants éventuels.

3.5.4. TROISIEME LIGNEE DE SOUCHES :

A) Obtention : Purification et mutagenèse sur la souche MTA 117 :

Des problèmes de stabilité se sont à nouveau posés au niveau de la

meilleure souche MTA 117 par l'apparition de colonies réverses sur le caractère Thr. Ces clones ont été répertoriés comme Met⁻AEC^R (MA) et leur productivité a été comparée à celle de la souche mère. Des répliques de colonies (obtenues sur milieu MSB₁ + Met + Thr) sur milieu MSB₁ + Thr et MSB₁ simple ont permis d'isoler quelques clones de type MA (9 souches) dont la productivité était à peine plus faible que celle de la souche MTA 117 et trois clones Thr⁻ Met⁻ Aec^R déterminés comme étant des clones de MTA 117 et répertoriés MTA117/1 à 3. Leur productivité a été comparée à celle des souches de type MA obtenues.

D'autre part une mutagenèse a porté sur la souche MTA 117/2 selon la technique standard suivie d'une sélection par la pénicilline sur les caractères Met et Thr après un épuisement préalable de 3 heures des cellules en milieu MSB₁ sans base (sans source d'azote). Ces techniques utilisées sont celles décrites dans les paragraphes précédents.

B) Productivité des souches :

1 - Sélection de nouvelle souches :

Après mutagenèse et enrichissement en doubles auxotrophes par la pénicilline, des séries de boîtes en milieu MSB₁ + Thr + Met + L 101 (qui est ici utilisée pour la première fois et dont l'obtention est contemporaine à cette série d'essais)ensemencées à la bonne dilution, ont permis l'isolement de 61 clones producteurs qui stimulaient efficacement la croissance de la souche indicatrice L 101. Comme pour les séries précédentes ces clones sont repiqués et conservés, puis testés en flacons de 500 ml. La productivité obtenue par les meilleures souches et les paramètres correspondants (pH, D.O)

sont regroupés sur le tableau suivant:

Clone	pH	D.O	Lys µg/ml	pH	D.O	Lys	identification
6	6,05	9,30	1590	6,30	5,25	1590	MTA 124
10	6,20	6,60	1333	6,30	6,90	1572	
11	6,15	7,50	1321	6,25	7,20	1635	MTA 126
12	6,10	7,75	1456	6,30	6,80	1560	
23	6,35	7,40	1170	6,25	5,90	1352	
26	5,95	11,00	1445	6,20	8,40	1459	
27	6,20	8,30	1592	6,30	9,60	1848	MTA 122
31	6,20	9,50	1216	6,25	7,80	1352	
33	6,20	6,70	1296	6,35	7,40	1333	
34	6,20	6,85	1358	6,25	5,20	1547	
44	6,20	7,30	1518	6,40	6,40	1538	MTA 125
53	5,75	8,00	1315	5 85	4 15	1410	
58	5,20	9,30	4100	6,40	6,95	4051	MTA 121
60	6,40	7,50	1216	6,45	5,85	1269	
61	6,25	6,70	1377	6,45	6,20	1730	MTA 123
Temps	48 heures			72 heures			

Cette série se montre intéressante par l'obtention d'un clone qui produit en première approximation plus de 4 g/l de lysine et d'autres clones produisant entre 1,5 et 2 g/l.

2) Productivité des clones issus de la purification de MTA 117/2 :

A titre indicatif nous avons testé la productivité des clones réverses ayant perdu le caractère Thr⁻, en milieu MSB₁-PR en même temps que les sous-clones de la souche MTA 117. Les essais ont été réalisés en fioles de 500 ml dans les conditions habituelles. Certains clones de type MA produisent peu de lysine (ex: MA 4) tandis que d'autres ont une productivité voisine de celle de MTA 117 (ex: MA 1 et MA 6). Les sous-clones MTA 117/1 à 3 ont une bonne productivité comparable à celle de la souche initiale lors

de son isolement . Il est intéressant de noter que les souches réverses ont une croissance supérieure à celle de la souche initiale (D.O = 14 pour MA 8):

souche	pH	D.O	Lys	CAD	pH	D.O	Lys
MA 1	6,60	7,40	1238	+	6,40	9,15	1284
MA 2	6,65	6,50	988	++	6,35	11,90	950
MA 3	6,70	6,20	799	++	5,35	12,90	704
MA 4	6,85	2,80	152		5,50	6,50	234
MA 5	6,65	6,10	603		6,25	5,80	407
MA 6	6,75	6,00	927	+	6,00	9,40	1185
MA 8	6,65	6,80	134		6,40	14,50	642
MTA117/1	6,50	5,20	1145		6,05	7,60	1365
MTA117/2	6,75	7,20	905	++	6,35	8,20	1295
MTA117/3	6,30	8,50	1045		6,15	8,90	1380
temps	45 heures				68 heures		

C) Paramètres de productivité de la souche MTA 121 :

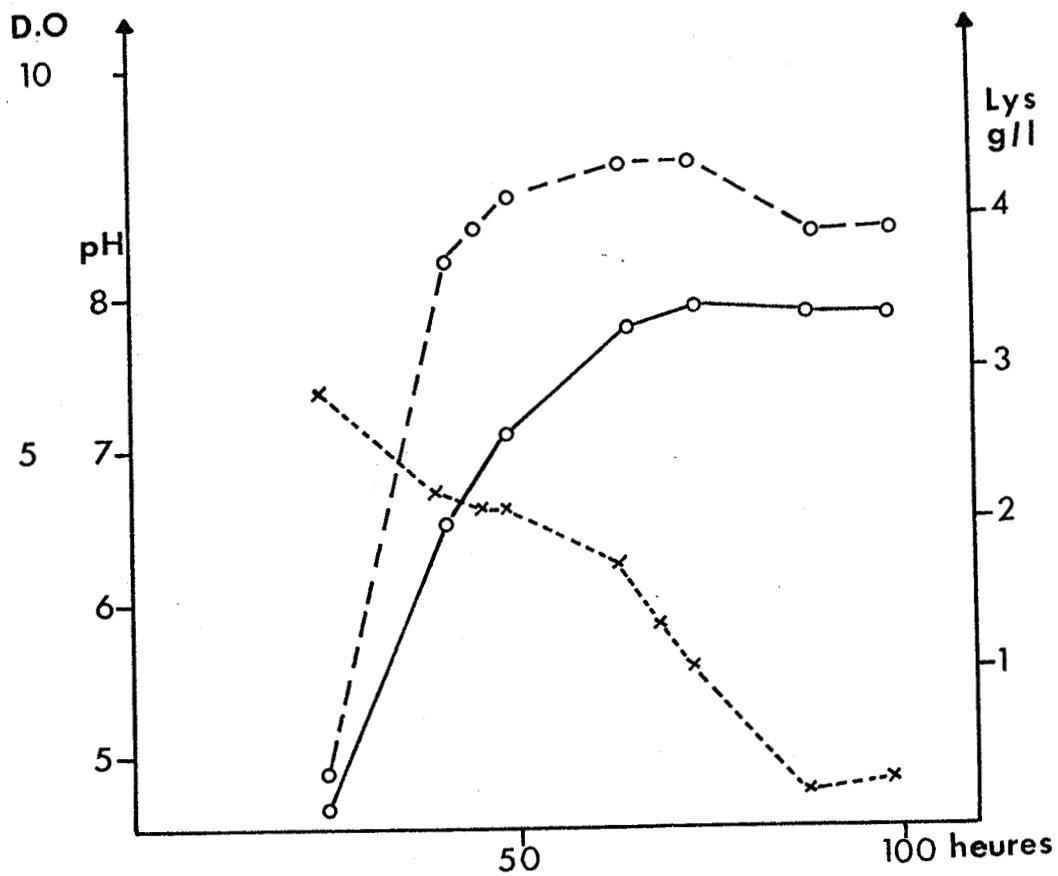
1- En milieu MSB₁ - PR :

Des tubes de repiquage différents de la souche MTA 121 ont montré des productivités quelque peu différentes et le meilleur tube de repiquage a été utilisé pour les essais de productivité en fioles de 2 litres et en fermenteur. Sur 3 tubes testés, la variation de productivité rencontrée , sur des cultures en fiole erlenmeyer de 2 litres en milieu MSB₁ - PR, était la suivante :

tube	pH	D.O	Lys µg/ml	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys
1	6,65	8,70	3641	6,40	9,00	4620	6,40	8,70	4336
2	6,75	7,30	2385	6,30	9,60	4206	6,40	10,10	3948
3	6,80	7,10	2051	6,30	9,50	3974	6,30	10,30	3716
temps	44 heures			65 heures			72 heures		

Une cinétique de production de lysine a été réalisée sur une culture en ballon de 2 litres contenant 80 ml de milieu MSB₁-PR.

Les paramètres habituels ont été déterminés (pH, D.O). La production de lysine suit encore la courbe de D.O alors que celle du pH descend assez régulièrement jusqu'à pH = 4,8 pour s'y stabiliser.



Productivité MTA 121

2- En présence de diverses concentrations de méthionine :

Cet essai et les suivants ont été effectués en fioles erlenmeyer de 2 litres contenant 40 ml de milieu MSB₁-PR sans NH₄Cl : lorsque la concentration en méthionine est modifiée dans le milieu de culture, la productivité l'est également :

Met µg/ml	pH	D.O	Lys	CAD	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	CAD	
40	6,15	9,00	4200	+	6,05	9,90	4916	6,20	11,70	4187	++	
80	5,75	14,00	5093	+	5,80	12,70	5120	5,90	12,40	4548	++	
120	5,70	15,60	4658	+	5,70	14,20	4608	5,80	13,90	4217	++	
200	5,45	14,35	6025	++	5,55	13,10	5632	5,80	12,20	5301	++	
400	5,75	13,50	4907	+	5,70	12,10	5843	5,80	11,20	4217	++	
temps	44 heures				52 heures				69 heures			

La meilleure production est obtenue à 200 µg/ml de Met. A 80 µg/ml la production est également augmentée mais peu supérieure à celle obtenue avec la concentration habituelle de 40 µg/ml. Cette dernière donne d'ailleurs un meilleur résultat qu'à 120 µg/ml. Nous avons donc conservé pour les autres essais la concentration de 40 µg/ml de méthionine, compte tenu de son prix d'achat et de la faible augmentation de productivité obtenue à des concentrations supérieures .

3- En présence d'acétate d'ammonium :

Si l'on remplace le NH₄Cl par de l'acétate d'ammonium à des concentrations de 3 et 6 g/l (et un essai témoin) on peut remarquer (tableau page suivante) que l'acétate d'ammonium peut remplacer le chlorure d'ammonium à raison de 3 g/l et permet une production intéressante (6 g/l de lysine). Cependant en raison de son prix

acétate g/l	pH	D.O	Lys	Cad	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	Cad
0	6,50	8,30	1214	-	5,90	7,50	729	6,10	7,80	723	-
3	7,20	7,60	5093	++	6,80	7,20	6054	6,95	10,30	5632	++
6	7,60	7,30	2174	±	7,15	7,20	2861	7,40	13,40	4247	++
temps	48 heures				52 heures			69 heures			

très élevé par rapport à celui du chlorure d'ammonium, ce dernier demeure d'un emploi avantageux. Un résultat analogue a été obtenu par Lodha et al. (56) sur *M. glutamicum*, l'acétate d'ammonium étant le plus intéressant pour la productivité suivi du chlorure d'ammonium et du sulfate d'ammonium, l'urée, le nitrate de potassium et du nitrate d'ammonium ne convenant pas.

4- En présence d'acide aspartique :

En milieu MSB₁- PR additionné d'acide aspartique (Sigma) à diverses concentrations, on obtient après 64 heures de culture les taux suivants :

aspartate µg/ml	pH	D.O	Lys µg/ml
0	6,55	12,00	4861
20	6,55	12,80	4801
40	6,50	13,60	4741
80	6,50	12,90	4861
200	6,55	12,55	5132
400	6,55	12,90	5313

L'apport d'acide aspartique ne présente aucun intérêt quant à la production de lysine, sauf pour des concentrations supérieures

à 200 µg/ml peu envisageables pour des questions de rentabilité.

5- En présence d'homosérine :

Puisque l'aspartate n'offrait pas d'intérêt à être ajouté au milieu de culture il était intéressant de voir l'effet d'une addition d'homosérine (Sigma) à des concentrations de 40 et 80 µg/ml. Cette addition donne les résultats suivants :

Hse µg/ml	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	Cad
0	6,25	8,50	4330	6,05	10,10	4535	5,90	9,60	4342	++
40	6,80	5,60	1010	6,20	6,80	1837	6,30	8,20	2771	±
80	7,25	1,15	85	6,40	3,50	482	6,35	9,50	2048	±
temps	44 heures			52 heures			69 heures			

L'addition d'homosérine retarde la croissance et la production de lysine.

6- En conditions différentes d'aération :

Ces conditions sont obtenues en réalisant des cultures en fioles erlenmeyer de 500 , 1000 et 2000 ml et en mesurant le taux de lysine obtenu en fonction du temps :

fiolle ml	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys
500	6,55	7,40	2222	5,85	8,20	3047	4,80	8,00	3117
1000	6,55	7,50	2429	5,60	9,00	3291	4,75	8,10	3425
2000	6,55	7,70	2469	5,55	9,30	3313	4,80	8,05	3487
Temps	45 heures			69 heures			93 heures		

La meilleure production est obtenue en fiole de 2000 ml donc dans les

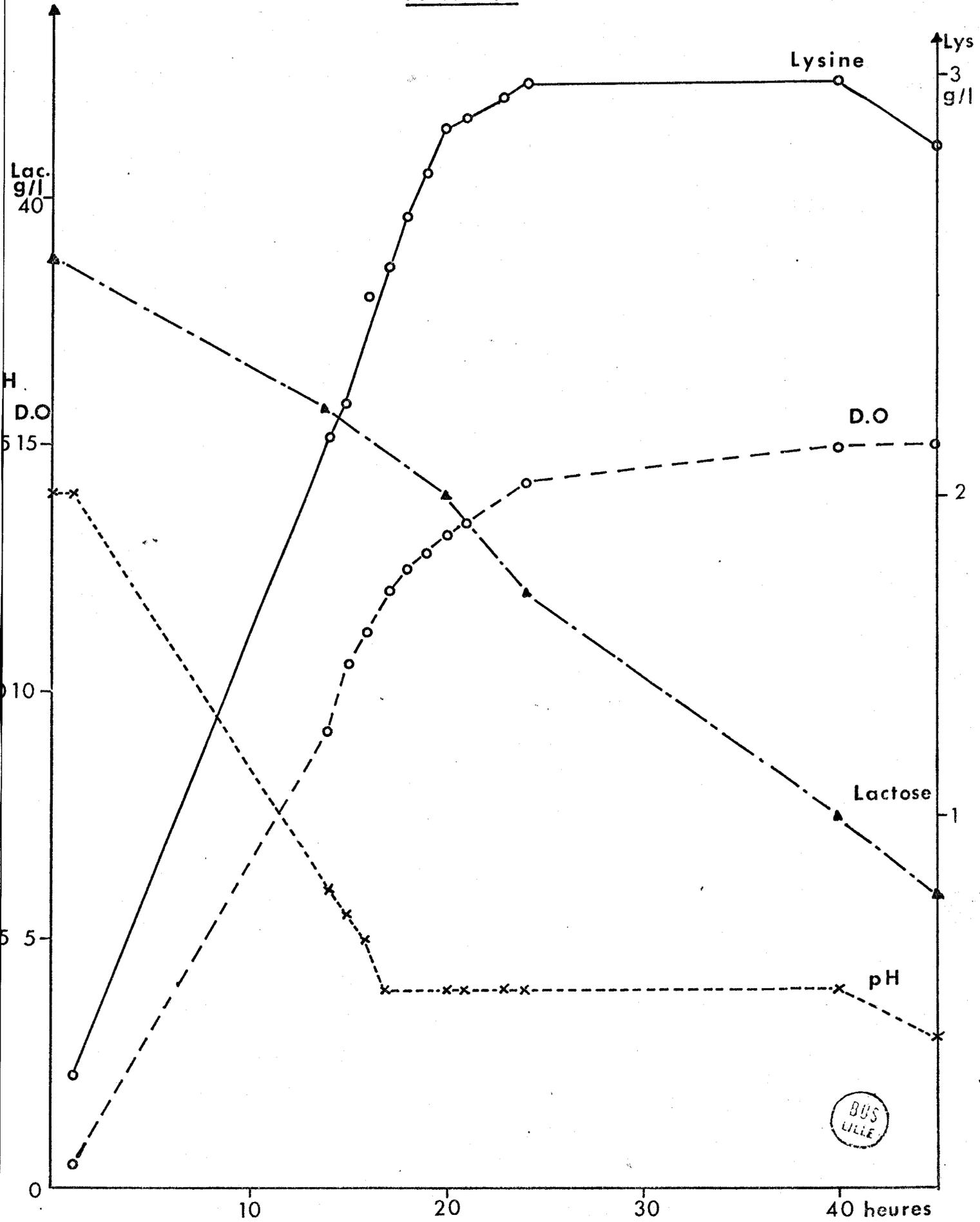
D) Etude en fermenteur :

Une étude en fermenteur de la production de lysine par la souche MTA 121 a été entreprise en milieu MSB₁ lactosé à 40 g/l + Thr à 80 mg/l + Met à 40 mg/l + NH₄Cl à 6 g/l avec un débit gazeux (air) de 5 litres par minute pour un volume utile de 12,5 litres de milieu de culture à 29°C. Les résultats obtenus ont été transcrits sous forme de graphe et figurent sur le tableau suivant (ensemble de paramètres observés) :

temps en heures	pH	D.O	Lys	Lac g/l	PO ₄ ⁻⁻	Met mg/l	Débit gazeux (% O ₂)
0	7,40	0,37	166	37,5	134	39	21
1	7,40	0,48					
14	6,60	9,20	2058	32,5	134	22,8	40
15	6,65	10,60	2115				
16	6,50	11,20	2274				
17	6,40	12,00	2483				
18	6,40	12,50	2614				
19	6,40	12,80	2745	28	129	11,5	60
20	6,40	13,10	2864				
21	6,40	13,40	2888				
23	6,40	14,50	2988				
24	6,40	14,30	3086	24	129		60
40	6,40	15,00	2987	15	125		
45	6,30	15,00	2814	12,0	121	4,5	60

Le parallélisme entre les courbes de D.O et de production de lysine est encore observé cette fois et l'examen de la courbe de lactose permet de constater que sa consommation se poursuit

MTA 121



lorsque la D.O s'est stabilisée (renouvellement de population ou survie de celle-ci ?). Le pH n'est pas contrôlé en début de fermentation mais il est ensuite stabilisé à 6,40 par de la potasse 3 N. Nous avons choisi cette valeur car elle correspondait à une faible activité lysine-décarboxylasique, l'optimum d'activité de cette enzyme se situant en effet à un pH plus bas de l'ordre de 5,50 à 6,00. La consommation en phosphates est basse et le taux d'ions PO_4^{--} disponibles diminue très peu; par contre la consommation en méthionine est importante bien qu'incomplète.

3.5.5. QUATRIEME LIGNEE DE SOUCHES (MTA 127-135) :

A) Obtention des souches :

Une mutagenèse sur la souche MTA 121 a porté sur une culture à D.O = 0,71 selon la technique standard à la NTG mais en laissant agir celle-ci pendant 40 minutes. La numération après mutagenèse a donné 2.10^6 bactéries survivantes/ml. Une sélection de souches productrices est alors entreprise après ensemencement et répliques de séries de boîtes sur milieu $MSB_1 + Thr + Met + L 101$. 86 clones ont ainsi été sélectionnés pour leur aptitude à stimuler la croissance de la souche L 101 efficacement et rapidement.

B) productivité :

1- Sélection de clones producteurs :

Ces clones sont testés en fioles de 500 ml (20 ml de milieu) en milieu $MSB_1 - PR$ pendant des temps compris entre 63 et 72 heures (selon disponibilité) . Les résultats obtenus avec les meilleurs clones sont indiqués sur le tableau de la page suivante. Cette série de mutagenèse a permis notamment de sélectionner plusieurs

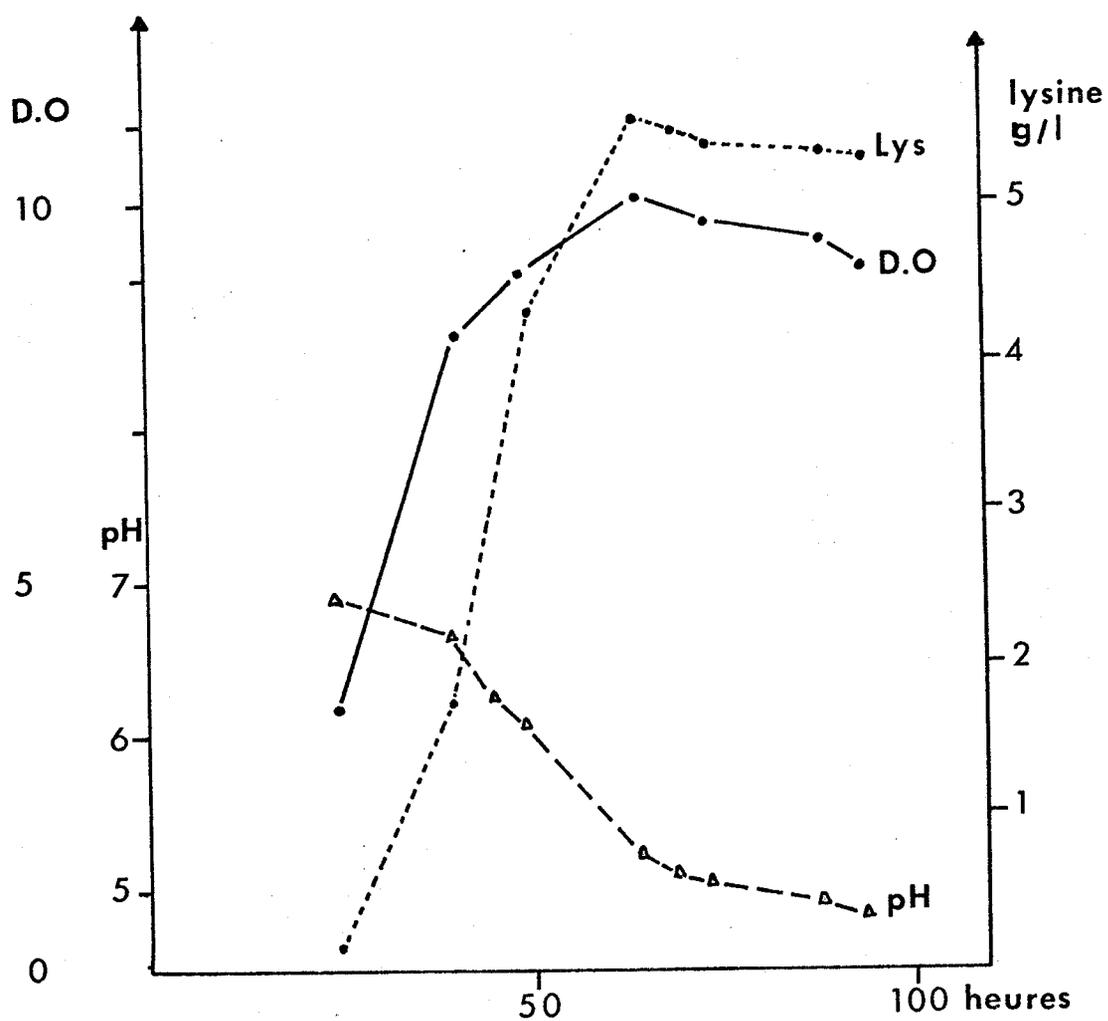
souches produisant près de 5 à 6 g/l et une souche (MTA 127) produisant 9 g/l de lysine. La souche MTA 128 a montré une faible activité lysine-décarboxylasique par le test de Richard (cf.1.1.2.D.3) avec une faible décoloration du milieu de révélation: (68 heures d'incubation):

clone	pH	D.O	Lys mg/l	Cad	Identification
1	6,10	9,70	9078	++	MTA 127
2	6,50	7,80	4636	±	MTA 128
3	6,35	8,10	5515		MTA 129
9	6,15	8,80	5488		MTA 130
20	6,30	9,60	5606	+	MTA 131
27	6,30	9,40	4666	++	
30	6,35	6,15	5230	++	MTA 132
31	6,35	8,85	4713	++	
34	6,25	6,95	4914	++	
36	6,40	9,40	4856	++	
41	6,35	9,95	5212	+	
43	6,40	8,55	5029	++	
47	6,35	9,45	4627	+	
52	6,20	6,00	6029	++	MTA 133
53	6,30	9,20	4706	+	
55	6,35	11,00	4853	+	
63	6,40	8,30	5794	++	MTA 134
67	6,30	5,25	5748	++	MTA 135
72	6,35	11,45	5125	+	
77	6,30	5,80	5089	+	
81	6,30	6,80	5189	++	

2- Productivité de la souche MTA 127 :

En milieu MSB₁- PR une cinétique de production de lysine a été faite avec la meilleure souche de cette série: MTA 127 en ballons de 2 litres contenant 80 ml de milieu de culture. Les paramètres

observés permettent plusieurs remarques (figure ci-dessous): les courbes de D.O et de production de lysine sont encore une fois parallèles mais ici la production de lysine monte à 5,5 g/l et cette concentration reste constante en fin de culture et démontre également la faible activité lysine-décarboxylasique de cette souche décelée par le test de Richard. Le taux maximum de lysine est obtenu après 64 heures de culture:



Dans des conditions d'aération différentes, en fioles de tailles différentes pour un même volume de culture, et à des concentrations de 20 et 40 g/l de lactose, il est possible de retrouver les mêmes résultats que ceux obtenus avec les souches précédentes.

Les essais ont été réalisés avec 40 ml de culture par fiole:

		pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys
Lac 20 g/l	500	5,95	9,80	4783	5,15	10,00	5946	4,95	9,30	6079
	1000	6,00	9,35	5061	5,15	9,80	5503	4,90	9,40	5801
	2000	5,90	10,25	5185	5,15	11,10	5769	5,10	9,70	6295
Lac 40g/l	500	6,05	9,10	3734	5,20	10,00	4586	4,85	8,90	4999
	1000	6,20	8,90	4567	5,15	10,50	6036	4,85	9,60	6048
	2000	6,15	9,40	3858	5,10	10,30	4882	4,85	9,70	5308
	Temps	45 heures			69 heures			93 heures		

Le meilleur taux de production est obtenu en fioles de 2 litres mais après 96 heures d'incubation, temps qui est habituellement plus court. En milieu lactosé à 40 g/l la production est plus rapide en fioles de 1000 ml. De tels essais n'ont pas été repris avec les souches de la dernière lignée, les paramètres de productivité étant supposés être les mêmes, comme pour les séries précédentes.

3.5.6. CINQUIEME LIGNEE DE SOUCHES (MTA 136-160) :

A) Obtention :

En vue d'améliorer la souche MTA 127 une nouvelle série d'essais de mutagenèse a porté sur celle-ci, à partir d'une culture à D.O = 1,18 par la technique standard à la NTG mais en laissant agir celle-ci pendant 40 minutes. La numération a montré la

présence de $1,4 \cdot 10^6$ bactéries survivantes/ml de suspension. Après plusieurs séries de répliques et de mise en évidence de la productivité des colonies par stimulation de la croissance de la souche L 101, les meilleures colonies sont repiquées et les clones obtenus testés selon la technique habituelle en milieu MSB₁-PR. 164 clones ont ainsi été testés sur table d'agitation et la productivité de ces clones a été portée sur le tableau de la page suivante (seuls les meilleurs clones figurent sur ce tableau), mesurée après 48 heures de culture.

B) Productivité :

Cette nouvelle série de souches nous a permis d'isoler 8 souches produisant plus de 10 g/l de lysine et en particulier la souche MTA 155 a produit lors de la sélection 12,7 g/l.

Des essais de chromatographie sur couche mince nous ont permis de constater l'absence d'acides aminés pouvant interférer sur le dosage de lysine (en particulier de proline) et la présence d'une importante tache au niveau de la lysine. Toutes ces souches produisent un peu de cadavérine mais en très faible quantité par rapport au taux de lysine produite.

Toutes ces souches stimulent rapidement la croissance de la souche indicatrice L 101 après des temps d'incubation relativement courts (24 heures d'incubation) et la zone de stimulation est importante.

Ces souches testées à nouveau dans de meilleures conditions, en fioles de 2 litres ont donné des résultats intéressants mais toujours inférieurs à ceux obtenus au cours de leur sélection.

Au cours de cette série d'essais les paramètres observés pour les souches MTA 141, 142, 143, 144, 155 et 160 ont été regroupés dans

Clone	pH	D.O	Lys ₁ mg/l	Cad	Identification	
2	5,95	10,30	9562	+	MTA 141	
3	6,05	10,00	6522	+		
4	6,00	9,60	6335	++		
5	6,00	9,90	6450	++		
6	5,90	10,60	9764	+		MTA 142
7	5,90	10,60	6770	+		
8	6,15	9,70	6273			
10	5,85	10,90	6056	++		
21	6,05	9,80	6397	++		
22	6,15	11,20	10052	+		MTA 143
23	6,15	8,10	6490	+	MTA 144	
32	5,80	11,80	6443	++		
47	6,20	10,60	6304	++		
48	6,20	10,00	6707	+		
51	6,15	10,70	10875	++		
65	6,10	9,90	6025	±		
68	6,10	10,40	6025	+		
73	6,25	8,70	6041			
74	6,25	9,40	6424			
75	6,15	9,40	6488			
80	6,10	10,20	9537	+	MTA 146	
88	6,10	10,10	6488	++		
105	6,00	10,60	11176	++		MTA 147
141	6,20	11,10	9186			
147	6,20	9,10	6060			
149	6,20	9,20	7575			
150	6,15	9,30	6393			
152	6,15	9,30	6690			
153	6,05	10,40	12362	+		MTA 153
154	6,15	9,40	8363			
155	6,50	10,60	12787	+	MTA 155	
156	5,90	10,70	11090	+	MTA 156	
157	6,10	9,80	9696			
158	6,05	10,30	9575			
160	6,00	10,10	10545	++	MTA 160	



Productivité des meilleurs clones de la 5^e lignée

le tableau suivant :

Souche	pH	D.O	Lys	pH	D.O	Lys mg/l
MTA 141	6,10	11,50	9352	6,20	9,90	8208
MTA 142	6,15	10,20	9764	6,15	7,20	6242
MTA 143	6,05	9,00	9176	6,10	5,20	4409
MTA 144	6,15	9,10	9985	5,80	10,15	8571
MTA 155	5,20	10,90	6190	5,10	6,50	8268
MTA 160	5,50	10,90	5420	5,20	9,90	9205
temps	47 heures			69 heures		

La plupart des souches de cette série ont donc montré une faible activité lysine-décarboxylasique, mais elles se sont aussi montrées instables sauf pour quelques unes d'entre elles au point de vue de leur production de lysine. Aussi évoquerons nous plus particulièrement ce problème dans le paragraphe suivant.

3.5.7. STABILITE DES SOUCHES PRODUCTRICES :

A) Problèmes de stabilité :

La plupart des souches productrices isolées au cours de notre étude ont montré une instabilité plus ou moins forte, par l'apparition de colonies plus grosses (sur milieu gélosé) ayant perdu le plus souvent le caractère Thr⁻. Ainsi la plupart de ces clones réverses sont de type MA. Le caractère Met⁻ s'est montré plus stable bien que des cas de réversion aient pu être détectés et le caractère AEC^R s'est montré le plus stable (pas de réversion). Quelques rares cas de double réversion ont aussi été décelés sur les caractères Thr et Met. Certaines souches n'ont pu être conservées par suite d'une réversion trop importante. Le caractère Lys⁻

des souches indicatrices n'a pas non plus donné lieu à une réversion. Le problème majeur posé par les colonies réverses est leur aptitude à pousser plus vite que les colonies à exigences multiples. Cette observation a pu être faite également sur des cultures en continu de Corynebacterium sp. (109) productrices de lysine. Ces cellules réverses prolifèrent et leur nombre dépasse très vite celui des cellules auxotrophes et de ce fait la production de lysine diminue régulièrement en culture continue (109). Cette chute de la productivité s'observe également à partir de cultures sur tube après plusieurs repiquages successifs et même dans certains cas sans perte de caractères d'auxotrophie.

B) Solutions éventuelles :

Ces problèmes de réversion nous ont amené à envisager des solutions afin de pouvoir s'assurer la conservation de souches à usage industriel. Certaines solutions ont pu être utilisées au cours de cette étude et en particulier la lyophilisation en ampoules de ces souches productrices et même des souches indicatrices dès leur isolement. Ce processus doit être automatique car il permet la préservation des cellules productrices avec le moindre risque de les trouver mêlées à des cellules réverses non productrices. Cette lyophilisation se fait à partir de cultures sur milieu de Sano après 18 heures d'incubation. Cette culture est centrifugée et reprise dans une solution de lait écrémé à 10 % (Galliasec) puis réparti stérilement en ampoules spéciales pour être lyophilisée.

Les souches peuvent aussi être maintenues en collection en tubes de gélose inclinée à condition de les vérifier régulièrement et

de les purifier éventuellement. Cette dernière technique nous a ainsi permis de retrouver des souches productrices qui avaient subi une forte réversion (cf.3.5.4). Il est évident que cette possibilité n'est exploitable que si le nombre de cellules réverses n'est pas trop important au regard du nombre de cellules auxotrophes. La conservation de lots de cultures ayant montré une bonne productivité est également envisageable ("Stock Cultures") et peut se faire par congélation rapide à basse température (- 30°C) de fioles ou d'ampoules en présence de substances protectrices comme des peptones ou de la gélatine (90). Cette technique est efficace et d'un emploi facile.

Une autre technique peut consister à rechercher des antibiotiques susceptibles d'empêcher la croissance des cellules prototrophes mais non des cellules auxotrophes. On peut ainsi éviter la prolifération de ces cellules réverses (70,105,109), ce qui a été fait avec l'utilisation de l'érythromycine chez Corynebacterium (109) et pourrait être envisagée chez E.coli par l'examen d'antibiotiques capables de donner le résultat recherché.

3.5.8. RECAPITULATIF :

Les diverses souches productrices de lysine que nous avons pu obtenir dérivent donc toutes d'E.coli selon une filiation que nous avons résumée au début de cette étude afin de rendre l'exposé de celle-ci plus clair. Chaque nouvelle étape de mutagenèse a donc été marquée par un gain dans la productivité de lysine et la meilleure souche de chaque série a subi de façon systématique une nouvelle mutagenèse afin de trouver à nouveau des clones ayant une productivité supérieure à celle-ci.

Les souches de type MTA se sont montrées les meilleures productrices et la souche MTA 153 peut être considérée comme l'aboutissement de toute cette filiation en étant la meilleure productrice de la dernière série. Quelques aspects physiologiques intéressants concernant ces souches productrices ont été étudiés et nous ont permis de mieux comprendre les paramètres intervenant au niveau de leur productivité et d'aborder un aspect de la régulation de leurs biosynthèses au niveau de l'aspartokinase.

3.6. CARACTERES PARTICULIERS DES SOUCHES PRODUCTRICES DE LYSINE :

3.6.1. COMPARAISONS AVEC E.COLI K 10 :

Les souches productrices de lysine pouvaient posséder des caractères originaux par rapport à ceux d'E.coli K 10 aussi une comparaison de leurs caractères a été faite, en particulier concernant leur résistance à l'AEC et à de fortes concentrations de lysine mais aussi une galerie de quelques tests bactériologiques.

A) Galerie de tests bactériologiques:

Les caractères observés sont ceux d'une galerie d'identification d'Entérobactéries classique (8) et du test de Mackenzie (34).

1- Test de Mackenzie:

Ce test permet de caractériser les Coliformes et en particulier E.coli à l'aide d'un milieu spécifique lactosé, bilié au cristal violet et au rouge neutre (34). Nous avons pu remarquer que les souches productrices avaient une morphologie très différente de celle d'E.coli sauvage et semblaient de plus très polymorphes, les cellules étant très nettement plus grosses et beaucoup plus allongées que celles d'E.coli sauvage. Cette morphologie varie avec le

milieu de culture comme pour Brevibacterium (3) et une telle différence de morphologie nous a amenés à vérifier l'appartenance de nos souches .

Le test de Mackenzie s'est révélé être positif par la présence de gaz et d'indole après 24 heures d'incubation en bain-marie à 44°C.

2- Galerie de tests:

Nous ne donnerons ici que le résultat des tests réalisés selon la galerie de détermination de Buttiaux (8) sur E.coli K 10 et sur MTA 144.

Test	K 10	MTA 144
Glucose	+	+
Lactose	+	+
Mannitol	+	+
Saccharose	+	-
Dulcitol	+	+
Salicine	+	-
Glycérol	+	+
Indole	+	+
Gaz	+	+
H ₂ S	-	-
Rouge de méthyle	+	+
Acétone	-	-
Lysine-décarboxylase (Richard)	+	+

Les différences obtenues concernent 3 tests: l'aptitude à utiliser la salicine ou le glycérol et la faible activité lysine-décarboxy-

lase qui est limitée chez MTA 144. Ce dernier test confirme les observations effectuées sur les cultures en milieu de production. L'ensemble de résultats obtenus permettent de caractériser la souche par rapport à E.coli K 10.

B) Résistance à l'AEC et à la lysine:

Nous avons décrit au cours de cette étude la recherche de clones résistant à de fortes concentrations d'AEC et notamment à partir de la deuxième lignée de souches de type MTA (9-117). Ces souches résistent en effet à 2 mg/ml d'AEC de même que toutes les souches qui en dérivent ultérieurement. Les souches précédentes étaient seulement résistantes à 0,2 mg/ml d'AEC. De même de fortes concentrations de lysine qui étaient inhibitrices sur E.coli K 10 et même sur S. marcescens, ne perturbent presque pas la croissance des dernières souches obtenues. Ainsi, sur MTA 144, des cultures en milieu MSB₁ + Thr + Met en présence de lysine à forte concentration, en bain-marie agité à 37°C, donnent après 18 heures de culture les D.O suivantes:

lysine mg / ml	0	5	10	15	20	25
D.O	1,96	1,99	1,92	1,95	1,92	1,85

La croissance d'une souche productrice n'est donc pas perturbée par l'accumulation du métabolite qu'elle synthétise.

3.6.2. COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE ET PRODUCTIVITE DES SOUCHES:

Au cours de cette étude nous avons pu remarquer que si l'on modifie les concentrations des divers constituants du milieu de culture MSB₁, la productivité des souches varie également.

Ces essais ont permis notamment de mettre au point le milieu optimal de productivité (MSB₁-PR) et l'influence de divers substrats ou amino acides sur la productivité des différentes souches a été testée (cf. 3.4 et 3.5). L'examen de ces divers paramètres permet de tirer plusieurs conclusions, en constatant que les meilleures conditions de productivité sont obtenues en fioles de 2 litres et en milieu lactosé à 20 g/l et complétement de 40 mg/l de méthionine et de 80 mg/l de thréonine, en présence de 6 g/l de NH₄ Cl. Ces conditions représentent celles du milieu optimal (MSB₁-PR). Le NH₄ Cl peut être remplacé par de l'acétate d'ammonium et de bonnes conditions d'aération favorisent la production de lysine. Un apport d'homosérine ou d'acide aspartique n'offre aucun avantage.

3.6.3. REGULATION DES BIOSYNTHESES AU NIVEAU DE L'ASPARTOKINASE :

Chez E. coli la biosynthèse de la lysine passe par l'acide aspartique et se trouve soumise à une régulation complexe exposée au début de cette étude.

Nous avons cherché à mettre en évidence, au niveau de l'activité aspartokinase totale, des différences entre les différentes souches productrices qui pourraient permettre de comprendre les raisons de leur productivité au niveau de perturbations de leurs mécanismes de régulation. Nous avons notamment testé l'inhibition de l'aspartokinase par la lysine et la thréonine mais aussi déterminé le taux d'activité enzymatique global sur des lysats bactériens frais.

A) Obtention de lysats bactériens :

La technique de lyse des cellules bactériennes décrite au paragra-

phe 1.1.4.B a été mise au point après plusieurs séries d'essais et peut être utilisée aussi bien sur E.coli que sur S.marcescens et probablement sur toutes les bactéries Gram⁻. Au cours de chaque essai de lyse un témoin est réalisé en ensemencant une boîte de Pétri gélosée (milieu Gélose-Ordinaire ou Tryptose-Agar) avec 0,1 ml de lysat. Les lysats peuvent être congelés (-20°C) et utilisés de nouveau pour des essais de dosage, bien que dans ce cas une partie appréciable de l'activité disparaisse. C'est pourquoi les mesures, en vue d'essais comparatifs et quantitatifs quant à l'activité aspartokinase d'E.coli et de plusieurs souches mutantes productrices, sont effectuées sur des lysats frais, au plus tard 5 heures après la lyse (maintient des lysats en bain de glace).

B) Mesures d'activité aspartokinase :

Les échantillons ayant été soumis à la lyse ont les caractères suivants (36 heures de culture):

souche	pH	D.O	Lys µg/ml
K 10	4,50	13,85	45
MT 231	6,15	11,60	108
2 TA 15	6,55	6,50	449
2 TA 3	5,60	5,35	293
MTA 2	5,50	11,00	1241
MTA 117	6,40	10,70	3550
MTA 144	6,15	14,45	5605

Un dosage de lysine intra-cellulaire (lysine contenue dans les lysats) a permis de mettre en évidence, sur des échantillons

différents, la présence de lysine à une concentration assez élevée:

Souche	pH	D.O	Lys $\mu\text{g/ml}$	
			extracellulaire	intracell.
K 10	5,10	11,20	38	60
MTA 143	6,40	7,80	3129	196
MTA 144	5,80	10,15	9571	368

Les différents lysats sont obtenus dans les mêmes conditions et pour un même temps de culture. On peut ainsi constater que pour une D.O voisine le taux de lysine intra-cellulaire est six fois plus élevé que chez E.coli K 10.

Les dosages d'activité aspartokinase sont effectués dans les conditions expérimentales décrites pour S.marcescens (cf. 1.3.7 et 2.5.2). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité (en présence d'inhibition) par rapport à un essai témoin non inhibé. L'inhibition est obtenue en présence de thréonine ou de lysine à 10^{-2} M.

Inhibiteur	K 10	2TA3	2TA15	MT231	MTA 2	MTA117	MTA144
Lysine	86	98,8	99,4	85,1	100,8	102,5	101,4
Thréonine	51,5	56	59,1	74,3	86,2	98,5	98,0
Lys + Thr	69		85,5				99,4
AEC	79,5			81,3	99,9		100,4

% d'activité aspartokinase en présence d'inhibition.

Ce tableau permet de comprendre quelques aspects de la régulation de ces souches mutantes au niveau de l'aspartokinase, en particulier l'absence totale d'inhibition de son activité par la lysine et même par la thréonine (chez les dernières souches

productrices obtenues. Il est intéressant de noter également l'absence d'inhibition en présence de ces deux amino acides en même temps chez MTA 144 alors que l'inhibition est assez forte chez 2 TA 15 et chez K 10. L'influence de la méthionine n'a pas été testée étant donné sa faible importance (9 % d'inhibition chez E.coli K 12).

La transition entre les souches se fait par l'acquisition d'une résistance à l'AEC ; c'est ainsi que K 10 et MT 231 ont les mêmes caractères alors que MTA 2 a déjà perdu la sensibilité à l'AEC en même temps qu'à la lysine et que la perte de sensibilité à la thréonine apparaît au niveau des meilleures souches sans avoir été recherchée (MTA 117 et 144) et pourrait être un des facteurs responsables du gain de productivité de ces souches. Un essai de comparaison entre la quantité d'enzyme présente dans les lysats de K 10 et de MTA 144 a été réalisé sur des lysats bruts frais (moins d'une heure) et nous ont permis de constater que l'activité brute dosée est triple chez MTA 144 de celle de K 10 (sur des échantillons correctement lysés et à D.O identique pour un temps de culture voisin).

Conclusion :

L'ensemble des résultats obtenus dans cette troisième partie nous permettent de caractériser des souches productrices de lysine chez E.coli et les raisons de cette production de plusieurs façons : ces souches ont leur chaîne de biosynthèse bloquée à deux niveaux (sur la chaîne de la thréonine et de la lysine) et seule la chaîne menant à la lysine peut donc fonctionner. Leur croissance est bonne et rapide sur notre milieu synthé-

tique lactosé et permet d'obtenir des cultures à D.O élevée. Ces souches résistent à l'AEC et nous avons pu démontrer que dans ce cas leur aspartokinase (III) n'est plus sensible à la lysine (dé-rétroinhibition) et ces souches sont insensibles à l'accumulation du métabolite qu'elles synthétisent et excrètent dans le milieu de culture. Nous avons pu également démontrer chez ces souches la perte de sensibilité de l'aspartokinase (I) à la thréonine mais aussi l'absence d'inhibition de celle-ci en présence simultanée de lysine et de thréonine en forte concentration. Ces souches possèdent une activité totale très supérieure à celle de la souche sauvage et qui était triple dans le cas de l'une des meilleures souches (MTA 144).

Ces souches possèdent, entre autres, une faible activité lysine-décarboxylasique par rapport au taux de lysine produite. Leur contenu intra-cellulaire de lysine est élevé et peut atteindre six fois celui de la souche K 10. Pourtant les essais de productivité ont montré qu'un apport d'acide aspartique ou un excès de thréonine ou de méthionine diminuait le taux de lysine produite.

CONCLUSION GENERALE

Notre étude a porté sur divers aspects comparatifs de la physiologie de *S.marcescens* et d'*E.coli* afin de pouvoir dégager les raisons de la résistance de *S.marcescens* à l'AEC, à la canavanine et à de fortes concentrations de lysine.

Cette résistance est liée à un mécanisme de perméabilité cellulaire dans le cas de la canavanine mais non dans le cas de l'AEC. Ainsi il semble qu'il existe chez *S.marcescens* comme chez *E.coli* un système commun de transport de la lysine et de l'arginine, système inductible par la lysine mais non par l'arginine et qui permet également le transport de la canavanine et de l'AEC (-).

La physiologie d'*E.coli* étant bien connue, notre choix s'est porté sur ce dernier pour rechercher l'obtention de souches productrices de lysine.

Pour mener à bien cette tâche difficile nous avons effectué plusieurs séries d'étapes de mutations successives qui nous ont permis d'obtenir des souches exigeantes en méthionine et en thréonine et de plus résistantes à l'AEC, et dont les mécanismes de régulation sont perturbés, en particulier au niveau de l'aspartokinase. Celle-ci est alors insensible à la lysine et à la thréonine à de fortes concentrations.

De telles souches sont capables de synthétiser de grandes quantités de lysine grâce à une activité aspartokinase importante et en présence d'une activité lysine-décarboxylasique réduite^{et}, ont pu être caractérisées à différents niveaux, par rapport à la souche initiale K 10 (-).

Sur notre milieu synthétique lactosé ces souches ont produit plus de 12 g/l de lysine et cette productivité pourra encore être améliorée, soit génétiquement, soit par l'utilisation de milieux industriels plus complexes et en particulier enrichis en lactosérum, bien que d'ores et déjà de telles souches soient exploitables. L'ultime étape de ce travail pourra être la mise au point d'un procédé industriel permettant d'enrichir ce lactosérum directement en lysine et d'en faire un produit utilisable tel quel, pour l'alimentation du bétail.

BIBLIOGRAPHIE

- (1)- ABE (S) TAKAYAMA (K). 1973.
in Microbial Production of Amino acids, p.3-38
Kodansha (Tokyo) & John Wiley and Sons (New York) .
- (2)- ADELBERG (EA) MANDEL (M) CHEING CHING CHEN. 1965.
Biochem. Biophys. Res. Com. , 18 , 788
- (3)- BEKER (M) MEZHINA (G) RUKLISHA (M) VIESTUR (U) SELGA (S)
ALEXANDROVA (M) APSITE (A) SAVENKOV (V). 1973.
Advances in Microbial Engineering.
Biotech. Bioeng. Symposium.,Part 1, 233.
- (4)- BERJONNEAU (AM) THOMAS (D) BROUN (G). 1974.
Path. Biol. , 22 , 497.
- (5)- BLACK (S). 1962.
in : Methods in Enzymology ,Vol. 5, 820 .Academic Press.
- (6)- BLOCK (RJ) WEISS (KW). 1956.
Amino Acid Handbook . C.C.Thomas publ.,Springfield (USA).
- (7)- BURLANT (L) DATTA (P) GEST (H). 1965.
Science, 148 , 1351.
- (8)- BUTTIAUX (R) BEERENS (H) TACQUET (A) .1974.
Manuel de techniques bactériologiques, 4°ed.,Flammarion.
- (9)- CASCIERI (T) MALLETTE (MF). 1973.
Appl. Microbiol., 26 , 975.
- (10)- CASIDA (LE) . 1956.
U.S.Patent. 2771396.
- (11)- CASIDA (LE) BALDWIN (J). 1951.
U.S.Patent. 2771396.
- (12)- CAVALLINI (D) DEMARCO (C) MODOVI (B) AZZONE (G). 1955.
Experientia, 11 , 61.
- (13)- CELIS (TFR) ROSENFELD (HJ) MAAS (WK). 1973.
J.Bacteriol., 116 , 619.
- (14)- CHINARD (FP). 1952.
J.Biol.Chem., 199 , 91.

- (15)- CHING LIANG FAN, MILLER (DL) RODWELL (VW). 1972.
J.Biol.Chem., 247 , 2283.
- (16)- COHEN (GN). 1971.
Le métabolisme cellulaire et sa régulation.
Hermann ed. Paris.
- (17)- COHEN (GN) MONOD (J). 1957.
Bacteriol.Rev., 21 , 169.
- (18)- COHEN (GN) PATTE (JC). 1963.
Cold.Spring.Harbor.Symp., 28 , 513.
- (19)- COHEN (GN) RICKENBERG (H). 1956.
Ann.Inst.Pasteur, 91 , 693.
- (20)- COHEN (GN) STANIER (RY) LEBRAS (G). 1969.
J.Bacteriol., 99 , 791.
- (21)- COUDERT (M) VANDECASTEELE (JP). 1973.
C.R.Acad.Sci., 277 , D , 1245.
- (22)- COUDERT (M) VANDECASTEELE (JP) . 1975.
C.R.Acad.Sci., 280 , D , 129.
- (23)- DAVIS (BD). 1945.
Proc.Natl.Acad.Sci.US , 35 , 1.
- (24)- DESCHAMPS (A). 1972.
Etude bactériologique et mutagenèse sur une souche de
Streptomyces fradiae. D.E.A. Université des Sciences et
Techniques de Lille.
- (25)- DESCHAMPS (A) PLICHON (B) PETITPREZ (A). 1974.
C.R.Acad.Sci., 278 , D , 3007.
- (26)- DOUROS (JD) RAYMOND (L) . 1965.
U.S.Patent. 3219543.
- (27)- DULANEY (EL). 1957.
Can.J.Microbiol., 3 , 467.
- (28)- FALCOZ-KELLY (F) COHEN (GN). 1970.
in : Methods in Enzymology ,Vol. XVII A , 699, Academic Press.
- (29)- FALCOZ-KELLY (F) JANIN (J) SAARI (JC) VERON (M) TRUFFA-BACHI
(P) COHEN (GN) . 1972.
Eur.J.Biochem., 28 , 507.
- (30)- FALKOW (S). 1958.
Amer.J.Clin.Path., 29 , 598.

- (31)- FARHOUDI (H). 1972.
Med.Arm.Distr.Columbia,USA, 41 , 617.
- (32)- GILVARG (C). 1959.
J.Biol.Chem., 234 , 2955.
- (33)- GOLDSCHMIDT (MC) LOCKHART (BM) PERRYK (K). 1971.
Appl.Microbiol., 22 , 344.
- (34)- Institut Pasteur Productions. 1973.
Milieux de cultures. Fiche n° 40 .
- (35)- ISHII (R) OTSUKA (S) SHIIO (I). 1967.
J.Gen.Appl.Microbiol., 13 , 217.
- (36)- JENKINS (SJ) SPARKES (A) JONES-MORTIMER (MC). 1974.
Heredity, 32 , 409.
- (37)- KABACK (HR) STADTMAN (ER). 1966.
Proc.Nat.Acad.Sci.US., 55 , 920.
- (38)- KASE (H) NAKAYAMA (K). 1974.
Agric.Biol.Chem., 38 , 993.
- (39)- KAY (WW) GRONLUND (AF). 1969.
J.Bacteriol., 98 , 116.
- (40)- KEPES (A) COHEN (GN). 1962.
in : The Bacteria ,Vol. IV , 179, Academic Press.
- (41)- KINOSHITA (S). 1959.
Adv.Appl.Microbiol., 1 , 201.
- (42)- KINOSHITA (S). 1972.
Nature, 240 , 211.
- (43)- KINOSHITA (S) NAKAYAMA (K) AKITA (S). 1958.
Bull.Agr.Chem.Soc.Japan, 22 , 176.
- (44)- KINOSHITA (S) NAKAYAMA (K) KITADA (S). 1958.
J.Gen.Appl.Microbiol., 4 , 128.
- (45)- KINOSHITA (S) UDAKA (S) SHIMONO (M). 1957.
J.Gen.Appl.Microbiol., 3 , 193.
- (46)- KISUMI (M) KOMATSUBARA (S) CHIBATA (I). 1971.
J.Bacteriol., 106 , 493.
- (47)- KISUMI (M) KOMATSUBARA (S) CHIBATA (I). 1972.
J.Biochem., 75 , 1065.
- (48)- KISUMI (M) KOMATSUBARA (S) SUGURIA (M) CHIBATA (I). 1972.
J.Bacteriol., 110 , 761.

- (49)- KITA (DA) HUANG (HT). 1958.
U.S.Patent. 2841532.
- (50)- KNAPE (H) BOQUET (PL) ROSCHENTHALER (R). 1972.
F.E.B.S. Letters, 19 , 311.
- (51)- LAFUMA (G) GROS (C) PATTE (JC) . 1970.
Eur.J.Biochem., 15 , 111.
- (52)- LEDERBERG (J) LEDERBERG (EM). 1952.
J.Bacteriol., 63 , 399.
- (53)- LEDERBERG (J) ZINDER (NJ). 1948.
J.Amer.Chem.Soc., 70 , 4267.
- (54)- LELOIR (L) CARDINI (C). 1957.
in : Methods in Enzymology, Vol.III , 843,Academic Press.
- (55)- LENOIR (P). 1973.
Etude d'un procédé d'immobilisation de l'activité enzymatique
D.E.A. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (56)- LODHA (ML) MEHTA (SL) DAS (N) . 1973.
Current.Science, 42 , 388.
- (57)- LU (WW) MALLETT (MF). 1970.
Appl.Microbiol., 19 , 367.
- (58)- LUBIN (M) KESSEL (DH) BUDREAU (A) GROS (JD). 1960.
Biochim.Biophys.Acta., 42 , 535.
- (59)- MARGOLIN () MUKAI (). 1966.
Proc.Nat.Acad.Sci.US., 55 , 282.
- (60)- MARMUR (J). 1963.
in : Methods in Enzymology, Vol.VI , 726, Academic Press.
- (61)- MERELO (M) . 1971.
Industr.Alim.Agr., 88 , 817.
- (62)- MILLER (D) RODWELL (V). 1971.
J.Biol.Chem., 246 , 1765.
- (63)- MIYAJIMA (R) OTSUKA (S) SHIIO (I) . 1968.
J.Biochem., 63 , 139.
- (64)- MONTREUIL (J) SPIK (G). 1963.
Microdosage des glucides. Monographie n°1.Fac.Sci.Lille.
- (65)- MOYED (HS). 1964.
Ann.Rev.Microbiol., 18 , 347.
- (66)- MUNIER (R) COHEN (GN). 1956.
Biochim.Biophys.Acta, 21 , 592.

- (67)- MURGOV (I) ZAJTSEVA (Z). 1973.
Prikl.Biokhim.mikrobiol.,URSS, 9 , 845.
- (68)- NAKAYAMA (K). 1972.
in : Fermentation Technology Today, Proc.of the IV th International Fermentation Symposium, Guozo Terrui ed (Japon).
- (69)- NAKAYAMA (K) . 1973.
in : Genetics of Industrial Microorganisms, 219.
Elsevier Publishing Company.
- (70)- NAKAYAMA (K). 1973.
in : Microbial Production of Aminoacids, 369.
Kodansha (Tokyo) & John Wiley and sons.
- (71)- NAKAYAMA (K) KASE (H) KINOSHITA (S). 1970.
Agric.Biol.Chem., 34 , 282.
- (72)- NAKAYAMA (K) KINOSHITA (S). 1961.
J.Gen.Appl.Microbiol., 7 , 161.
- (73)- NAKAYAMA (K) KINOSHITA (S). 1961.
Nippon Nogei Kagaku Kaishi (Japon), 35 , 119.
- (74)- NAKAYAMA (K) KITADA (S) KINOSHITA (S). 1960.
J.Gen.Appl.Microbiol., 6 , 905.
- (75)- NAKAYAMA (K) KITADA (S) KINOSHITA (S). 1961.
J.Gen.Appl.Microbiol., 7 , 145.
- (76)- NAKAYAMA (K) TANAKA (H) HAGINO (H) KINOSHITA (S). 1966.
Agric.Biol.Chem., 30 , 611.
- (77)- NUBEL (RC). 1961.
U.S.Patent. 2968594.
- (78)- OXENDER (DL). 1972.
in : Metabolic Pathways, Vol.V , 133. Academic Press.
- (79)- PATTE (JC) COHEN (GN). 1965.
Biochim.Biophys.Acta, 99 , 557.
- (80)- PATTE (JC) LEBRAS (G) COHEN (GN). 1967.
Biochim.Biophys.Acta, 136 , 245.
- (81)- PATTE (JC) TRUFFA-BACHI (P) COHEN (GN). 1966.
Biochim.Biophys.Acta, 128 , 426.
- (82)- PENROSE (WR) ZAND (R) OXENDER (DL). 1970.
J.Biol.Chem., 245 , 1432.
- (83)- PIPERNO (JR) OXENDER (DL). 1966.
J,Biol.Chem., 241 , 5732.

- (84)- PIPERNO (JR) OXENDER (DL). 1968.
J.Biol.Chem., 243 , 5914.
- (85)- PLICHON (B) LUCQUIN (M) GUILLAUME (J). 1971.
Ann.Inst.Pasteur.Lille, 22 , 37.
- (86)- RICHARD (C). 1968.
Ann.Inst.Pasteur, 114 , 425.
- (87)- RICHAUD (F) COHEN (GN). 1968.
Biochim.Biophys.Res.Com., 30 , 45.
- (88)- RICHMOND (MH). 1959.
Biochem.J., 73 , 261.
- (89)- RICHMOND (MH). 1962.
Bacteriol.Rev., 26 , 398.
- (90)- RIVIERE (J). 1975.
Les applications industrielles de la microbiologie.
Masson et Cie, editeurs, Paris.
- (91)- ROOS (P). 1968.
Mise au point d'une unité pilote de fermentation.
D.E.A. Fac.Sci.Lille.
- (92)- ROSEN (B) . 1971.
J.Biol.Chem., 246 , 3653.
- (93)- ROSEN (B). 1973.
J.Bacteriol., 116 , 627.
- (94)- SAFONOVA (N) VOLKOVA (M) KOTOVA (G) GOLULOBOV (A). 1971.
Prikl.Biokhim.Microbiol.,URSS, 7 , 170.
- (95)- SANCHEZ-MARROQUIN (A) LEDEZMA (M) BARREIRO (J). 1971.
Biotech.Bioeng., 13 , 419.
- (96)- SANCHEZ-MARROQUIN (A) LEDEZMA (M) CARRERO (R). 1970.
Appl.Microbiol., 20 , 687.
- (97)- SANO (K) SHIIO (I). 1967.
J.Gen.Appl.Microbiol., 13 , 349.
- (98)- SANO (K) SHIIO (I). 1969.
J.Gen.Appl.Microbiol., 15 , 267.
- (99)- SANO (K) SHIIO (I). 1970.
J.Gen.Appl.Microbiol., 16 , 373.
- (100)- SANO (K) SHIIO (I). 1971.
J.Gen.Appl.Microbiol., 17 , 97.

- (101)- SCHWARTZ (J) MAAS (W) SIMON (E). 1959.
Biochim.Biophys.Acta, 32 , 582.
- (102)- SETO (TA) . 1962.
U.S.Patent. 3056729.
- (103)- SETO (K) HARADA (T). 1969.
Hakko Kogaku Zasshi (Japon), 47 , 558.
- (104)- SHER (IH) MALLETT (MF). 1954.
Arch.Biochem.Biophys., 52 , 331.
- (105)- SHIGETO (M). 1962.
J.Agric.Chem.Soc., 36 , 809.
- (106)- SHIIO (I). 1973.
in : Genetics of Industrial Microorganisms, 249.
Elsevier Publishing Company.
- (107)- SHIIO (I) MIYAJIMA (R). 1969.
J.Biochem., 65 , 849.
- (108)- SIMON (P) MEUNIER (R). 1970.
Microbiologie industrielle. Masson et Cie, éditeurs, Paris.
- (109)- SLEZAK (J) SIKYTA (B) PLACHY (B) BRECKA (A). 1969.
in : Continuous Cultivation of Microorganisms.Symposium.
(New-York), 505. I.Malek. éditeur. Academic Press.
- (110)- SOBER (H) HARTE (R). 1970.
Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology.
Chemical Rubber co. publishers.
- (111)- SODA (K) MORIGUCHI (M). 1971.
in : Methods in Enzymology, Vol.XVII B , 677, Academic Press.
- (112)- STADMAN (E) COHEN (GN) LEBRAS (G) DEROBICHON-SZULMAJSTER (H)
1961. J.Biol.Chem., 236 , 2033.
- (113)- TAYLOR (W). 1961.
Appl.Microbiol., 9 , 487.
- (114)- THEZE (J) MARGARITA (D) COHEN (GN) BORNE (F) PATTE (JC).1974.
J.Bacteriol., 117 , 133.
- (115)- THEZE (J) ST GIRONS (I). 1974.
J.Bacteriol., 118 , 990.
- (116)- TRUFFA-BACHI (A) COHEN (GN). 1966.
Biochim.Biophys.Acta, 113 , 531.

- (117)- TRUFFA-BACHI (P) COHEN (GN) . 1970.
in : Methods in Enzymology, Vol.XVII A , 694,Academic Press.
- (118)- TRUFFA-BACHI (P) GUISO (N) COHEN (GN) THEZE (J) BURR (B).
1975.
Proc.Natl.Acad.Sci.US., 72 , 1268.
- (119)- VERON (M) FALCOZ-KELLY (F) COHEN (GN). 1972.
Eur.J.Biochem., 28 , 520.
- (120)- WEBB (JL). 1966.
in : Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol.II, 245.
Academic Press .
- (121)- WHITE (PJ) KELLY (B) SUFFLING (A) WORK (E). 1964.
Biochem.J., 91 , 600.
- (122)- WILFERT (JN) BARRETT (F) EWING (W) FINLAND (M) DASS (E).
1970.
Appl.Microbiol., 19 , 345.
- (123)- WILLIAMS (RP). 1973.
Appl.Microbiol., 25 , 396.
- (124)- WILLIAMS (RP) GOTT (C) QADRI (S) SCOTT (S). 1971.
J.Bacteriol., 106 , 438.
- (125)- WILSON (OH) HOLDEN (JT). 1969.
J.Biol.Chem., 244 , 2737.
- (126)- WORK (E). 1957.
Biochem., 67 , 416.
- (127)- YUGARI (Y) GILVARG (C). 1962.
Biochim.Biophys.Acta, 62 , 612.
- (-)- Deux articles reprenant certains résultats de cette thèse
sont en préparation.L'un porte sur la résistance de S.marces-
cens à l'AEC et la Canavanine et sera présenté aux Annales de
Microbiologie, et l'autre porte sur les particularités métabo-
liques des souches d'E.coli productrices de lysine et sera
présenté à l'European Journal of Applied Microbiology.

