

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
INATAA

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Alimentaires

**Production de lysine par une souche mutée homoserine⁽⁻⁾ de
Corynebacterium glutamicum :
Effets du marquage génétique et du milieu de culture**

Par : Djamel TRAD KHODJA

Jury composé de :

Président : Mr BOULAHROUF A.

Rapportrice : Mlle KHARROUB K.

Co-Encadreur : Mr LINDLEY N.D.

Examineurs : Mr ARHAB R.

Melle AMOURACHE L.

Mr DJABRI B.

Professeur (Université Frères Mentouri)

Professeur (Université Frères Mentouri)

Directeur de Recherche CNRS Toulouse

Professeur (Université Larbi Ben M'hidi)

M.C.A (Université Frères Mentouri)

M.C.A (Université Larbi Tebessi)

soutenu le: 28/10/2015

Remerciements

Je suis extrêmement reconnaissant à Monsieur ND LINDLEY , de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de ses conseils avisés et qui a accepté, sans hésitation, de poursuivre la direction de ce travail.

Je le remercie aussi pour son soutien moral car il était toujours là dans les moments difficiles.

Mes remerciements vont à Melle K. KHARROUB qui a bien voulu être rapporteur de ce travail ainsi que ses encouragements.

Que Monsieur le Professeur BOULAHROUF trouve ici toute ma gratitude pour avoir bien voulu être président de ce jury.

Que Melle AMOURACHE L. trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Que Mr DJABRI trouve ici toute ma gratitude pour avoir accepté de se déplacer afin de faire partie du jury.

Mes vifs remerciements vont à Mr ARHAB qui n'a pas hésité une seconde pour faire partie de ce jury ainsi que ses encouragements tout au long de ce travail.

SOMMAIRE

Introduction générale SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-	Généralités	4
II-	Historique	4
III-	Généralités sur les acides aminés	7
	III-1- Sources des acides aminés	8
	III-1-1- Sources exogènes	8
	1-Besoins quantitatifs	9
	2-Besoins qualitatifs	10
	III-1-2- Sources endogènes	11
IV-	Rôles des acides aminés	11
	IV-1- Rôles de quelques acides aminés essentiels	12
	VI-2- Rôles de quelques acides aminés non essentiels	12
V-	Economie de production des acides aminés par fermentation	13
VI-	Utilisations des acides aminés	16
	VI-1- Utilisations des acides aminés en alimentation	16
	VI-1-1- Utilisation en alimentation humaine	16
	VI-1-2- Utilisation en alimentation animale	19
	VI-2- Utilisations médicales et industrielles	22
	VI-2-1- Utilisations médicales	22
	VI-2-2- Utilisations industrielles	22
VII-	Procédés de production des acides aminés	23
	VII-1 Synthèse chimique	23
	VII-2 Extraction à partir des hydrolysats de protéines	24
	VII-3- Synthèses biochimiques	25
	VII-3-1- Production des acides aminés par conversion	26

	VII-3-2- Production par fermentation directe -----	28
VIII-	Production microbiologique des acides aminés -----	30
	VIII-1- Microorganismes producteurs des acides aminés -----	30
	VIII-1-1- Caractéristiques des bactéries corynéformes -----	32
industriel	VIII-1-2- Taxonomie et écologie des corynébactéries d'intérêt -----	38
	VIII-1-2-1- Taxonomie générale des corynébactéries -----	38
culturelles	VIII-1-2-2- Taxonomie d'après les caractéristiques morphologiques et -----	40
	VIII-1-2-3- Taxonomie d'après les caractères structuraux -----	41
	VIII-2- Facteurs influençant la croissance et la viabilité des	
	bactéries corynéformes -----	42
	VIII-2-1- Biotine -----	42
	VIII-2-2- Sources d'azote -----	43
	VIII-2-3- Sources de carbone -----	43
	VIII-2-4- Sels minéraux -----	44
	VIII-2-5- Antibiotiques -----	44
	VIII-2-6- Effets des conditions de culture -----	44
	VIII-2-6-1- Action du pH -----	45
	VIII-2-6-2- Action de la température -----	45
	VIII-2-6-3- Action de l'oxygène -----	46
	VIII-2-6-4- Action de la pression osmotique -----	47
	VIII-3- Voies de biosynthèse des acides aminés -----	48
	VIII-3-1- Famille du glutamate -----	50
	VIII-3-2- Famille du pyruvate -----	51
	VIII-3-3- Famille de l'aspartate -----	52
	VIII-4- Mécanismes de régulation de la biosynthèse	
	des acides aminés -----	54
	VIII-4-1- Régulation du métabolisme -----	55
	VIII-4-1-1- Rétro-inhibition -----	56

VIII-4-1-2- Répression	59
VIII-4-2- Perméabilité membranaire	59
VIII-4-3- La régulation de la biosynthèse de la lysine chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	60
VIII-5- Amélioration des souches en vue de la surproduction des acides aminés	61
VIII-5-1- Types de mutants utilisés pour la surproduction des acides aminés	62
VIII-5-1-1- Mutants auxotrophes	62
VIII-5-1-2- Mutants de régulation	64
VIII-5-1-3- Mutants auxotrophes de régulation	64
VIII-5-2- Améliorations des souches par génie génétique	65

MATERIEL ET METHODES

I- Isolement de souches bactériennes à partir de substrats naturels	66
I.1. Prélèvement des échantillons	66
I.2. Préparation des échantillons	66
I.3. Ensemencement et isolement des souches	66
I.4. Sélection des souches isolées	67
I.4.1. Caractéristiques morphologiques	67
I.4.2. Croissance sur divers milieux de culture	67
I.4.3. Mise en évidence de la production des acides aminés	67
I.4.4. Mise en évidence de l'exigence en biotine	68
I.4.5. Tests d'identification physiologiques et biochimiques	68
A. Effet de la température	68
B. Type respiratoire	69

C. Tests de sporulation	69
D. Test de mobilité	69
E. Recherche des enzymes respiratoires	69
F. Caractérisation de divers types fermentaires	70
G. Dégradation des glucides	70
H. Etude des intermédiaires de métabolisme	71
I. Etude du métabolisme azoté	72
I.4.6. Test spécifique de <i>Brevibacterium</i>	75
II- Mutation et sélection des mutants	75
II.1. Incubation des mutants par un agent mutagène chimique (Ethyl Methane Sulfonate - EMS)	75
II.1.1. Préparation de la suspension	75
II.1.2. Induction proprement dite (Mise en contact avec l'agent mutagène : EMS)	76
II.1.3. Stabilisation des mutants	77
II.2. Criblage et sélection des mutants	78
III- Mise en évidence de la production des acides aminés par les mutants obtenus	82
IV- Calcul des taux de croissance des souches mutées et sauvages	86
IV-1- Détermination de la concentration en biomasse	87
IV-1-1- Par la détermination du poids	87
IV-1-2- Par turbidimétrie	87
IV-2- Dosage du glucose consommé au cours de la fermentation ---	88
IV-3- Dosage de la lysine produite par la souche mutée	89
IV-3-1- Préparation des solutions	89
IV-3-2- Préparation de la courbe d'étalonnage	90

V-	Etude de l'effet de la source de carbone sur la productivité en lysine et la croissance de la souche mutée -----	91
VI-	Etude de l'influence de l'acétate sur la productivité en lysine ainsi que la croissance de la souche -----	92
	VI-1- Préparation des milieux de culture -----	92
	VI-2- Suivi de fermentation -----	93
VII-	Etude de l'influence de la pression osmotique sur la productivité en lysine et la viabilité des deux souches mutée et sauvage -----	93
VIII-	Effets des quantités de thréonine et de méthionine sur la production de lysine et la croissance de la souche -----	95
	VIII-1- Préparation des milieux de culture -----	95
	VIII-2- Ensemencement du milieu et suivi de fermentation -----	96
IX-	Influences de l'ajout de lysine sur la productivité de la souche -----	96
	IX-1- Milieu de fermentation -----	96
	IX-2- Suivi de la fermentation -----	97
X-	Calcul des flux métaboliques -----	97

RESULTATS ET DISCUSSION

I-	Sélection des souches isolées -----	99
	I-1- Caractéristiques morphologiques -----	99
	I-2- Croissance sur divers milieux de culture -----	100
	I-3- Mise en évidence de la production des acides aminés -----	101
	I-4- Mise en évidence de l'exigence des bactéries corynéformes pour la biotine -----	103
	I-5- Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées -----	103

	I-6-Test spécifique de <i>Brevibacterium</i>	109
II-	Mutation et sélection des mutants	109
	II-1- Résultats de la mutation	109
	II-2- Analyse de la mutation	110
	II-2-1- Calcul de la fréquence de la totalité des mutants obtenus ---	112
	II-2-1-2- Calcul de la fréquence des mutants auxotrophes	112
	II-3- Criblage et sélection des mutants	113
III-	Vérification des auxotrophies (Résultats des CCM)	119
	III-1- Acide aminé produit par les mutants exigeants en valine ---	119
	III-2- Acides aminés produits par les mutants exigeants en alanine --	121
	III-3- Acides aminés produits par les mutants exigeants	
	en méthionine	123
	III-4- Acides aminés produits par les mutants exigeants	
	en thréonine	125
	III-5- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾	127
	III-6- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, méthionine⁽⁻⁾	129
	III-7- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾	131
	III-8- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾ et thréonine⁽⁻⁾	133
	III-9- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾	135
	III-10- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾	137
	III-11- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe méthionine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾	139

III-12- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe valine ⁽⁻⁾ ,alanine ⁽⁻⁾	141
III-13- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine et alanine	143
III-14- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine et valine	145
III-15- Acides aminés produits par les mutants exigeants en méthionine, valine et isoleucine	147
III-16- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine, valine et isoleucine	149
III-17- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, valine, Isoleucine et alanine	151
III-18- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine, valine, isoleucine et alanine	153
IV- Taux de croissance des souches mutées et sauvages	159
IV- 1- Cinétique de croissance des deux souches	159
VI -2- Taux de croissance des souches mutée et sauvage	160
VI- 2- 1- Consommation du glucose	162
VI- 2- 2- Dosage de la lysine produite	163
V- Etude de l'effet de la source de carbone sur la productivité en lysine et la croissance de la souche mutée	164
VI- Etude de l'influence de l'acétate sur la productivité en lysine ainsi que la croissance de la souche	167
VI - 1 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le premier milieu de culture à base de glucose et de sulfate d'ammonium	167
VI - 2 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le second milieu de culture à base de glucose, d'acétate d'ammonium et de sulfate d'ammonium.....	168
VI -3 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le troisième milieu de culture à base d'acétate d'ammonium et de sulfate d'ammonium----	169

VI – 4 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le quatrième milieu de culture à base d’acétate de sodium et d’acétate d’ammonium -----	170
VII - Etude de l’influence de la pression osmotique sur la productivité en lysine et la viabilité des deux souches mutée et sauvage -----	171
VII- 1 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le premier milieu -----	171
VII- 2 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 2 ^{ème} milieu -----	172
VII- 3 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 3 ^{ème} milieu -----	173
VII- 4 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 4 ^{ème} milieu -----	175
VIII – Etude de l’effet de la quantité de thréonine et de méthionine sur la production et la croissance de la souche mutée -----	177
VIII – 1 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le premier milieu -----	177
VIII – 2 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le second milieu -----	178
VIII – 3 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le troisième milieu -----	180
VIII – 4 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le quatrième milieu -----	182
VIII – 5 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le cinquième milieu -----	183
IX- Influence de l’ajout de lysine sur la productivité de la souche- 185	
IX – 1 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le premier milieu sans lysine -----	185
IX – 2 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 10 g/l de lysine -----	186

IX – 3 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 20 g/l lysine	186
IX – 4 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 30 g/l lysine	187
IX – 5 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 40 g/l lysine	188
IX – 6 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 50 g/l lysine	188
X- Calcul des flux métaboliques	189
XI- Discussion générale	192
CONCLUSION.....	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201
ANNEXES	

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I – GENERALITES

Le terme « protéine » provient du Grec « proteno », signifiant je prends la première place, (BIESALSKI et GRIMM, 2001 ; CHIKHI et BENSEGUENI, 2002). Dans presque tous les aliments, il existe des protéines, mais de nature différente (JBERNIER et al., 1988), ce sont des nutriments particulièrement importants, représentant 15 à 25 % de la matière sèche des aliments.

L'homme en consomme chaque jour environ 60 à 100 g (BERTAND et VIROBEN, 1985 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003). Ce sont des substances organiques d'origine animales ou végétales qui forment la trame des structures cellulaires de l'organisme. Les protéines devraient représenter 15 % de notre ration alimentaire quotidienne (MONTIGNAC, 1991 ; WEIL, 1994). Elles interviendraient sur des fonctions intéressantes comme la satiété, le contrôle de la glycémie, la résistance à l'insuline, les fonctions du système immunitaire, la décalcification osseuse ou encore la fonte musculaire (TOME, 2008).

Les protéines assurent un rôle structural de participation au renouvellement des tissus de l'organisme ainsi que de nombreuses fonctions physiologiques ; par exemple sous la forme d'enzymes digestives, d'hémoglobine, d'hormones, de récepteurs et d'immunoglobuline (BOUVIER *et al.*, 2010).

Leur rôle nutritionnel est de fournir des acides aminés, de l'azote et de l'énergie (TOME, 2009).

Ce sont de grosses molécules constituées de nombreux acides aminés qui en forment l'élément de base (MONTIGNAC, 1991). IL est généralement admis qu'il y a huit acides aminés indispensables qui doivent être présents dans la nourriture que nous mangeons, ce sont : Isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et valine (VOET et VOET, 1998).

II – HISTORIQUE

Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines qu'elles soient végétales ou animales (LETUTOUR, 1989), elles occupent dans le monde vivant une place importante. Ceux-ci sont de connaissance relativement récente, les vingt plus importants n'ont été caractérisés qu'entre 1820 (glycocolle par BRACONNOT) et 1935 (thréonine par ROSE) (LUISOT, 1980 ; LOOS et al., 2001).

Jusqu'à la fin du siècle dernier et le milieu de ce siècle, les acides aminés n'étaient obtenus que par synthèse chimique ou par extraction à partir des hydrolysats des protéines (PLACHY, 1984 ; KINOSHITA et al., 1985), ainsi ces méthodes ne servaient qu'aux besoins de simple expérimentation (KINOSHITA et al., 1985).

En 1908, IKEDA a découvert l'acide glutamique sous la forme du L-glutamate, monosodique (KINOSHITA et TANAKA, 1972 ; HIRASAWA et al., 2001). Ce dernier est un acide aminé non essentiel qui est principalement utilisé en alimentation humaine (MARQUET et al., 1986 ; PONS et al. ; 1993 ; DUDECK, 2003).

Les asiatiques utilisent traditionnellement dans leur alimentation des algues de la famille des laminaires pour renforcer le goût propre de leurs aliments (CHASSAGNOLE et al., 2003).

IKEDA a montré que les propriétés gustatives de ces algues étaient due à leur forte teneur en L-glutamate de sodium (SA, 1987 ; PONS et al., 1993 ; MOLL et MOLL, 1998), qui est de loin l'exhausteur de goût le plus répandu sur le marché mondial (MOLL et MOLL, 1998).

Depuis cette découverte, les demandes des industries alimentaires ont été de plus en plus énormes à travers le monde, en particulier durant la 2^{ème} guerre mondiale ; (HIRASAWA et al., 2001).

A la fin des années cinquante des chercheurs japonais ont mis au point un procédé pour la préparation de l'acide glutamique et plus tard la lysine (KINOSHITA et NAKAYAMA, 1978).

En 1957, le premier procédé de fermentation pour la production industrielle des acides aminés par les micro-organismes a été décrit par KINOSHITA et al. Des cultures ont été utilisées pour la production de l'acide glutamique puis de la L-Lysine

(KIKUCHI et NAKAO, 1986 ; GUYONVARCH, 1993 ; LESSARO et SINSKY, 2003). Le développement de cette production a été stimulé par une demande croissante en acide glutamique, lequel a été produit par les japonais en 1909 en rapport avec l'utilisation de cet acide aminé comme un moyen pour rehausser le goût des plats traditionnels du Japon (KINOSHITA, 1972 ; KWINN, 2003 ; LESSARO et SINSKY, 2003).

Comme la demande pour le glutamate augmente, des processus plus performant que les anciennes méthodes sont recherchées (HIRASAWA et al., 2001).

En 1960, des études fondamentales et appliquées utilisant le glucose et la mélasse comme source de carbone étaient extrêmement réussites dans la détermination des conditions de la fermentation élucidant les mécanismes d'accumulation d'acide glutamique et régulant la perméabilité membranaire de ce dernier (KIKUCHI et NAKAO, 1986 ; KWINN, 2003).

La production des acides aminés par fermentation est devenue une réalité industrielle après la découverte d'un producteur efficace d'acide glutamique *Micrococcus glutamicus* appelé plus tard *Corynebacterium glutamicum* par KINOSHITA et al., en 1957 (KHACHATOURIANS, 1995 ; MORITZ et al., 2000 ; HALL et al., 2003) qui est le meilleur producteur (MELAOUENE, 1993), suivi de peu par ASAHI et al. En 1979 en décrivant des souches productrices d'acide glutamique (GLANEMANN et al., 2003).

D'importante activité de recherche ont été concentrée sur la production microbienne des acides aminés (SAUVAGEOT, 1984).

La première raison de ces efforts est l'espoir d'améliorer la valeur nutritionnelle des protéines végétales, bon marché, avec des acides aminés essentiels (RADMACHER et al., 2002).

Il se trouve que la plupart des souches isolées de la nature ne peuvent pas produire de grande quantité d'acides aminés à l'exception de quelques un (Val, ala, leucine), à cause de la régulation du métabolisme cellulaire évitant donc le gaspillage des métabolites microbiens (SANO et SHIIO, 1967 ; NAKAYAMA, 1982).

Pour accumuler dans le milieu des quantités importantes d'acides aminés, il est parfois nécessaire de modifier le métabolisme cellulaire ou la régulation du métabolisme (KHACHATOURIANS, 1995 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

La régulation du métabolisme cellulaire consiste surtout dans la rétro-inhibition et la répression, qui évitent les surproductions des métabolites primaires comme les acides aminés et les nucléotides (NAKAYAMA, 1982 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

L'existence de ces phénomènes de régulation a été clarifiée au moment de l'isolement de *Corynebacterium glutamicum* et sont maintenant très bien connues (NAKAYAMA, 1982 ; GLANEMANN et al., 2003).

La modification du métabolisme cellulaire exige une bonne connaissance de la voie de biosynthèse des acides aminés ce qui a contribué d'une façon considérable au développement du processus de fabrication (KHACHATOURIANS, 1995).

Escherichia coli a été largement utilisée pour la bonne connaissance de sa biologie moléculaire et de l'utilisation des techniques de l'ADN recombiné, mais on a trouvé que *Corynebacterium glutamicum* était d'un meilleur intérêt dans la production des acides aminés (KHACHATOURIANS, 1995 ; DELAUNAY et al., 2003).

Par la suite, NAKAYAMA et al., (1961) ont décrit des mutants auxotrophes de *Corynebacterium glutamicum* capables d'excréter de la lysine, obtenus à partir de souches productrices d'acides glutamique (PONS et al., 1993 ; MARX et al., 2003).

Plus tard un autre processus utilise un mutant de régulation de *Brevibacterium flavum* qui est développé par la compagnie AJINOMOTO. Récemment, ces deux processus impliqués dans la préparation de l'acide glutamique et de la lysine par des moyens de fermentation à l'échelle industrielle, le succès de la biochimie et de la génétique dans la clarification du mécanisme de biosynthèse et de la régulation ont rendu possible les procédés de fabrication d'un grand nombre d'acides d'aminés présents dans les protéines (PLACHY, 1984).

A l'heure actuelle, des procédés de fermentation ont été décrits pour pratiquement tout les acides aminés (PONS et al., 1993 ; HIRASAWA et al., 2001 ; KWINN , 2003). Ces derniers peuvent être produit par diverses souches mutantes de

Corynebacterium, *Brevibacterium* ou *Arthrobacter* (LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990). La première raison de cet effort est l'espoir d'améliorer la valeur nutritionnelle des protéines végétales, bon marché, par l'incorporation des acides aminés essentiels (KINOSHITA et NAKAYAMA, 1979 ; DELAUNAY et al., 2001).

La principale motivation de ces efforts est la production de protéines alimentaires capables de compléter, voir de remplacer les protéines animales ou végétales (MEYER et al., 2000).

III – GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES :

Plus de 250 acides aminés différents sont actuellement répertoriés, toute fois, toutes les protéines (qu'elles soient d'origine bactérienne, végétale ou animale) sont constituées à partir d'un groupe de 20 acides aminés. Ils sont qualifiés d'acides aminés standard (ALINS et LINDEN, 1997 ; MASSON, 2002 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

Ces vingt acides aminés, sont les unités structurales de la plupart des protéines, on les a nommé acides aminés, car ce sont des substances organisées autour d'un atome de carbone portant la fonction acide (COOH) ; la fonction basique – NH₂ (d'où le nom acide aminé), un atome d'hydrogène et un radical R (ADRIAN et al., 1981, DUPIN et al ; 1992 ; PASCAUD, 1999) qui diffère pour chaque acide aminé. Ils ont pour structure moléculaire commune :

- Une fonction carboxylique
 - Une fonction amine primaire
 - Un radical dont la composition détermine la nature de l'acide aminé.
- } portées par le carbone α d'où le terme parfois rencontré d'acide α -aminé

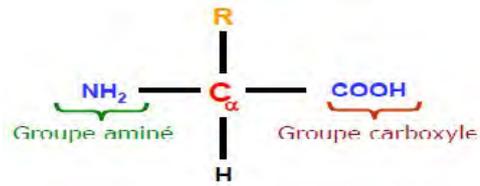


Figure 1 : Structure générale des acides aminés (SEVE, 2010)

Hormis dans la glycine, l'atome α -carbone est chiral (asymétrique), il possède quatre groupement différents fixés chimiquement, donc les acides aminés peuvent exister comme paires de stéréo-isomères (D et L) optiquement actifs, cependant on ne trouve que les L-isomères dans les protéines (TURNER et al., 2000).

III-1 – Les sources des acides aminés :

Généralement une molécule a plusieurs origines et dérive de divers précurseurs. Ainsi une protéine, macro polymère d'acides aminés, est synthétisée en partie à partir des acides aminés apportés par les protéines des aliments (précurseurs exogènes), en partie à partir des acides aminés résultant de la dégradation des protéines cellulaires pré-existantes (précurseurs endogènes) (PASCAUD, 1999).

III-1-1- Sources exogènes (l'alimentation protéique)

Les sources des protéines sont généralement des produits d'origine animale et végétale. Cependant les protéines d'origine végétale sont pauvre en acides aminés indispensables, contrairement aux protéines d'origine animale qui en sont riches et équilibrées (JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

Pour l'ensemble des populations humaines, ce sont les sources végétales qui fournissent la majorité des protéines alimentaires (50 à 60 % par les céréales, 20 % par les tubercules), alors que les protéines animales ne représentent que 20 à 25 %.

Mais la répartition est très différente selon le niveau de vie et le degré d'industrialisation. Environ 50% des protéines sont d'origine animale dans les pays riches, contre moins de 20% dans le tiers monde (JACCOTO et CAMPILLO, 2003). A l'occasion du renouvellement des protéines corporelles, certains acides aminés peuvent être synthétisés à partir des nutriments carbonés et des groupements NH_2 fournis par le métabolisme intermédiaire, d'autres ne le sont que très lentement ou ne peuvent l'être ; ces dernières sont « indispensables » et toute ration équilibrée doit les apporter (JACQUOT, 1999).

L'alimentation doit donc couvrir les besoins qui sont à la fois quantitatifs et qualitatifs.

III-1-1-1- Besoins quantitatifs

Les études sur les besoins nutritionnels et les apports recommandés ont été faites par des personnes hautement compétentes et qualifiées (DUPIN et MOREAU, 1981).

Un adulte a un besoin minimum de 10 à 15 g d'azote protéique par jour, ces quantités augmentent dans la période de croissance, au cours de la grossesse et dans les circonstances pathologiques.

Le tableau n° 1 expose les besoins de l'enfant et de l'adulte en acides aminés indispensables (en mg/kilocalorie/jour), le besoin a deux justifications : renouvellement des protéines (entretien) chez l'adulte et croissance chez l'enfant (PASCAUD, 1999).

Tableau n° 1 : Les besoins de l'enfant et de l'adulte en acides aminés indispensables (mg/kilocalorie/jour) (ADRIAN et al., 1981 ; CHEFTEL et al., 1992,

PASCAUD 1999)

Acide aminé indispensable	Enfant d'un an	Enfant de 5 ans	Homme adulte
Histidine	28	0	0
Leucine	160	25	14
Isoleucine	70	18	10
Lysine	103	22	12
Méthionine + Cystéine	58	24	13
Phénylalanine + Tyrosine	125	25	14
Thréonine	87	13	7
Tryptophane	17	7	4
Valine	93	18	10

III-1-1-2- Besoins qualitatifs

Certains acides aminés doivent obligatoirement être présents dans la ration alimentaire, pour assurer une croissance normale, et le maintien des tissus chez l'adulte.

Ces acides aminés essentiels correspondent aux acides aminés dont l'organisme humain est incapable de faire la synthèse (ANONYME^b, 2003 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003) ; ce sont les acides aminés « indispensables » (PILARDEAU, 1985 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

Les protéines ingérées auront alors d'autant plus de valeurs qu'elles renfermeront ces acides aminés (supériorité des protéines animales par rapport aux protéines végétales).

Chez l'homme les acides aminés indispensables sont au nombre de huit ; se sont :

- Les acides aminés strictement indispensables :

- La leucine.
- La lysine.
- L'isoleucine.
- La méthionine.
- La phénylalanine.
- La valine.
- Le tryptophane.

(POLONOVSKI et al., 1973 ; ADRIAN et al., 1981 ; CHEFTEL et al., 1985 ; STARON^a, 1991 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

D'autres sont potentiellement indispensables dans certaines circonstances physiologiques ou pathologiques (JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

- Acides aminés potentiellement indispensables :

Histidine (en période de croissance)

Lysine Tyrosine Taurine Glycine

Arginine (en période de croissance) Glutamine Proline

- Acides aminés non indispensables :

Acide aspartique

Acide glutamique

Alanine

Cystéine

Asparagine

Ornithine

Sérine

(STARON^a, 1991 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003)

MADER (2002) propose la classification suivante :

AAs essentiels	AAs essentiels	semi-essentiels	AAs non essentiels
- Isoleucine	- Histidine	- Alanine	
- Leucine	- Arginine	- Acide aspartique	
- Lysine	- Tyrosine	- Acide glutamique	
- Méthionine	- Cystéine	- Glycine	
- Phénylalanine		- Proline	
- Thréonine		- Sérine	
- Tryptophane		- Ornithine	
- Valine		- Citreulline	

III-1-2- Sources endogènes

Chez l'adulte à l'entretien, l'usure des protéines corporelles correspond à la dépense endogène spécifique d'azote qui a la signification inéluctable du métabolisme de base et lui est contingente : cette dépense est d'environ 2mg d'azote par kilocalorie basale dans toute cellule animale (JACQUOT, 1999, JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

La libération des acides aminés s'effectue à partir des protéines tissulaires, ou à partir d'un pool d'acide aminé et la synthèse de certains d'entre eux « acides aminés non indispensables »

(JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

IV – ROLE DES ACIDES AMINES

Les acides aminés sont indiscutablement les nutriments fondamentaux indispensables. A l'origine, ce sont des constituants des protéines qui comptent parmi les substances constitutives essentielles de la matière vivante, servant à l'édification, au renouvellement et à la réparation des cellules (BOUSSABOUA, 2002).

Les acides aminés constituent également des agents de structure irremplaçables des muscles, mais aussi des neurotransmetteurs, des chromosomes, des anticorps, des récepteurs et de certaines hormones, et sont impliqués dans de nombreuses synthèses (BOUSSABOUA, 2002).

IV- 1- Rôle de quelques acides aminés essentiels (Tome,2009)

- **L'isoleucine** : c'est un anti-stress, il a un rôle cétogénique et glyco-génique.
- **La leucine** : c'est un anti-stress, joue un rôle cétogénique, un excès en leucine exacerbe la pélagre (carence en B₃ par stimulation de son élimination).
- **La valine** : c'est un anti-stress, glyco-génique, serait un des coupables des allergies alimentaires et des intolérances en lien avec une sub-carence en B₆ et Mg.
- **La phénylalanine** : c'est un antalgique et un antidépresseur par élévation de norepinéphrine.
- **La thréonine** : relaxeur d'immunité, nécessaire surtout chez l'enfant.
- **Le tryptophane** : Inducteur du sommeil, mais il s'agit d'un métabolite toxique capable de provoquer les myalgies avec hyper éosinophilie.
- **La méthionine** : c'est un acide aminé anti-allergique, en carence il cause des athérosclérose prématurée, un utilisation insuffisante de B₉ et des allergies.
- **La lysine** : il augmente les défenses immunitaires globalement, l lysine a un rôle détoxiquant du plomb et autres métaux lourds chez les personnes âgées.

VI-2- Rôle de quelques acides aminés non essentiels (MADER, 2002)

- **Arginine** : est utilisé dans les cas de lésions du foie, accélère la cicatrisation, régularise le cycle de l'urée.
- **Acide aspartique** : améliore le rendement corporel.

* **Cystéine** : capte les radicaux libres pour la désintoxication, important pour la peau et les cheveux.

- **Acide glutamique/glutamate** : nutriment du cerveau, améliore le pouvoir de concentration chez les personnes atteintes d'ulcère et de dépression.
- **Glycine** : important pour la formation des acides biliaires. Augmente l'élimination de l'acide urique par le rein, stabilise le système immunitaire.
- **Histidine** : protège les nerfs, important pour la production du sang ; aide en cas d'arthrite.
- **Ornithine** : stimule le système immunitaire, soutient l'hypophyse, ralentit le processus du vieillissement.
- **Taurine** : important pour la formation des acides biliaires, meilleure désintoxication du foie, soutient l'activité cardiaque.
- **Tyrosine** : important pour les transmetteurs et la formation des hormones.

V – ECONOMIE DE PRODUCTION DES ACIDES AMINES PAR FERMENTATION

Les principales firmes productrices d'acides aminés dans le monde sont au nombre de dix-sept. Ces firmes, produisant essentiellement de l'acide glutamique, dont treize sont situées dans le Sud-est asiatique (PONS, 1979 ; DUDECK, 2003).

Ainsi le Japon est le principal producteur d'acides aminés et KYOWA HAKO et AJINOMOTO CO ont le monopole mondial (PLACHY, 1984, AREPIT, 1986), et détient pratiquement toutes les licences pour une vingtaine d'acides aminés dont le marché est d'environ 1 milliard de Dollars (AREPIT, 1986).

Les acides aminés sont fabriqués par fermentation soit en utilisant des souches sauvages, soit, des souches ayant subi des mutations génétiques (APRETIT, 1986 ; LESSARD et SINSKY, 2003).

En Europe, où la France occupe une position favorable, les principaux producteurs sont ORSAN pour l'acide glutamique (PONS et al., 1979 ; AREPIT, 1989), EUROLYSINE pour la lysine, (PONS, 1979 ; PADIRAC, 1985, AREPIT, 1986) et RHONE POULENC pour la méthionine (FAURE et al., 1984 ; AREPIT, 1986).

Depuis 1974, 48 brevets importants ont été entrepris aux Etats Unis sur la production d'acides aminés par voie biologique. Sur les 48 brevets, huit concernent la L-lysine, quatre pour l'acide glutamique (PONS, 1979).

La production annuelle des acides aminés dans le monde dépasse 500.000 tonnes en 1980 (ENEI et HIROSE, 1984). Mais sur le plan de tonnages, la part la plus importante est prise par la production de glutamate de sodium 370.000 tonnes/an (HIROSE et al., 1985) et la lysine avec 34.000 tonnes/an utilisé comme additifs dans l'alimentation animale (ENI et HIROSE, 1984 ; LESSARD et SINSKY, 2003).

Actuellement, environ 1.10^6 tonne de la L-glutamate et $4,5.10^5$ tonnes de la L-lysine sont produit annuellement (TAUCH et al., ; 2002; LESSARD et SINSKY, 2003).

La consommation mondiale, qui est de l'ordre de 450.000 tonnes/an se répartit pour 66% dans les additifs alimentaires, 33% pour l'alimentation animale et pour 1% dans les spécialités chimiques, représentant respectivement 52,30 et 18% d'un marché mondial estimé à 800 millions de dollars (TORCK, 1987).

Le tableau n°2 résume les principales firmes de production des acides aminés (PONS, 1979 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Tableau n°2 : Principales firmes de production des acides aminés par fermentation

(PONS, 1979; FLICKINGER et DREW, 1999).

Firmes	Pays
AJINOMOTO	JAPON
ASAHI CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
BIACTOR fpa	ITALIE
EUROLYSINE	FRANCE
KANEGAFOCHI CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
KYOWA HAKKO HOGGYO	JAPON
MI.WON	COREE DU SUD
ORSAN	FRANCE
SANRAKU. OCEAN	JAPON
STAUFFER CHEMICAL	USA
TANNABLE CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
TANNABLE SEIYAKU	JAPON
TSIN TSIN FOODS	TAIWAN
TUNGAL INDUSTRIAL FERMENTATION	TAIWAN
WEI CHUAN FOODS	TAIWAN
WEI WANG INDUSTRIAL FERMENTATION	TAIWAN
TAE WORLD CHAMPION	TAIWAN

L'estimation de la production mondiale annuelle, en tonnes, d'acides aminés par fermentation en 2007, 2011 et les perspectives en 2015 sont représentées respectivement dans le tableau n°3.

Tableau n°3 : La production mondiale (en tonnes) d'acides aminés par fermentation en 2007, 2011 et les perspectives en 2015 (VERTES et *al.*, 2013 ; *in*: YOKAWA et INUI, 2013)

Acide aminé	2007	2011	2015
Acide glutamique	251.600	266.200	299.800
Lysine	139.200	159.400	212.500
Méthionine	217.000	236.100	280.600
Phénylalanine	93.000	99.900	116.100
Les autres acides aminés	181.200	201.500	250.200

VI – UTILISATION DES ACIDES AMINES

Les acides aminés ont trois aires majeures d'utilisation :

Alimentation, médecine et comme matières premières dans l'industrie chimique (cuir artificiel, édulcorant, etc....) (OTHMER, 1984 ; HIROSE et ENEI, 1985) comme ils peuvent aussi être utilisés dans le domaine de cosmétologie (PONS, 1979). Le tableau suivant résume les utilisations des acides aminés (PLACHY, 1984 ; DELAUNAY et *al.*, 2001) :

Tableau n°6 : Principales utilisations des acides aminés (PLACHY, 1984 ; DELAUNAY et al., 2001)

Aires d'application	Application	Acides aminés
Alimentation animale	<ul style="list-style-type: none"> • Supplémentarité des fourrages 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthionine, lysine
Industries alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> • Agent d'aromatisation • Supplémentarité des aliments • Agents édulcorants 	<ul style="list-style-type: none"> • Acide glutamique • Lysine • Glycine
Médecine	<ul style="list-style-type: none"> • Solution d'infusion • Application thérapeutique 	<ul style="list-style-type: none"> • Acides aminés essentiels et non essentiel. + Arginine + 2,4 dihydro-phényl-alanine + + tryptophane
Industrie chimique	<ul style="list-style-type: none"> • Agents tensioactifs et détergents • Polymères 	<ul style="list-style-type: none"> • Acide aminoacyls • Polyamination-acides

VI-1 – Utilisation des acides aminés en alimentation

Un apport quotidien d'acides aminés est indispensable pour couvrir les besoins des organismes humains et animaux (PADIRAC, 1985 ; LESSARD et SINSKY, 2003).

VI-1-1 – Utilisation des acides aminés en alimentation humaine

Le besoin nutritionnel quotidien est estimé selon les « Recommended Daily Allowance » (RDA) entre 44 et 56 grammes par jour pour l'ensemble des acides aminés, ce besoin doit être considéré comme un minimum, car l'organisme a un besoin continu en acides aminés, pour fabriquer chaque seconde environ 2,5 millions de globules rouges, pour remplacer tout les quatre jours environ les plaquettes, les entérocytes, et huit ou dix jours pour renouveler la plus part des leucocytes etc ... , c'est à dire que la synthèse protéique est incessante et donc que les apports en acides aminés doivent être suffisants, en ce

qui concerne surtout les acides aminés essentiels (JACOTOT et CAMPILLO, 2003 ; ANONYME^b, 2003).

La composition en acides aminés d'une protéine détermine, dans une large mesure, sa valeur comme source d'acide.

En effet, l'homme se procure ainsi les acides aminés essentiels dont il est incapable d'effectuer la synthèse (RIVIERE, 1975 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

La qualité nutritionnelle des protéines alimentaires correspond à leur capacité à couvrir les besoins en azote et en acides aminés pour assurer la croissance et l'entretien des tissus. Cette capacité dépend non seulement de la composition des protéines en acides aminés essentiels mais aussi, de leur digestibilité, et du métabolisme des acides aminés absorbés (TOME, 1999).

Cette valeur nutritionnelle des protéines dépend considérablement de l'importance des quantités et de l'équilibre naturel des acides aminés pris individuellement et peut être augmenté par une supplémentation des aliments en acides aminés absents des protéines, spécialement d'origine végétale (DUDEK, 2003 ; KWINN, 2003), mais s'il manque un seul de ces acides aminés, ou s'il est en quantité insuffisante, il ne sera plus possible d'assimiler les protéines alimentaires dans leur totalité .

OTHMER (1984), définit le coefficient protéique (CEP) comme étant le rapport du gain de poids du corps par le poids de protéine consommée par rapport à la protéine de référence pendant une durée donnée.

Il a montré que presque toutes les protéines végétales ont un CEP inférieur à celui des protéines animales.

Deux acides aminés ont une importance majeure car ils se trouvent en faible quantité dans beaucoup d'aliments en particulier les céréales, il s'agit de la lysine et de la méthionine (PADIRAC, 1985 ; MADER, 2002 ; JACOTOT et CAMPILLO, 2003).

Cependant, la valeur nutritive des protéines végétales peut être améliorée par supplémentation des acides aminés limitants ; tel que la lysine qui est utilisée pour enrichir les aliments (OTHMER, 1984 ; LESSARD et SINSKY, 2003).

Les valeurs de CEP de quelques protéines de céréales avant et après fortification avec les acides aminés essentiels limitant tel que la L-lysine, DL-thréonine et DL-tryptophane sont exposées dans le tableau suivant :

Tableau n°7 : Evaluation biologique de la fortification des acides aminés des céréales (OTHMER, 1984)

Céréales	Acides aminés fortifiés	CEP chez le rat
Riz	L-lysine 0,2 %	1,50
	DL-thréonine 0,2 %	2,61
Farine de blé	L-lysine 0,2 %	0,65
	L-lysine 0,2 %	1,56
	DL-thréonine 0,3 %	2,67
Maïs	L-lysine 0,4 %	0,85
	L-lysine 0,4 %	1,08
	Tryptophane	2,55
Grains de sorgho	L-lysine-HCl 0,2 %	0,69
		1,77
Orge	L-lysine-HCl 0,2 %	1,66
	DL-thréonine 0,2 %	2,28

Les acides aminés donnent du goût (OTHMER, 1984) ; ils sont largement utilisés en alimentations, certains sont utilisés comme exhausteur du goût, tel que l'acide glutamique (E620) utilisé sous forme de L-glutamate monosodique (MSG) pour rehausser le goût de quelques produits alimentaires grâce à des propriétés sapides (MOLL et MOLL, 1998 ; ANONYME^a, 2003 ; CHASSAGNOLE et al., 2003), il est employé dans l'industrie alimentaire comme un aromate, car il donne un goût agréable aux plats japonais traditionnels (MOLL et MOLL, 1998) dont il est nommé en japonais « Umami » que l'on tente de traduire en français par goût « saveur »,

« délicieux », « satisfaisant », « palatabilité », « plus cuisiné » (PONS, et al., 1993 ; MOLL et MOLL, 1998) ; c'est la raison pour laquelle que le glutamate monosodique est de loin l'exhausteur de goût le plus répandu sur le marché mondial (MOLL et MOLL, 1998 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Ainsi que L-aspartyl-L-phénylalanine méthyle ester, a un goût très fort, excellent et doux (OTHMER, 1984) ; alors que la cystéine est utilisée pour améliorer la texture du pain (SASSON, 1985 ; HIRASAWA et al., 2001).

D'autres acides aminés sont utilisés pour rehausser la valeur nutritive de certains aliments, tel que les protéines végétales, il s'agit principalement de la lysine et de la méthionine (ANONYME^a, 2003).

L'omission ou la carence d'un seul acide aminé indispensable a des répercussions plus graves particulièrement chez le jeune en croissance.

On appelle facteur limitant l'acide aminé qui se trouve en quantité relativement insuffisante par rapport aux autres.

De façons générales, les protéines animales sont assez bien équilibrées (CHEFTEL et al., 1992). La complémentarité par les acides aminés consiste à combler le déficit en acides aminés limitants secondaires (CHEFTEL et al., 1992).

En alimentation humaine, quelques essais encourageants ont été effectués en Inde et en Afrique sur des enfants initialement mal nourris et recevant du blé enrichi en lysine, du soja ou des légumineuses enrichies en méthionine. Malheureusement de nombreux autres essais n'ont pas conduit aux résultats escomptés (CHEFTEL et al., 1992).

Sur un plan pratique, dans certains pays en voie de développement, d'Amérique latine et d'Afrique du Nord, on a introduit des farines pour l'alimentation infantile à base de protéines locales complémentaire entre elles et correctement associées et parfois enrichies en acides aminés (CHEFTEL et al., 1992).

VI-1-2 – Utilisation des acides aminés en alimentation animale

L'utilisation de la lysine en alimentation animale a connu un développement considérable ces dernières années (LETUTOUR, 1989 ; CHASSAGONALE et al., 2003 ; KWINN, 2003).

La méthionine et la lysine sont ajoutés aux mélanges de fourrages (OTHMER, 1984 ; ENEI et HIROSE, 1985, SASSON, 1985), afin d'améliorer la qualité nutritionnelle de leur protéine (GLANEMANN et al., 2003).

Ces suppléments ont diminué les coûts relatifs à l'utilisation de la farine de graine de soja ainsi que la farine de poisson (NAKAYAMA, 1985 ; LESSARO et SINSKY, 2003).

Ces deux farines étaient utilisées pour équilibrer une alimentation végétale qui peut être réalisée en mélangeant judicieusement des végétaux ne présentant pas les mêmes déficits ou bien de préférence en ajoutant des produits d'origine animale (PADIRAC, 1985).

Les niveaux de suppléments en lysine que l'on peut rencontrer en pratique selon les espèces animales sont représentés dans le tableau n°8, les secteurs porcins et volailles de chair constituent le principal débouché de l'utilisation actuelle de lysine, mais des applications diverses telles que l'alimentation du lapin, du veau de boucherie sont loin d'être négligeable. Les applications chez les chiens et les chats se développent actuellement (LETUTOUT, 1989 ; KWIBN, 2003).

La lysine n'est pas utilisée chez les ruminants dont la configuration de l'appareil digestif ne permet pas une valorisation satisfaisante dans sa forme actuelle (DUDECK, 2003 ; KWIBN, 2003).

Le tableau suivant résume les exemples d'utilisation pratique de L-lysine-HCl dans les aliments composés (LETUTOUT, 1989).

Tableau n°8 : Exemple d'utilisation pratique de la L-lysine-HCl dans les aliments Composés (LETUTOUR, 1989)

Catégories	Exemples	Quantité (g/tonne d'aliment)
Porc	Porcelet	1.500 à 3.500
	Truite	500 à 1.000
	Porc charcutier	
Volaille	Poulet jaune et pintade	1.000 à 2.500
	Poulet blanc	1.000 à 2.500
	Poule pondeuse	500 à 1.000
	Dindon	1.500 à 3.000
Veau	Lactoreplaceurs 60 % poudre de lait	1.000 à 1.500
Lapin	Lapin en croissance	500 à 1.500
	Reproducteur	500 à 1.500
Animaux domestiques	Chiens et chats	500 à 1.000
Poisson	Truite	1.000 à 2.000

De très nombreux essais effectués sur le rat montrent que la supplémentation des céréales par la lysine conduit à des effets favorables sur la croissance et le coefficient d'efficacité protéique (CHEFTEL et al., 1992).

Le tableau n°9, représente de façon schématique les démarches qui président aujourd'hui à l'utilisation de la lysine en alimentation animale (LETUTOUR, 1989).

En effet, l'amélioration des processus industriels de production des acides aminés associés à la recherche des conditions optimales de nutrition azotée, accentuera sans doute, dans le future le développement de l'utilisation des acides aminés purs dans les aliments des animaux afin de répondre à deux objectifs majeurs :

- Mettre à la disposition des consommateurs à coût économique des produits camés sans cesse améliorés ;
- Valoriser au mieux les matières premières produites par l'agriculture et consommées par l'élevage (HIRASAWA et al., 2001 ; DUDECK, 2003 ; KWINN, 2003).

VI-2 – Utilisation médicales et industrielles

VI-2-1 – Utilisations médicales

Dans le domaine médical ou en médecine, les acides aminés sont largement employés dans la transfusion. En effet, il est très difficile de préparer des transfusions pyrogènes libres à partir des hydrolysats de protéines, ce problème a été résolu par l'utilisation des L-acides aminés cristallisés (OTHMER, 1984).

Actuellement, l'utilisation de L-tryptophane est essentiellement thérapeutique comme composant des solutions de transfusion, en plus de son utilisation dans la supplémentation des aliments (NAKAYAMA, 1985^b).

Quelques acides aminés sont utilisés dans le domaine pharmaceutique, la phénylalanine et l'acide aspartique sont les deux constituants de l'aspartame (CHIBATA et al., 1985 ; TORCK, 1987) ; édulcorant artificiel approuvé par la FDA (TORCK, 1987). L'acide glutamique est aussi un médicament, car il active les cellules nerveuses du cerveau (DELAUNAY et al., 2001).

VI-2-2 – Utilisations industrielles

Actuellement, les acides aminés sont aussi utilisés dans des domaines à caractère non biologique. (MARX, 2003).

Peu d'acides aminés sont utilisés dans l'industrie chimique (OTHMER, 1984). A partir du poly- γ -méthyl glutamate, on a réussi à fabriquer du tissu artificiel ainsi que du cuir synthétique qui est remarquable par sa grande perméabilité à l'humidité, sa grande résistance à la chaleur et surtout sa force (OTHMER, 1984 ; TORCK, 1987).

Des amino-acyl sont utilisés dans les détergents (OTHMER, 1984 ; TORK, 1987) le N-lauroyl glutamate est un détergent anionique, alors que le N-lauroyl glycine est reconnu par sa grande activité contre certaine maladie virales des plantes (DELAUNAY et al., 2001). En fin le N-acyl glutamate (dérivé de l'acide L-glutamique) est commercialement utilisable comme un détergent biodégradable avec des propriétés faibles d'irritation de la peau, il est aussi utilisé comme un additif dans le cosmétique, les savons et les shampooings (HIROSE et al., 1985).

- D'autres polyamino-acides sont utilisés dans la synthèse de polymères pour la production de fibres synthétiques qui sont largement recherchés (OTHMER, 1984 ; TORCK, 1987).
- Un autre dérivé de l'acide glutamique (l'acide oxopyrolydine carboxylique) est utilisé comme un facteur naturel hydratant dans le cosmétique jouant un rôle important dans la maintenance de l'eau au niveau de la peau (DELAUNAY et al., 1985).

VII – PROCÉDES DE PRODUCTION DES ACIDES AMINES

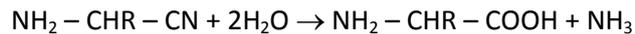
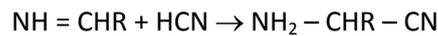
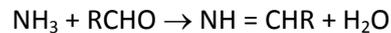
La production des acides aminés fait intervenir des techniques diverses (DELAUNAY et al., 2001).

- La synthèse chimique (méthionine) ;
- Extraction à partir des protéines naturelles (arparagine, hydroxyprolines, des hydrolysats de protéines, cystéines) ;
- Synthèse biochimique :
 - Par bioconversion ou voie enzymatique (acide aspartique, DOPA, tryptophane) ;
 - Fermentation directe (acide glutamique, lysine)

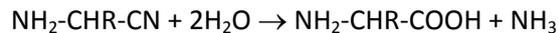
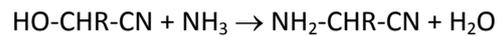
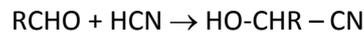
VII-1 – Synthèse chimique

Certaines méthodes de synthèse des aminoacides sont empruntées aux réactions classiques de création des fonctions amines et acides, d'autres sont spécifiques tel que la synthèse des aminoacides de STRECKER (ARNAUD, 1985).

La réaction de STRECKER consiste à faire réagir sur un aldéhyde ou une cétone de l'ammoniac pour former une imine. Cette imine réagit alors avec une acide cyanhydrique HCN pour former un α -aminonitrile. L'hydrolyse de nitrile conduit finalement à l'acide aminé correspond (ALLINGER et al., 1984 ; ARNAUD, 1985).



Dans la réaction de KILIANI, HCN réagit directement sur l'aldéhyde pour donner la cyanhydrine. L'ammoniac agit donc sur cette cyanhydrine pour former un aminonitrile. L'hydrolyse de l'aminonitrile conduit à l'acide aminé, comme ci-dessus (BRACK, 1999) :



Plusieurs acides aminés sont produits par synthèse chimiques, parmi les quels on peut citer la glycine (OTHMER, 1984 ; PLACHY, 1984) qui est obtenue par amination d'un acide α -halogéné (exemple : monochloroacétique) (ARNAND, 1985), la DL-alanine et la DL-méthionine (OTHMER, 1984 ; PLANCHY, 1984).

L'acide aminé synthétique le plus largement produit est la DL-méthionine (OTHMER, 1984), car les deux formes (L et D) de cet acide aminé obtenues simultanément par procédé chimique sont utilisables sans problème par l'organisme (PADIRAC, 1985). Sa production a été de 3000.000 tonnes en 1996 (ANONYME^a, 2003).

Dans la synthèse chimique, le produit est souvent dans la forme racémique (DL forme)(DELAUNAY et al., 2001), il est donc nécessaire d'effectuer des résolutions dans le but d'obtenir des isomères optiquement actifs (KINOSHITA, 1959), celles-ci sont réalisées par des méthodes difficile et coûteuses (SU et YAMADA, 1960).

Cependant ce procédé est particulièrement avantageux dans le cas des acides aminés difficiles à obtenir par fermentation (SCRIBAN, 1993).

VII-2 – Extraction à partir des hydrolysats de protéines

L'hydrolyse des protéines par des acides et des bases fournit un mélange de leurs éléments constitutifs : les acides aminés. Chaque protéine fournit par hydrolyse complète une proportion caractéristique des différents acides aminés (DELAUNAY et al., 2001).

De plus, toutes les protéines ne contiennent pas la totalité des vingt aminoacides (LEHNINGER, 1989).

L'obtention des acides aminés par hydrolyse des protéines se réalise par des acides forts et à chaud. En général, on utilise HCl 6 N à 120°C pendant 10 à 24 heures. C'est la méthode la plus utilisée, l'inconvénient de cette hydrolyse est que sérine et thréonine sont partiellement détruits et le tryptophane est totalement détruit.

L'hydrolyse acide du gluten a été la première source d'acide glutamique semi industriel, de même que l'hydrolyse de soja (HIROSE et al., 1985).

L'acide aspartique a pu être obtenu par hydrolyse de l'asparagine isolée à partir du jus de l'asparagus (CHIBATA, 1985).

En 1925, SCHRYVER et BUSTON ont été les premiers à isoler la thréonine par hydrolyse du gluten d'avoine (SHIMURA, 1985).

L'hydrolyse des protéines est utilisée pour l'obtention de certains acides aminés comme la cystéine et la proline (DELAUNAY et al., 2003).

La cystéine et la cystine sont produites par isolement à partir des hydrolysats de protéine et l'hydroxy-proline sont précipitées à partir des hydrolysats de gélatine (OTHMER, 1984).

L'inconvénient de cette méthode est le coût élevé des matériaux utilisés, de plus la purification des acides aminés est très difficile vu la présence de beaucoup d'impuretés (HIROSE et al. 1985).

Le dosage de tryptophane nécessite une hydrolyse alcaline (NaOH 2 à 4 N, 4 à 8 heures à 100°C). Ce mode d'hydrolyse n'est pas valable pour les autres acides aminés car il y a racémisation de tous les acides aminés et la destruction de la cystéine, sérine et thréonine (KESSOUS, 1996).

VII-3 – Synthèse biochimique

La production des acides aminés par voie biochimique est une activité économiquement importante puisqu'elle concerne un tonnage annuel d'environ 300.000 tonnes et un chiffre d'affaire minimum $2,5 \cdot 10^9$ F/an (PONS, 1979).

Sur le plan tonnage, la part la plus importante est prise par la production de glutamate de sodium (250.000 t/an) et par celle de la lysine (35.000 t/an) (ANONYME^a, 2003).

Les procédés biochimiques sont préférables dans la plupart des cas puisqu'ils mènent directement à des formes actives d'acides aminés (forme L) donc assimilables directement par l'organisme (KINOSHITA, 1959 ; PADIRAC, 1985 ; KISS et al., 1992 ; UDEH et al.; 1993). Ce qui les rend plus avantageux comparé aux processus synthétique (KISS et al., 1992 ; UDEH et al., 1993).

La production des acides aminés par les procédés microbiologiques a l'avantage sur les autres méthodes de conduire uniquement aux formes naturelles (MEYER et al., 2000), les microorganismes réalisent des synthèses chimiques en une seule étape, en comparaison aux nombreuses étapes successives nécessaires en chimie avec des opérations de recyclage récupération - réparation obligatoires entre chaque étape, et les coûts que cela implique.

De plus, ils peuvent réaliser des synthèses hors de portée de la chimie traditionnelle et en un temps très court (APERTIT, 1986).

Parmi les procédés développés, on distingue les procédés de fermentation directe dans lesquels un microorganisme transforme par fermentation une source de carbone (sucre, hydrocarbure, méthanol ou acide acétique) en un acide aminé avec une production simultanée de biomasse et de CO₂ (KITAI, 1972) et des procédés de bioconversions au cours des quels un précurseur est transformé en acide aminé au moyen d'une enzyme produite préalablement et qui dans certains cas insolubilisée sur un support de façon à permettre sa récupération pour réutilisation (PONS, 1979 ; PLACHY, 1984 ; SCRIBAN, 1993 ; MEYER et al., 2000).

VII-3-1 – Production des acides aminés par conversion

(Fermentation indirecte/par voie enzymatique)

Les acides aminés peuvent aussi être préparé par méthode enzymatique lorsque les enzymes microbiennes sont utilisées dans la conversion d'un substrat approprié en acides aminés (NAKAYAMA, 1972).

L'avantage de la synthèse enzymatique par rapport à la fermentation est sa faible consommation d'eau, ce qui entraîne moins d'eau usée à traiter (KISS et al., 1992 ; UDEH et al., 1993 ; DELAUNAY et al., 2003).

L'intérêt des procédés de bioconversion réside aussi, dans le fait que l'on obtient des performances élevées en productivité de concentration finale en acides aminés (exemples : 250 g/l d'acides L-aspartique).

Cependant, les opérations de purification sont simplifiées grâce à une bonne pureté des bouillons à traiter (PONS, 1979; GUIRAUD, 1998).

Comme elle possède de multiples avantages de fabrication, dont principalement la spécificité de la réaction, la conformité stéréochimique du produit, l'action du pH et température modérée indispensable à la fabrication de molécules biologiquement actives (BOUSSABOUA, 2002).

Les bioconversions, appelés aussi biotransformations, sont des réactions biochimiques catalysées par des microorganismes ou par leurs enzymes et permettant la transformation d'un substrat donné en un produit spécifique (ADRIAN, 1995 ; BOUSSABOUA, 2002).

Elles consistent donc en la transformation par les cellules microbiennes d'un métabolite en un composé de structure voisine (CHAMPAGNAT et ADRIAN, 1974 ; ANDRIAN, 1995).

Les bioconversions sont réalisées au moyen soit d'enzymes libres ou fixées. Soit de cellules entières ou fixées.

Lorsqu'on utilise le microorganisme entier, il joue le rôle d'un enzyme ou d'un complexe multienzymatique (GUIRAUD, 1993 ; SCRIBAN, 1993).

Les cellules microbiennes peuvent être en croissance, au repos ou sous forme de spores, à l'état libre ou immobilisées. Les substrats transformés sont ajoutés au milieu à l'état pur ou dilués dans un solvant adéquat (BOUSSABOUA, 2002).

Les bioconversions conduisant aux acides aminés, combinent la synthèse chimique d'un ou plusieurs précurseurs avec la transformation au moyen d'un système enzymatique microbien (SCRIBAN, 1993 ; DELAUNAY et al., 2001).

Cette technique s'applique principalement à l'acide L-aspartique, au L-tryptophane, à la L-citrulline ou à la L-DOPA (PONS, 1979 ; OTHMER, 1984 ; HIRASAWA et al., 2001).

Deux types de procédés sont possibles :

- Soit l'enzyme est préparé dans un bouillon de fermentation dans lequel on introduit, après la phase de croissance la source productrice des substrats à transformer.
- Soit l'enzyme est préparée par fermentation, insolubilisée par entrappage ou réticulation et montée dans une colonne que l'on alimente en continu avec le substrat (PONS, 1979 ; HIRASAWA et al., 2001 ; CHASSAGNOLE et al., 2003).

Par contre, certains procédés existent, mais ne se développent pas du fait que le coût élevé des produits de départ ne permet pas d'abaisser le prix d'acide aminé. C'est le cas de la production de L-tryptophane à partir d'indole ou d'acide antranilique qui sont beaucoup trop chers pour que le L-tryptophane puisse être fabriqué à des prix bas (PONS et al., 1993).

En 1978, la société Toray-Ind, à commencer au Japon, la fabrication industrielle de L-Lysine, par ce procédé enzymatique à partir de DL α -amino- ϵ -caprolactame grâce à une α -amino- ϵ -caprolactamase (SCRIBAN, 1993).

VII-3-2 – Production des acides aminés par fermentation directe

Actuellement, les acides aminés sont produits essentiellement par fermentation directe et le nombre des acides aminés, préparés par cette voie, est en nette augmentation (KISS et al., 1992 ; UDEH et al., 1993).

Cette technique s'applique principalement à la production de l'acide L-glutamique L-lysine, L-tryptophane, L-arginine, L-histidine, L-phenylalanine, L-serine, et L-valine (OISHI, 1972 ; PONS, 1979 ; PLACHY, 1984 ; FURUKAWA et al., 1988).

La majorité des procédés de ce type utilisent comme souche ce qu'on commence à appeler les bactéries productrices d'acide glutamique. En général, la plupart des souches appartiennent à la famille des corynéformes (KINOSHITA, 1959, PLACHY, 1984, KINOSHITA, 1985), ce sont des souches de *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* (PONS, 1979; PLACHY, 1984; HODGSON; 1998; TAUCH et al., 2002) et *Brevibacterium Lactofermentum* (KHACHATOURIANS, 1995), qui naturellement ont la capacité de produire de l'acide glutamique. (PONS et al., 1993 ; KHACHATOURIANS, 1995).

Ces acides aminés sont donc obtenus par fermentation au moyen de bactéries dont les systèmes de régulation ont été perturbés (LECLERC, 1977 ; FURUKAWA et al., 1988). Ce sont des souches à partir des quelles on a eu la possibilité d'obtenir des mutants au métabolisme altéré (auxotrophie) ne produisant pas l'acide glutamique mais capable d'accumuler dans le milieu un autre acide aminé, exemple L-lysine (PONS, 1979 ; DELAUNAY et al., 2001).

Ce sont des mutants de Corynebactéries, *Brevibacterium* ou *arthrobacter* (PLACHY, 1984 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990).

Les matières premières utilisées pour la fermentation sont assez diverses ; au Japon la matière première la plus utilisée est soit l'acide acétique, soit la mélasse de canne (HIROSE et al., 1985).

Par contre en Europe, la matière première la mieux adaptée est la mélasse de betterave (PONS, 1979 ; RADMACHER et al., 2002).

La production des acides aminés par fermentation directe se fait dans des fermenteurs de grande capacité (60 à 3000 m³) (CHAMPAGNAT et ANDRIAN, 1974 ; FLICKINGER et

DREW, 1999). Des fermenteurs de 200.000 L sont généralement utilisés s'il est désiré d'aller vers de grands volumes (REHM et REED, 1993). La réaction est fortement exothermique, comme la fermentation se fait généralement entre 30 et 35°C, la réfrigération de fermenteurs peut poser quelque problèmes (CHAMPAGNAT et ADRIAN, 1974).

Le risque de contamination du Corynébactéries par les bactériophages constitue un autre problème (PONS, 1979 ; PONS et al., 1993). Cela suppose que des précautions draconiennes doivent être prises à tous les niveaux pour empêcher la pénétration des bactériophages dans les fermenteurs (PONS, 1979), et cela par l'utilisation de souches non lysogères et le maintien de conditions sanitaires satisfaisantes (PONS et al., 1993).

De nombreuses études ont porté sur la protection de ces souches contre les phages au moyen d'agent chimique. Les meilleurs résultats semblent être obtenus avec des dérivés N-acylés des acides aminés, utilisés à environ 50 mg/L dans le milieu de culture. Le même résultat est obtenu après ajout d'agent chélatant qui permet de diminuer la concentration de calcium dans le milieu. En effet le calcium est indispensable au processus de l'infection phagique (PONS et al., 1993).

La durée de la production industrielle des acides aminés par fermentation est en général de 25 à 40 heures (FLICKINGER et DREW, 1999).

Une fois la fermentation terminée, le bouillon est centrifugé pour éliminer les cellules bactérienne (OTHMER, 1984 ; PLACHY, 1984). La purification de l'acide aminé se fait ensuite soit par précipitation au point isoélectrique, soit par fixation élution sur résine échangeuse d'ions. Dans ces deux cas, on obtient une eau mère qu'il faut traiter pour éviter toute pollution (PONS, 1979 ; PLACHY, 1984).

Le tableau n°10 résume la production mondiale des principaux acides aminés ainsi que les méthodes de leur production (SCAFER et al., 1990 ; PONS et al., 1993).

Tableau n°10 : Production mondiale des principaux acides aminés et les méthodes de

Leur production (SCAFER et al., 1990 ; PONS et al., 1993 ; FLICKINGER et DREW, 1999)

Acides aminés	Tonnage annuel	Méthode de production
Acide L-glutamique	> 800.000	Production par corynébactérie
L-lysine	330.000	Production par corynébactérie
DL-méthionine	350.000	Synthèse chimique
Acide L-aspartique	10.000	Bioconversion par <i>E.coli/Pseudomonas</i>
L-phénylalanine	5.000	Production par corynébactérie
L-thréonine	1.000	Production par corynébactérie, <i>E.coli</i> et <i>Brevibacterium</i>

VIII – PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE DES ACIDES AMINES

L'intérêt de la production des acides par voie microbienne est le caractère stéréospécifique de cette biosynthèse (SCRIBAN, 1993).

Depuis 1955, des études quantitatives et qualitatives sur la formation des acides aminés par divers micro-organismes ont été entreprises.

Le but, de ces études est l'examen des possibilités de production des acides par fermentation (KINOSHITA, 1959 ; HIRASAWA et al., 2001 ; LOOS et al., 2001 ; KWINN, 2003).

Peu d'acides d'aminés sont accumulés en quantités significantes par des microorganismes isolés directement de la nature (PLACHY, 1984 ; KHACHATOURIANS, 1995). Seul l'acide glutamique, la valine, la proline et l'acide aspartique sont produits en quantité relativement importante (CHASSAGNOLE et al. 1984).

VIII-1 – Microorganismes producteurs d'acides aminés

En général, les microorganismes capables d'accumuler les acides aminés sont les bactéries, les actinomycètes, les levures et les moisissures. Mais les bactéries sont de loin les producteurs les plus performants (ABE et al., 1967 ; NAKAYAMA, 1982 ; TOSAKA et TAKINAMI, 1986 ; EUVERINK, 2003).

Cependant SU et YAMADA (1960) ont pu isolé 203 souches productrices d'acide glutamique dont 127 souches sont des bactéries, 98 sont des moisissures, 44 sont des streptomycètes et enfin 34 sont des levures.

ABE et al., (1967) ont examiné 212 souches productrices d'acide glutamique. Ils ont groupés ces souches en 12 types, 60 % des souches appartenant à un type possédant une uréase, réduisant le nitrate et produisant l'acide à partir du glucose. Il est remarquable que la plupart des souches représentées, employées pour la production commerciale de l'acide glutamique étaient de ce type (HALL et al., 2003 ; KWINN, 2003).

La plupart des souches utilisées dans la production d'acide aminé, par fermentation appartiennent à la famille des corynéformes (KEDDIE et al., 1980 ; EGGELING et SAHM, 2001 ; GLANEMANN et al., 2003) qui sont les producteurs d'acides aminés les plus performants (KINOSHITA, 1959 ; NAKAYAMA, 1982 ; PLACHY, 1984 ; KINOSHITA, 1985 ; SHIIO et al., 1989) dont les genres *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* et *Microbacterium* sont les plus utilisés (NAKAYAMA, 1982 ; PLACHY, 1984 ; KINOSHITA, 1985 ; SHIIO et al., 1989 ; FLICKINGE et DREW, 1999).

Les Corynebactéries sont largement utilisées dans le secteur industriel pour la production d'acides aminés et de nucléotides (ANONYME^a, 2003).

Elles sont similaires au genre *Corynebacterium glutanicum* isolé par KINOSHITA en 1957 (KHACHATOURIANS, 1995), se sont des souches de :

- *Corynebacterium glutamicum*
- *Brevibacterium flavum*

Qui naturellement ont la capacité de produire de grandes quantités d'acides glutamiques (HIRASAWA et al., 2001 ; KWINN, 2003).

A partir de ces souches, il a été possible d'obtenir des mutants au métabolisme altéré ne produisant plus l'acide glutamique mais capables d'accumuler dans le milieu un autre acide aminé, par exemple la lysine (SANO et SHIIO, 1967 ; RIVIERE, 1975 ; PONS, 1979 ; MARQUET et al., 1986; CREMER et al., 1990 ; RADMACHER et al., 2002 ; MARX et al., 2003).

D'autres procédés utilisant *Escherichia Coli* ont été mis au point pour la production de tryptophane par bioconversion (PONS et al., 1993 ; LYNCH, 2003).

La production mondiale de l'acide glutamique atteint 37.000 tonnes, *Micrococcus glutamicum* (ou *corynebacterium glutamicum*) produit plus de 100 g/L à partir de mélasse. 70.000 tonnes pour la L-lysine (*Achromobacter Obae*, *Brevibacterium lactofermum* ou *flavum*), etc... 60 % de la production sert à la nutrition humaine, 33 % à la nutrition animale et le reste à des applications médicales ou industrielles (MEYER et al., 2000).

VIII-1-1 – Caractéristiques des bactéries corynéformes

Tout ce qui brille n'est d'or, tout ce qui est Gram positif, bacillaires, plus ou moins déformé n'est pas Corynébactérie. Ceci n'était pas vrai il y a quelques années car le genre *Corynebacterium* était comme d'autres genres bactériens, une fourre, tout regroupant des entités que l'on sentait bien différentes (SHUKLA et al., 2003).

Biochimie et génétique aidant, la classification a pu être améliorée et des genres nouveaux ont été séparés des corynébactéries (COYLE et LIPSKY, 1990 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Pour le bactériologiste penché sur son microscope la séparation est loin d'être évidente « corynéforme » a encore de beaux jours devant lui (SMITH et EASMAN, 1990).

Ce terme recouvre différentes appellations : Corynéformes, corynébactéries, *Corynebacterium* (EBERLIN, 1997 ; HALL et al., 2003) ; ce sont des bactéries très ubiquistes donc leur origine c'est l'environnement et le tube digestif (ROSIER, 1985 ; SHUKLA et al., 2003).

Les corynéformes sont des sphères ellipsoïdales à bâtonnets, courtes, arrondies à l'extrémité, de taille variable fréquemment en massue (SU et YAMADA, 1960 ; ABE et al., 1967 ; DAGUET, 1972, LECLER et al., 1977 ; NAGAHMA et al., 1977 ; GUIRAUD et GALZY, 1980 ; HIROSE et al., 1985, KINOSHITA, 1985 ; ROZIER et al., 1985 ;

EBERLIN, 1997 ; RIEGEL, 1998 ; ANONYME^c, 2003 ; HIRASAWA et al., 2001 ; KWINN, 2003). Ils se produisent par fusion binaire inégale et présentent des groupements ou associations très caractéristiques (LECLERC et al., 1995) et leur arrangement est irrégulier, en palissade et en lettres majuscules (V, L, N) en caractères chinois et en chiffre romains (DAGUET, 1972 ; LECLERC, 1995 ; RIEGEL, 1998 ; ANONYME^c, 2003).

Ils se colorent irrégulièrement et possèdent fréquemment des granulations (DAGUET, 1972 ; SHUKLA et al., 2003).

Les corynéformes sont pléomorphes, leur morphologie est en général influencée par les conditions de culture, le milieu ainsi que l'âge de la culture (ABE et al., 1967 ; GUIRAUD et GALZY, 1980 ; ANONYME^c, 2003). Elle est bacillaire, lorsqu'ils sont ensemencés dans un milieu neuf, sphérique en fin de phase de croissance (LECLERC et al., 1977).

Selon ABE et al., (1967) ; KINOSHITA, (1985), dans des milieux complexes, les cultures en phase exponentielle présentent des bâtonnets irréguliers qui changent considérablement en taille, forme et renferment des lignes droites courbées, ovales et des formes en cœur, une proportion de bâtonnets est arrangée en forme de « V » (HALL et al., 2003 ; SHUKLA et al., 2003).

Les formes en « V » sont dues au bourgeonnement des cellules ainsi qu'à leurs mouvement après division par cassure (NAYAYAMA et al., 1977 ; KINOSHITA, 1985).

Cette disposition reste une particularité très importante des corynéformes (BOURGEOIS et al., 1996 ; TRAD KHODJA, 1998 ; CHASSAGNOLE et al., 2003).

En phase stationnaire, les cellules sont plus courtes moins irrégulières et une proportion variable est de forme de cocci (ABE et al., 1967 ; KINOSHITA, 1985).

Un autre caractère des bactéries corynéformes est qu'elles ne peuvent pas former des chaînes de cellules durant la phase de croissance (ABE et al., 1967 ; KINOSHITA, 1985 ; LECLERC et al., 1995 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Mais lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu riche, on n'observe pas ces changements morphologiques. Cependant ces changements apparaissent fréquemment chez les bactéries cultivées dans des milieux à basse concentration en biotine ou en présence d'antibiotiques (KINOSHITA, 1985 ; MARX et al., 2003).

Les cellules apparaissent isolées, en paires mais aussi en masses irrégulières donnant une image de massuc. (SU et YAMADA, 1960 ; ABE et al., 1967 ; LECLERC et al., 1977 ; KINOSHITA, 1985 ; SHIIO et NAKAMORI, 1989 ; PONS et al., 1993 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Elles sont souvent incurvées, de taille variable, 0,3 – 0,8 micromètres sur 0,8 à 8 micromètres (GUIRAUD et GALZY, 1980 ; ANONYME^c, 2003) et de 0,7 – 1,0 x 1,0 – 3,0 µm selon (ABE et al., 1967).

Les bactéries corynéformes sont en général immobiles, leur coloration est de type Gram positif (SU et YAMADA, 1960 ; ABE et al., 1967, NAGAHAMA et al., 1977 ; HIROSE et al., 1985 ; KINOSHITA, 1985 ; MOSSÉD et al., 1995 ; EBERLIN, 1997 ; RIGEL, 1998 ; USUDA et al., 2001, TAUCH et al., 2002 ; KWINN, 2003), mais elles deviennent Gram négatif dans les vieilles cultures (LARPENT, 1991), asporulées, aéroanaérobies facultatives,

Elle accumulent en aérobiose, de large quantité d'acide glutamique (ABE et al., 1967 ; NAGAHAMA et al., 1977 ; HIROSE et al., 1985), très oxydantes c'est à dire catalase positive, elles forment des granulations métachromatiques (LECLERC et al., 1995) exigent la biotine pour leur croissance (ABE et al., 1967 ; NAGAHAMA et al., 1977 ; NAKAYAMA, 1985 ; HIROSE et al., 1985 ; KINOSHITA, 1985 ; ROZIER et al., 1985).

Certaines espèces exigent la thiamine ou l'acide para-amino-benzoïque en plus de la biotine. Pour *Corynebacterium glutamicum*, elle n'exige que la biotine (ABE et al., 1967 ; NAKAYAMA, 1982 ; KINOSHITA, 1985 ; HIRASSAWA et al., 2001).

En outre, elles sont mésophiles (ROZIER et al., 1985 ; PONS et al., 1993). La température maximale de croissance est 40°C (PONS et al., 1993), mais la température optimale de croissance diffère suivant ces études ; selon ABE et al., (1967) elle est de 25 à 37°C, par contre selon PONS et al., (1993) elle se situe vers 35°C, mais pour KINOSHITA (1985) elle est située entre 28 à 30°C, alors que pour GUIRAUD, (1998) et TRAD KHODJA, (1998) elle est de 30°C.

Les bactéries corynéformes sont non acido-alcool résistantes, cette particularité peut les différencier de l'espèce pathogènes *corynebacterium diphtheriae* (MOSSÉD et al., 1995), non ramifiées et souvent arrangées de manière angulaire (ABE et al., 1967 ; GUIRAUD et GALZY, 1980 ; BOURGEOIS et LARPEND, 1989 ; GUIRAUD, 1998).

Nous insisterons sur l'importance des lipides dans la paroi des corynébactéries, ce qui les individualise des Eubactéries. On compte en effet 30 % de lipides dans la paroi des corynébactéries, au lieu de 1 % dans la paroi des bactéries Gram négatif (DAGUET, 1972).

Les bactéries productrices d'acide glutamique appartiennent au genre chimio-organohétérotrophes (SINGLETON, 1999). Ils ont la particularité de produire plus de 30 grammes/litre d'acide glutamique sous des conditions d'aérobiose à partir d'un milieu contenant du glucose et de l'urée ou bien des sels ammoniacaux qui sont considérés comme les principaux ingrédients (KINOSHITA, 1959 ; ABE et al., 1967 ; 1972). En effet, l'acide glutamique a une fonction importante dans le métabolisme azoté de ces cellules ; il sert d'une part à la fabrication d'autres acides aminés et d'autre part à la construction du bloc protéique ainsi que d'autre tissus cellulaires (MARX et al., 2003).

En fin, les colonies de ces bactéries se présentent sous forme d'une tache de bougie avec une pigmentation en général jaune pâle à jaune orangé de type caraténoïdique aromatique, de taille variable (LEVEAU et BOURIX, 1993).

Ces colonies jaunâtres, apparaissent après 48 heures d'incubation (SU et YAMADA, 1960, NAGAHAMA et al., 1977).

Leur ADN contient des proportions de guanine plus cytosine (coefficient de CHARGAFF) compris entre 55,5 % et 57,7 % mais quelques souches ont des valeurs qui se situent entre 53 % et 65 % (ABE et al., 1967 ; FILCKINGER et DREW, 1999).

Selon LECLERC et al., (1995), le coefficient de CHARGAFF est compris entre 51-63%, et selon SINGLETON (1999) le pourcentage de G+C est de 51-59%.

Les caractéristiques communes et variables des corynébactéries productrices d'acides aminés sont données respectivement dans les tableaux n°11 et 12.

Tableau n°11: Caractéristiques communes aux corynébactéries productrices d'acides

Aminés (ABE et al., 1967)

Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sphère ellipsoïdale à bâtonnets courts, souvent incurvés, 0,7-1,0-3,0μ. ▪ Apparaissent par paires, en cellules isolées ou en masse irrégulières.
--------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gram positif ▪ Immobiles ▪ Asporulées
Caractères cultureux	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sur gélose nutritive : croissance modérée, colonies circulaires, entières légèrement brillantes. ▪ Sur bouillon nutritif trouble léger a modéré, culot flocculant. ▪ Sur milieu au tellurate : Colonie grises à noires.
Physiologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Température : optimum de 25 à 30° - 37°C, faible croissance à 42°C. ▪ pH optimum de 7 à 8, croissance entre 6 et 9. ▪ Pas de production d'indole. ▪ Amidon non hydrolysé ▪ Respiration : aéroanaérobie facultatif. ▪ Catalase positif. ▪ Production d'H₂S : faiblement positive en général mais fortement positive occasionnellement. ▪ Pas de production de gaz à partir des hydrates de carbone. ▪ Phosphatase : négative ou très faible. ▪ Caséine non hydrolysé. ▪ Bleu de méthylène réduit. ▪ Présence d'acide méso-diaminopimélique dans la paroi cellulaire. ▪ Biotine nécessaire à la croissance. ▪ Accumulation de larges quantités d'acide glutamique sous des

	conditions aérobiques.
--	------------------------

Tableau n°12 : Caractéristiques variables chez les corynébactéries productrices d'acides Aminés (ABE et al., 1967).

Production de pigments	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches sont jaunes pâles à jaunes ▪ Elles sont quelquefois d'un blanc crémeux ou rose. ▪ Des mutants blancs, jaunes profond ou roses sont facilement obtenus.
Réduction des nitrates	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches réduisent les nitrates en nitrites, mais certaines ne le font pas.
Production d'acide à partir des hydrates de carbone	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Habituellement production de l'acide à partir de glucose, fructose, mannose, maltose, saccharose et tréhalose. ▪ Quelquefois, production d'acide à partir de mannitol, arabinose, salicine et esculine.
Test rouge de méthyle	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Souvent faiblement positif mais quelque souches sont négatifs.
Besoins en vitamines	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Besoin général en biotine, mais certaines souches ont également besoins de thiamine ou d'acide para-amino-benzoïque.
Guanine + cytosine % de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches ont un G + C % compris entre 55,5 et 57,7 mais quelques souches ont des valeurs au tour de 65 ou de 53.

VIII-1-2 – Taxonomie et écologie des corynébactéries d'intérêt industriel

Les bactéries corynéformes posent encore actuellement de nombreux problèmes de classifications et de taxonomie et il ne paraît plus possible aujourd'hui de définir valablement une famille de corynébacteriaceae (BEBEAR, 1989).

La diversité des bactéries appartenant ou proches du genre *Corynebacterium*, sur la base des seuls critères morphologiques, est si grande que l'on a souvent regroupé sous le nom de corynéformes des espèces très éloignées les unes des autres (LECLERC et al., 1995).

Les premières souches productrices d'acides aminés ont été nommées *Micrococcus glutamicus* (KINOSHITA et NAKAYAMA, 1985 ; HALL et al., 2003) , mais il a été par la suite proposé de classer ces souches parmi les corynébactéries (PONS et al., 1993 ; MORITZ et al., 2000).

VIII-1-2-1 – Taxonomie générale des corynébactéries

Selon HOLT et al., (1994) dans le Bergey's manuel of déterminative bacteriology (9^{ème} édition), les corynébactéries appartiennent à l'ordre des actinomycetales (PONS et al., 1993, LECLERC et al., 1995 ; LESSARD et SINSKY, 2003).

Les actinomycetales sont de types Gram positif, la plus part des genres sont aérobies, coques, bâtonnet, mycélium (selon le genre), habituellement non mobile, sporulant pour beaucoup de genres, se trouvent dans le sol, dans les composts, dans les eaux etc ..., certaines espèces sont symbiotes de plantes, certaines pathogènes chez l'homme, chez d'autres animaux ou chez des plantes (SINGLETON, 1999 ; EUVERINK, 2003).

L'ordre des actinomycétales comprend sept groupes supragénériques comme il est montré dans le tableau n° 13.

Tableau n°13 : Actinomycètes groupe supra génériques et principaux genres

(LECLERC et al., 1995)

Groupe supra générique	Genre
Actinobacteria	<ul style="list-style-type: none">▪ <i>Agromyces</i>▪ <i>Arthrobacter</i>▪ <i>Micrococcus</i>

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Cellulomonas</i> ▪ <i>Actinomyces</i> ▪ <i>Arachnia</i> ▪ <i>Brevibacterium</i>
Actinoplanètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinoplanes</i> ▪ <i>Micromonospora</i>
Moduromycètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinonadura</i> ▪ <i>Streptosporangium</i>
Micropolyspora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinopolyspora</i> ▪ <i>Pseudonocardia</i>
Sporange multilobé	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Frankia</i>
Nocardioformes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Corynebacterium</i> ▪ <i>Mycobacterium</i> ▪ <i>Nocardia</i> ▪ <i>Phodfococcus</i>
Nocardioides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Nocardioides</i>
Streptomycètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Intrasporangium</i> ▪ <i>Streptomycètes</i>
Thermonomonospora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinomadura madurae</i> ▪ <i>Thermomonospora</i>

La condition strictement nécessaire pour qu'un organisme soit classé parmi les corynébactéries est la présence d'arabinogalactane et de mésodiaminopimelate (DAP) dans la paroi qui est un caractère taxonomique important (PONS et al., 1993 ; LECLERC et al., 1995).

Les principaux sucres sont l'arabinose et le galactose. Des acides mycoliques en chaînes courtes sont aussi présents (LECLERC et al., 1995).

Ces bactéries sont regroupées dans le groupe des bâtonnets à Gram positif non sporulant de forme irrégulière (HOLT et al., 1994), ce groupe est ainsi constitué de 22 genres (PONS et al., 1993).

En général, les bactéries productrices d'acides glutamiques sont classées dans des genres différentes comme *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* et *Arthrobacter* (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968 ; GUIRAUD et GALZY, 1980 ; PLACHY, 1984 ; HARKOU et TABDJOUNE, 2002).

VIII-1-2-2- Taxonomie d'après les caractéristiques morphologiques et Culturaux

Le genre *Corynebacterium* a été établi par LEHMAN et NEUMANN, en 1896 pour classer le bacille de la diphtérie et quelques espèces parasites étroitement apparentés (KEDDIE et BOUSFIELD, 1980 ; BEBEAR, 1989). Ce genre a été défini, en se basant sur certains caractères morphologiques, ainsi que des réactions de colorations. Cependant, dans les années suivantes, il a été montré que des organismes de morphologie similaire, se rencontrent dans un très grand nombre d'habitats, autre que le corps animal et à cause de cette similarité morphologique, ces organismes sont encore classés dans le genre *Corynebacterium* par plusieurs chercheurs.

Ensuite, le nom de *Corynebacterium* a été appliqué non seulement pour *Corynebacterium diptheriae* et d'autres espèces parasites apparentées, mais aussi pour une collection hétérogène de morphologie similaire des espèces phytopathogènes et saprophytes provenant de plusieurs habitats (KEDDIE et BOUSFIELD, 1980 ; HIRASAWA et al., 2001).

KINOSHITA et al., (1960) avaient étudié les caractéristiques taxonomiques d'environ 20 souches de bactéries corynéformes productrices d'acide glutamique et ils avaient montré l'existence de six caractères communs de base qui sont :

Gram positifs de forme sphérique ellipsoïdale jusqu'à la forme de petits bâtonnets arrondis à l'extrémité (forme de massue) et plus particulièrement ayant la disposition en

« V », asporulées, immobiles, produisant l'acide L-glutamique dans des conditions aérobiques et enfin exigeants la biotine pour leur croissance. Les microorganismes ayant ces six caractéristiques de base peuvent avoir un nom commun et classer dans le groupe de bactéries corynéformes productrices d'acide glutamique (ABE et al., 1967).

En outre, ces souches sont capables d'utiliser différents hydrates de carbone. Certaines sont capables de métaboliser les hydrocarbures comme *Corynebacterium hydrocarbostasus*.

VIII-1-2-3- Taxonomie d'après les caractères structuraux

Des méthodes chimiotaxonomiques sont largement utilisées, actuellement, pour l'identification et la classification de groupe corynéforme ; comme par exemple l'analyse de leur paroi cellulaire qui permet de déterminer des composants utiles dans les différenciations (KEDDIE et BOUSFIELD, 1980).

L'application répandue des méthodes chimiotaxonomiques a fourni une nouvelle voie pour définir largement le genre *Corynebacterium* en termes chimiques (KINOSHITA, 1985).

Une étude des caractéristiques structurales des bactéries corynéformes en général et leur taxonomie ont été publiées par BOUSFIELD et GALLEY (1978) et TAKEUCHI et al., (1989). L'étude comparative des polysaccharides de paroi des bactéries corynéformes, confirment la présence des méso-diaminopiméliques et des arabinogalactanes qui sont spécifiques du genre *Corynebacterium* (MORE, 1993).

Les bactéries corynéformes et les mycobactéries sont les seuls organismes à posséder au niveau de leur parois des acides mycoliques, composés de haut poids moléculaires, d'acide gras à longue chaîne C₂₂-C₈₂ (DAGUET, 1972 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990).

Chez les corynébactéries, les acides nommés corynomycoliques, ont généralement 22 à 36 atomes de carbone (KEDDIE et BOUSFIELD, 1980. PONS et al., 1993). Par contre chez les mycobactéries, ces acides mycoliques ont un nombre d'atome de carbone supérieur à 236, pouvant atteindre plus de 80 (DAGUET, 1972 ; KEDDIE et BOUSFIELD, 1980 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990 ; PONS et al., 1993). Ces acides gras sont ramifiés (PONS et al., 1993) et possède des cycles propanes internes et ils sont responsables des caractères de coloration de type acido-alcoolrésistance (LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990).

HUCHENQ et al. (1984) ont montré la présence de ces acides gras dans une souche industrielle de *Corynebacterium glutamicum* et ont étudié le rôle de ces molécules dans le processus de fermentation.

VIII-2- Facteurs influençant la croissance et la viabilité des corynéformes

La croissance ou le développement des bactéries est tributaire d'une part du milieu et des éléments physiques de ce dernier, d'autre part des besoins nutritifs spécifiques (LECLERC et *al.*, 1995).

VIII-2-1- La biotine

Les bactéries corynéformes productrices d'acides glutamiques, exigent pour leur développement la présence de substances organiques qu'elles soient incapables de synthétiser et qu'on appelle facteur de croissance (MEYER et *al.*, 2000). La notion de facteur de croissance est à rapprocher de celle de métabolite essentiel (LECLERC et *al.*, 1995 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Le plus important facteur entrant dans la composition du milieu de fermentation pour la production d'acide glutamique est la biotine, qui est essentielle pour la croissance des bactéries productrices de cet acide aminé (KINOSHITA, 1972 ; 1985), mais quelques souches exigent aussi la thiamine ou l'acide para-amino-benzoïque ou la cystéine (ABE et *al.*, 1967 ; KINOSHITA, 1985 ; NAKAYAMA, 1982, FLICKINGER et DREW, 1999).

La biotine (Vitamine B8) est une molécule très stable, cependant elle est très peu sensible à la chaleur (ADRIAN et *al.*, 1995), elle est peu soluble dans l'eau (JBERNIER et *al.*, 1988). Cependant, seule la D-biotine est biologiquement active et présente dans la nature (BIESALSKI et GRIMM, 2001).

La limitation en biotine n'affecte pas seulement la morphologie mais aussi la perméabilité (NAKAYAMA, 1982 ; SHIIO et NAKAMORI, 1989). Donc la capacité d'excréter l'acide glutamique est liée au besoin des souches en biotine, à la concentration en biotine des milieux de culture et à la composition de la membrane bactérienne (DUPERRAY, 1993 ; EGGELING et SAHM, 2001).

En effet, la biotine participe, notamment à la synthèse des acides aminés ainsi que des acides gras et indirectement à la synthèse de certaines protéines et des bases purines (ADRIAN et *al.*, 1995).

De plus, la biotine est un facteur majeure impliquée pour contrôler la fermentation, s'il l'on ajoute un excès de biotine pour avoir une croissance optimale, l'organisme va produire de l'acide lactique, par contre sous des conditions de croissances sub-optimales, c'est l'acide glutamique qui va être excrété (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968 ; EGGELING et SAHM, 2001).

La concentration optimale de biotine pour la production d'acide glutamique par fermentation diffère d'une souche à l'autre et de la source de carbone (KINOSHITA et TANAKA, 1972 ; RIVIERE, 1975 ; PONS *et al.*, 1993).

Un excès de biotine favorise l'accumulation de l'alanine, l'acide aspartique et l'acide succinique, elle peut être remplacée par l'acide aspartique ou l'acide oléique (HIRASAWA *et al.*, 2001).

VIII-2-2- Sources d'azote

Pour synthétiser leurs protéines, qui représentent environ 10 % de leur poids sec, les microorganismes ont besoins d'azote (REHM et REED, 1993 ; MEYER *et al.*, 2000).

L'azote constitue environ 15 % du poids sec des cellules (SENEZ, 1968) et il est assimilé par tous les microorganismes sous forme d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux (SENEZ, 1968 ; RIVIERE, 1975 ; SCRIBAN, 1993).

En outre, la source d'azote organique qui peut être utilisée dans l'industrie comprend la peptone, tryptone, l'hydrolysate de caséine, l'extrait de viande ainsi que l'extrait de levure (PLACHY, 1984 ; JOFFIN et JOFFIN, 1999).

VIII-2-3- Sources de carbone

La croissance des corynébactéries dépend d'un apport de composés carbonés. Ils peuvent en employer une grande variété de sucres, des acides gras, des alcools et diverses autres substances organiques (SINGLETON, 1999 ; KIEFER *et al.*, 2002). Le glucose et le saccharose, sont largement utilisés dans la production industrielle des acides aminés par fermentation (AKASHI *et al.*, 1979 ; JOFFIN et JOFFIN, 1999).

A l'échelle industrielle la source de saccharose est la mélasse de betterave, alors que celle du glucose et du fructose est la mélasse de canne (FLICKINGER et DREW, 1999).

L'acide acétique est aussi suggéré comme étant une très bonne source de carbone surtout pour son prix de revient relativement bas.

Les substrats suivants sont également utilisés comme sources de carbone par *Corynebacterium glutamicum* (HIROSE et al., 1985 ; JOFFIN et JOFFIN, 1999) : Fructose, maltose, ribose, xylose, mélasse, éthanol, méthanol, acide salicylique acide benzoïque.

VIII-2-4- Les sels minéraux

D'une manière générale, les besoins des corynéformes en sels minéraux sont satisfaits par l'addition au milieu de culture de K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , PO_4^{--} et SO_4^{--} , en quantités de l'ordre de mg/litre (DELAUNAY et al., 2001). Le phosphate de magnésium apporte à la fois les ions Mg^{++} et SO_4^{--} (LARPEND et LARPENT-GOURDOUD, 1990).

Certains éléments jouent sans aucun doute un rôle dans l'équilibre physicochimique de la cellule, ce sont notamment le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore (LECLERC et al., 1995). Les principaux oligo-éléments nécessaires à la croissance sont le fer, le cuivre, le manganèse et le zinc (CEJKA, 1981).

Le cuivre et le manganèse jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques (MEYER et al., 2000).

VIII-2-5- Les antibiotiques

Les corynéformes productrices de glutamate sont sensibles à différents genres d'antibiotiques. Par exemple, la pénicilline a pour effet d'altérer les caractéristiques de perméabilité cellulaire (KIKUCHI et NAKAO, 1986), d'empêcher l'accumulation intracellulaire de glutamate ce qui lève la rétro-inhibition qui règle le pool intracellulaire de cet acide aminé et de ce fait, de grandes quantités sont accumulées dans le milieu (RADMACHER et al., 2002 ; GLANEMANN et al., 2003).

Lors de l'utilisation d'un excès en biotine pour la production de l'acide glutamique, il est nécessaire d'ajouter, avant la phase logarithmique de croissance de la souche, de la pénicilline ou des acides gras saturés qui permettent l'excrétion de l'acide glutamique (CLEMENT et al., 1984 ; PLACHY, 1984 ; SHIIO et NAKAMORI, 1989 ; HISARAWA et al., 2001).

VIII-2-6- Effets des conditions de culture

Un certain nombre de facteurs interviennent au cours de la croissance, ils peuvent l'empêcher, l'inhiber, ou la favoriser (LECLERC *et al.*, 1995).

Le taux de croissance des bactéries est une donnée théorique difficile à connaître car elle correspond à des conditions idéales dont on n'est jamais sûr qu'elles soient atteintes (GUIRAUD, 2003). Le taux réel ainsi que la production de métabolites dépendent de :

VIII-2-6-1- Action du pH

En ce qui concerne les bactéries corynéformes, la plupart tolèrent des variations de pH comprises entre 6 et 9 (ABE *et al.*, 1967) et doivent cette propriété du fait que leur membrane cytoplasmique est peu perméable aux H^+ , OH^- et aux molécules minérales ou organiques fortement ionisées. Les molécules faiblement acides ou alcalines qui à l'état ionisé sont arrêtées par la barrière de perméabilité (SENEZ, 1968 ; GUIRAUD, 2003), peuvent par contre pénétrer librement dans le cytoplasme lorsque le pH du milieu est situé en dehors de leur zone d'ionisation.

C'est ainsi que NH_3 et l'acide acétique à pH respectivement alcalin ou acide pénètrent dans la cellule et peuvent dans ces conditions exercer une action toxique à l'égard de nombreuses bactéries (GUIRAUD, 2003).

Le pH optimum pour la croissance de bactéries productrices d'acide glutamique est au voisinage de la neutralité ou très légèrement alcalin (ABE *et al.*, 1967 ; KINOSHITA, 1972 ; KINOSHITA et TANAKA, 1972).

Dans un milieu contenant du glucose, le réajustement du pH est nécessaire tout au long de la fermentation car le milieu tend à devenir acide, cela est dû à la formation de l'acide glutamique et d'autres acides organiques (KINOSHITA, 1972).

VIII-2-6-2- Action de la température

RICHTER *et al.* (1985) ont étudié la composition des acides gras des fractions entières des lipides et phospholipides de *Corynebacterium glutamicum*, il est bien sur que le changement de la température de croissances ou la limitation de l'oxygène peut causer des altérations significatives dans la composition des lipides cellulaires.

La température influence profondément la multiplication aussi bien que le métabolisme (action sur la vitesse des réactions chimiques et biochimiques) (MEYER *et al.*, 2000). La température optimale de croissance des Corynéformes est comprise entre 30 et 35°C.

A une température supérieure à 37°C, il y a formation d'acide lactique à cause de la diminution de dissolution de l'oxygène (KINOSHITA, 1972 ; KIKUCHI et NAKAO, 1986), ainsi qu'un stress thermique et une dénaturation des constituants cellulaires (GUIRAUD, 2003).

Le froid ralentit et bloque le métabolisme microbien sans habituellement tuer la cellule, et intervient aussi sur les transferts physiques (MEYER *et al.*, 2000).

VIII-2-6-3- Action de l'oxygène

La biosynthèse des acides aminés par fermentation est un processus aérobique, (HIROSE *et al.*, 1985 ; CHASSAGNOLE *et al.*, 2003).

Donc l'évaluation de la quantité d'oxygène transférée durant la fermentation est indispensable pour d'une part optimiser cette opération et d'autre part, avoir des productions à grande échelle (AKASHI *et al.*, 1979 ; PLACHY, 1984).

L'apport en oxygène dans les cultures de microorganismes, peut affecter le pool intracellulaire des acides aminés, le métabolisme des acides gras ainsi que celui des phospholipides (HANEL *et al.*, 1981 ; FLICKINGER et DREW, 1999).

Le niveau de la production des acides aminés est en relation avec les quantités d'oxygène injectées (AKASHI *et al.*, 1979) qui diffèrent dans leurs valeurs en oxygène dissout et le degré d'inhibition ou de stimulation de la production des acides aminés par l'oxygène (PLACHY, 1984).

La production du glutamate est fortement inhibée par des apports en oxygène insuffisants et sous ces conditions, la production du glutamate est faible et d'importantes quantités d'acide lactique et succinique s'accumulent, tandis que l'excès d'oxygène augmente la quantité d'acide α -cétoglutarique (NAKAYAMA, 1982 ; PLACHY, 1984 ; KIKUCHI et NAKAO, 1986).

Par contre avec la lysine, l'inhibition, due au manque d'oxygène est faiblement prononcée (PLACHY, 1984).

En outre, durant la production de L-lysine par *Corynebacterium glutamicum* 9366, la limitation d'oxygène a pour effet de tripler le pool intracellulaire de la lysine alors que son excrétion dans le milieu diminue.

Au même moment, les phospholipides des cellules augmentent d'une façon remarquable pendant que la proportion de l'acide oléique dans les acides gras des phospholipides diminue.

Donc, la diminution de l'apport en oxygène fourni cause, d'une part une altération dans la structure de la membrane cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* 9366, d'autre part une diminution du flux de L-lysine (HANEL *et al.*, 1981).

VIII-2-6-4- Action de la pression osmotique

Lorsque le milieu de culture contient une faible concentration en ions ou autre solutés, il est dit «hypotonique » ; la concentration plus élevée en solutés dans le cytoplasme des microorganismes qui vivent dans ce milieu entraîne un mouvement d'eau à travers la membrane, ce qui crée une pression vers l'intérieur des cellules et tend à les faire gonfler.

Dans un tel milieu, la pression osmotique représente une menace sérieuse pour l'intégrité des cellules microbiennes, qui pourraient éclater (lyse cellulaire). Chez tous les microorganismes, une paroi cellulaire contenant des polymères tels que le peptidoglycane, chez les bactéries et la chitine, chez les levures et les moisissures donne une rigidité aux cellules et leur confère ainsi une protection contre la lyse osmotique. Par contre, si les cellules sont placées dans un milieu hypertonique, fortement concentré en ions ou autres solutés, la pression osmotique s'inverse et l'eau contenue dans les cellules traverse la membrane plasmique pour se retrouver dans le milieu. Cette perte d'eau entraîne la diminution du volume cellulaire, ce qui perturbe l'activité enzymatique et ralentit le métabolisme au point d'inhiber complètement la croissance si le milieu est très hypertonique (CHARBONNEAU *et al.*, 2007)

La pression osmotique est un facteur inhérent à la fermentation glutamique car l'accumulation de glutamate et des ions ammoniums utilisés pour contrôler le pH dans le milieu de fermentation contribue à l'augmentation de la pression osmotique. Chez *C.*

glutamicum, l'étude de la réponse à une augmentation de l'osmolarité, pour différentes conditions de croissance, a montré la mise en action de différents mécanismes. On observe une diminution du volume cellulaire, l'accumulation intracellulaire d'ions (transitoire) et l'accumulation par biosynthèse d'acides aminés (proline, glutamate, glutamine) et de tréhalose (Lambert *et al.*, 1995).

Parallèlement, l'augmentation de l'osmolarité induit une diminution du taux de croissance et du rendement en biomasse qui traduit une redistribution du flux carboné vers les mécanismes de réponse au stress osmotique (GUILLOT et ENGASSER., 1995a, b et 1996). De plus, *C. glutamicum* peut en réponse à une augmentation de l'osmolarité, accumuler des métabolites osmoprotecteurs extracellulaires comme la glycine-bétaine (osmoprotecteur le plus efficace), l'ectoïne et la proline (FARWICK et al, 1995). Quatre transporteurs assurant le transport de ces molécules ont été mis en évidence chez *C. glutamicum*. Ces mécanismes de réponse sont communs à de très nombreuses bactéries (IMHOFF, 1986. WOOD, 1999).

L'augmentation de la pression osmotique peut jouer sur différents points clés du métabolisme comme l'entrée du glucose par le système PTS (système de la phosphotransférase de sucre), le système de sortie du glutamate et la respiration. Il a été montré chez *E. coli* et *Clostridium pasteurianum* qu'une augmentation de la pression osmotique inhibant le transport du glucose via le système PTS et ce même en présence de bétaine pour *E. coli* (ROTH et al, 1985. WALTER et al, 1987. HOSSIN et al, 1991). LAMBERT et al (1995) ont montré lors de l'étude de l'excrétion du glutamate par ajout d'anesthésique qu'une augmentation de la pression osmotique inhibait la sortie du glutamate.

Cette inhibition est levée par l'addition de la glycine bétaine.

Enfin, MEURY(1994) a décrit chez *E. coli* une inhibition transitoire de 75% de la respiration après un choc osmotique (GOURDON., 1999).

VIII-3- Voies de biosynthèse des acides aminés

Les voies de biosynthèse qui conduisent aux 20 acides aminés sont non seulement nombreuses mais également complexes (LEHNINGER, 1989).

façon générale, les voies métaboliques connues chez les Corynébactéries industrielles n'ont pas de spécificité par rapport à celle connues chez d'autres microorganismes tels que

Escherichia coli, par contre les enzymes participant à ces voies métaboliques n'ont généralement pas les mêmes caractéristiques, ni les mêmes régulations (PONS *et al.*, 1993).

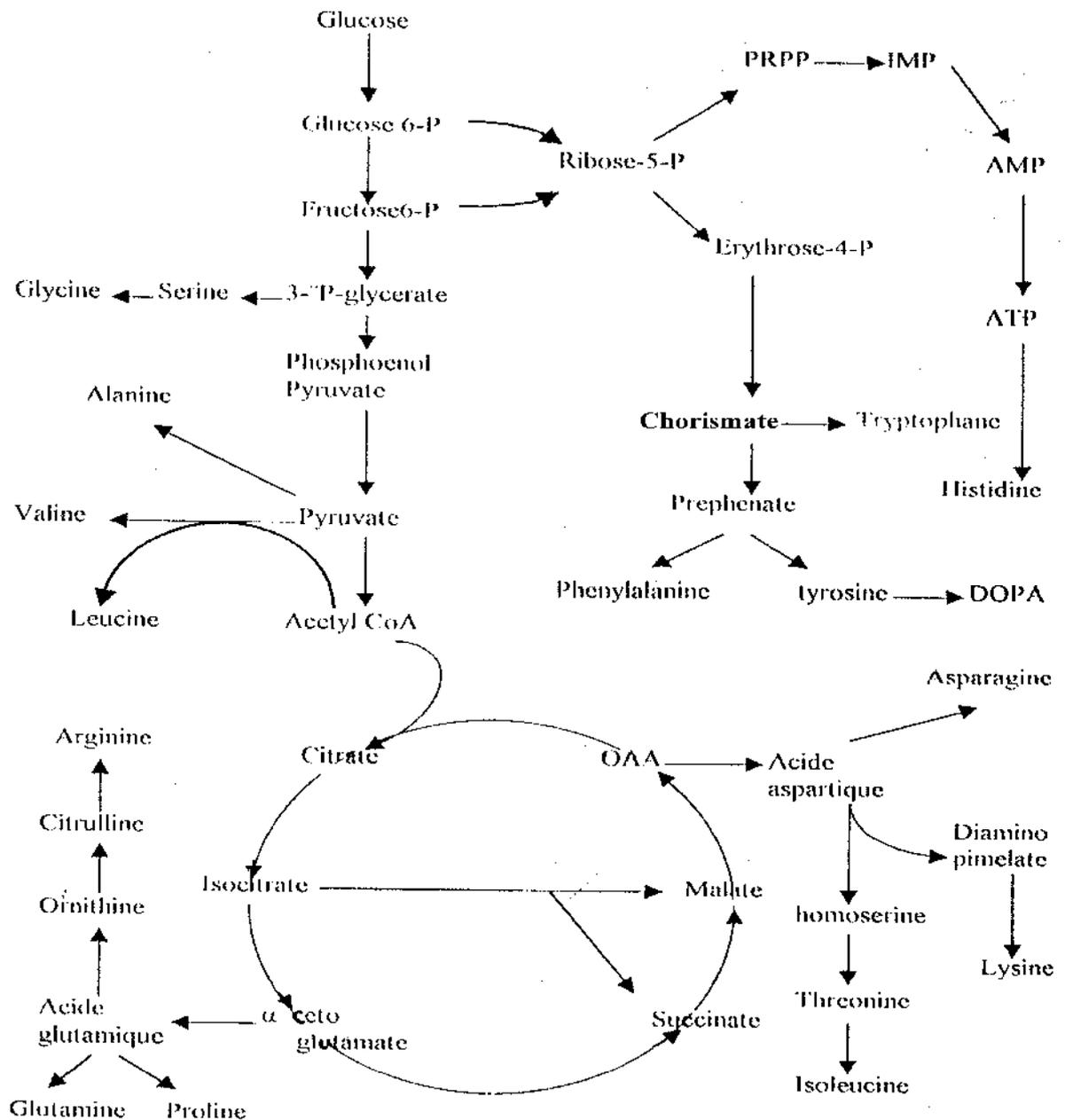


Figure 2 : Biosynthèse des différentes familles d'acides aminés

(OTHMER, 1984)

VIII-3-1- Famille du glutamate

La famille du glutamate comprend le glutamate et d'autres acides aminés dont les chaînes carbonées dérivent de l'acide glutamique (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968).

A partir du glutamate s'ouvrent les voies de synthèse de la glutamine, de l'ornithine et de l'arginine ainsi que celle de la proline (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968).

La principale voie métabolique de biosynthèse de l'acide glutamique à partir de glucose chez les corynébactéries est donnée par la figure 3.

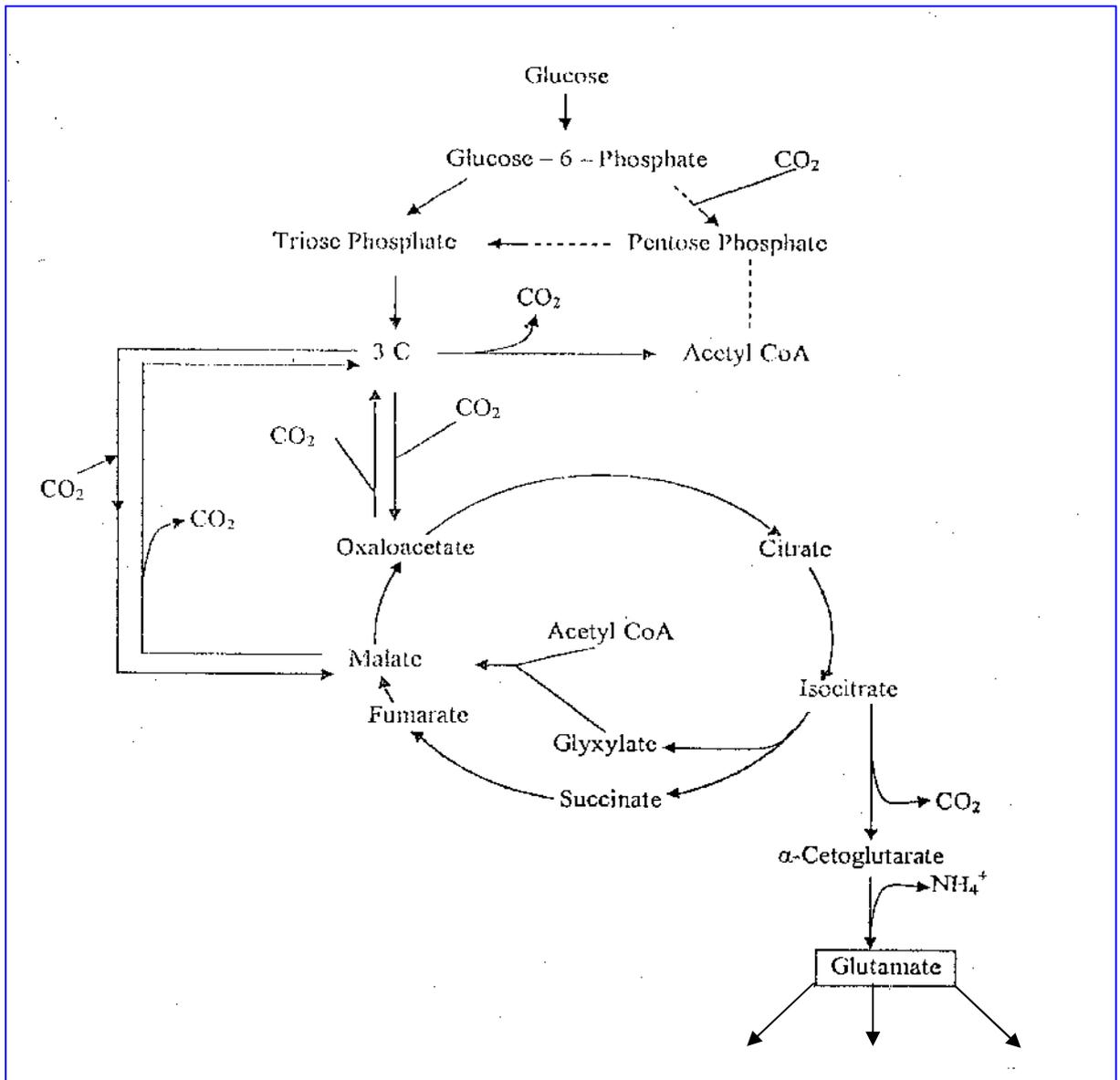


Figure 3 : Voies métaboliques de la biosynthèse de l'acide glutamique à partir du glucose (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968)

VIII-3-2- La famille du pyruvate

La famille du pyruvate comprend trois acides aminés qui dérivent du pyruvate : alanine, valine et leucine (SING et SHANER, 1995).

La lysine est considéré comme membre de la famille de l'aspartate, la moitié de ses carbones dérivent du pyruvate (KINOSHITA, 1985 ; GALANEMANN *et al.*, 2003).

Ci-dessous le schéma de biosynthèse de la famille du pyruvate (NAKAYAMA, 1982)

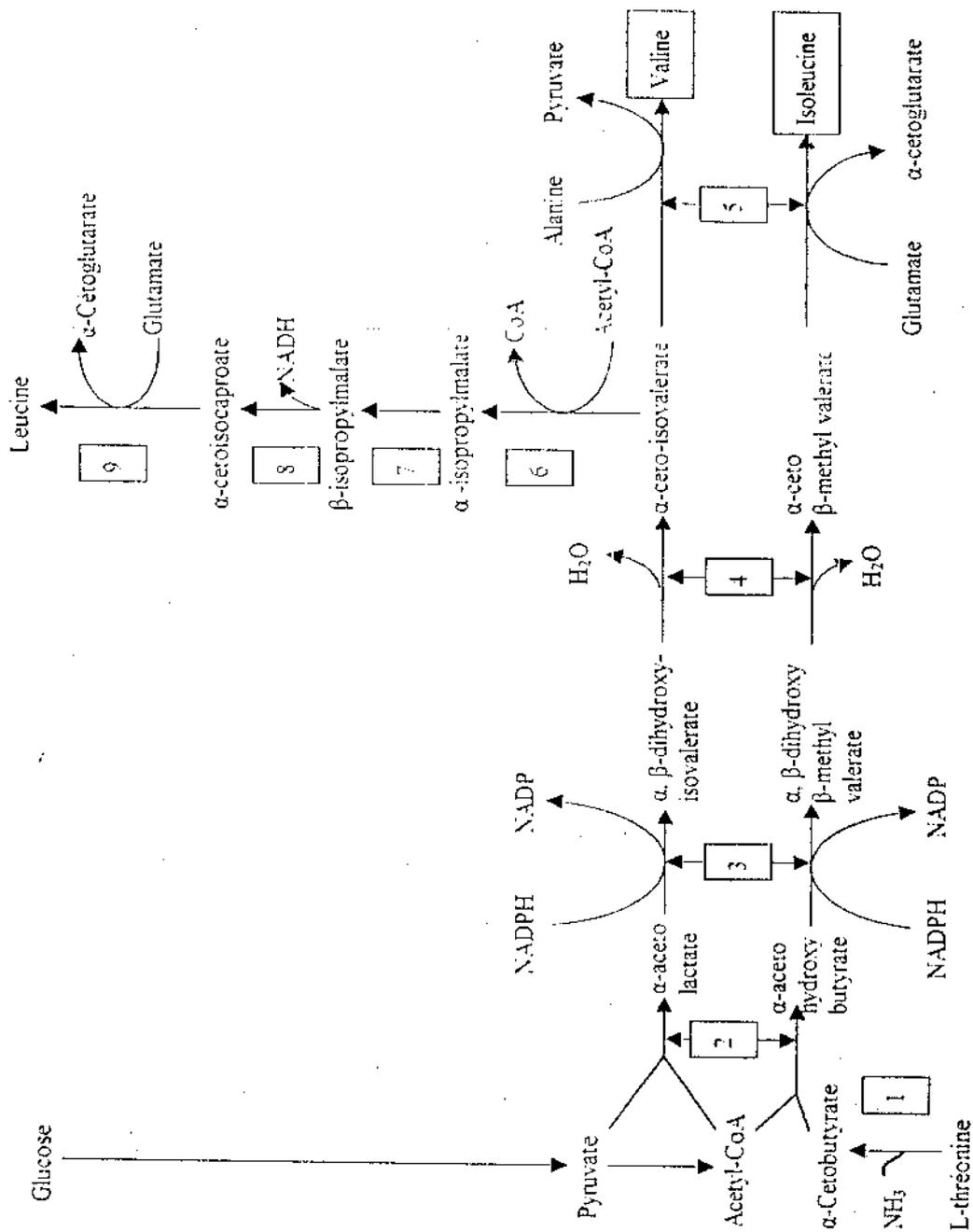


Figure 4 : Biosynthèse de la leucine, valine et isoleucine (NAKAYAMA, 1982)

VIII-3-3- Famille de l'aspartate

La famille de l'aspartate comprend essentiellement la lysine, l'aspartate, l'asparagine, méthionine, thréonine et l'isoleucine (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968; SHAVER *et al.*, 1996).

Ainsi, les bactéries, les actinomycètes, quelques phycomycètes, les algues bleues, les protozoaires et les plantes supérieures synthétisent la lysine à partir de l'acide diaminopimélique (DAP) qui est produit à partir de l'aspartate, tandis que la synthèse de la lysine chez les levures, les champignons et les algues vertes, débute avec l'acide α -amino-adipique qui est formé à partir de α -cétoglutarate (PLACHY, 1984 ; TOSAKA et TAKINAMI, 1986 ; KWINN, 2003).

Concernant la production de la lysine par fermentation, la biosynthèse de lysine par la voie du diaminopimélate par les bactéries est plus importante (KINOSHITA, 1978; PLACHY, 1984 ; TOSAKA et TAKINAMI, 1986 ; HIRASAWA *et al.*, 2001).

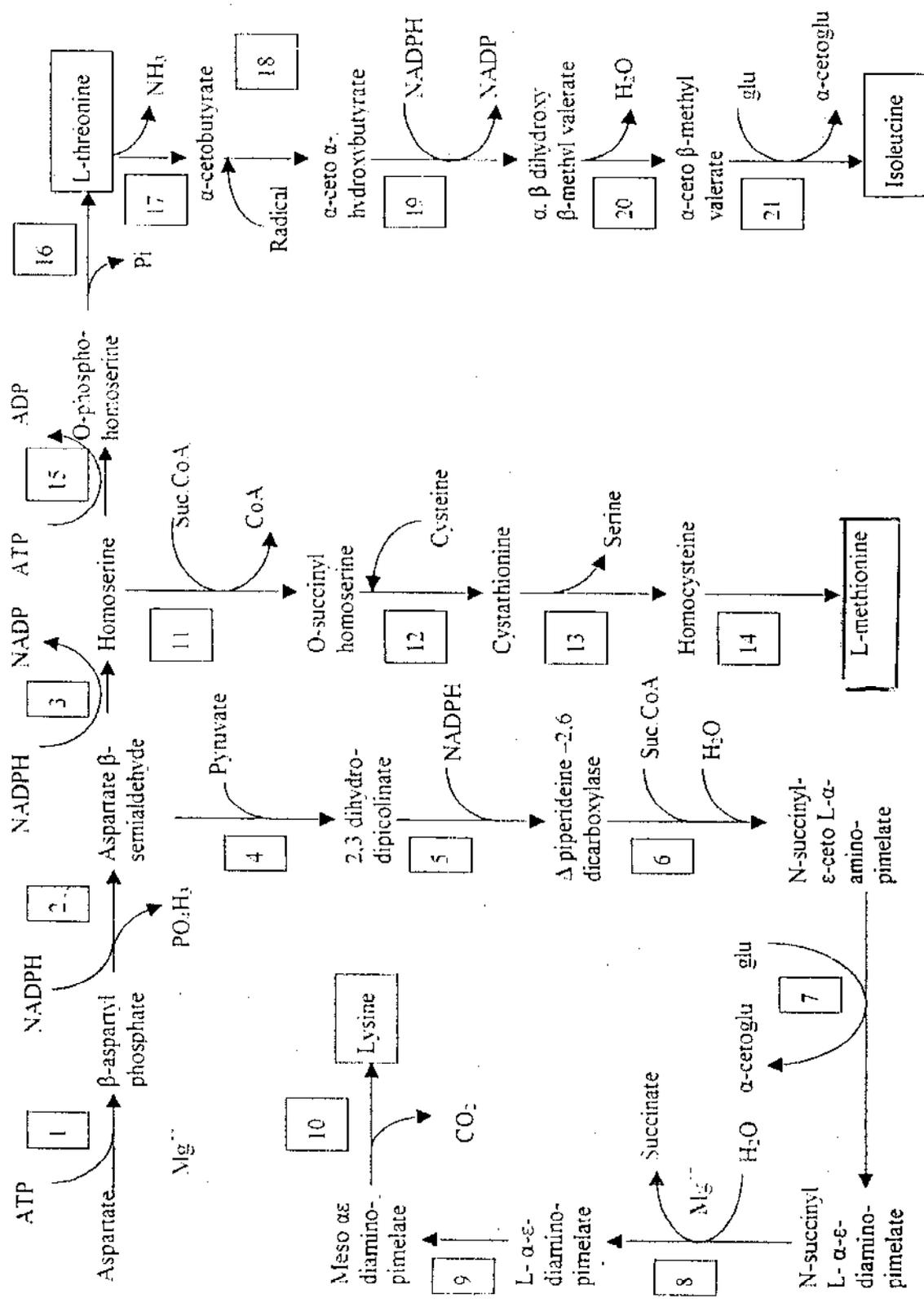


Figure 5 : Schéma de la biosynthèse de l'aspartate chez les bactéries

(GLANEMANN *et al.*, 2003)

Le L-aspartate sert de précurseur pour la voie du diaminopimélate. Le L-aspartate est obtenu par transamination entre le glutamate et l'oxaloacétate, qui est intermédiaire du cycle de KREBS. Elle est catalysée par une aspartate aminotransférase (TOSAKA et TAKINAMI, 1986 ; TRAD-KHODJA, 1998).

L'acide aspartique est métabolisé jusqu'à un intermédiaire commun de la biosynthèse des quatre acides aminés, la lysine, méthionine, thréonine, isoleucine (TOSAKA et TAKINAMI, 1986 ; SAHM *et al.*, 1995).

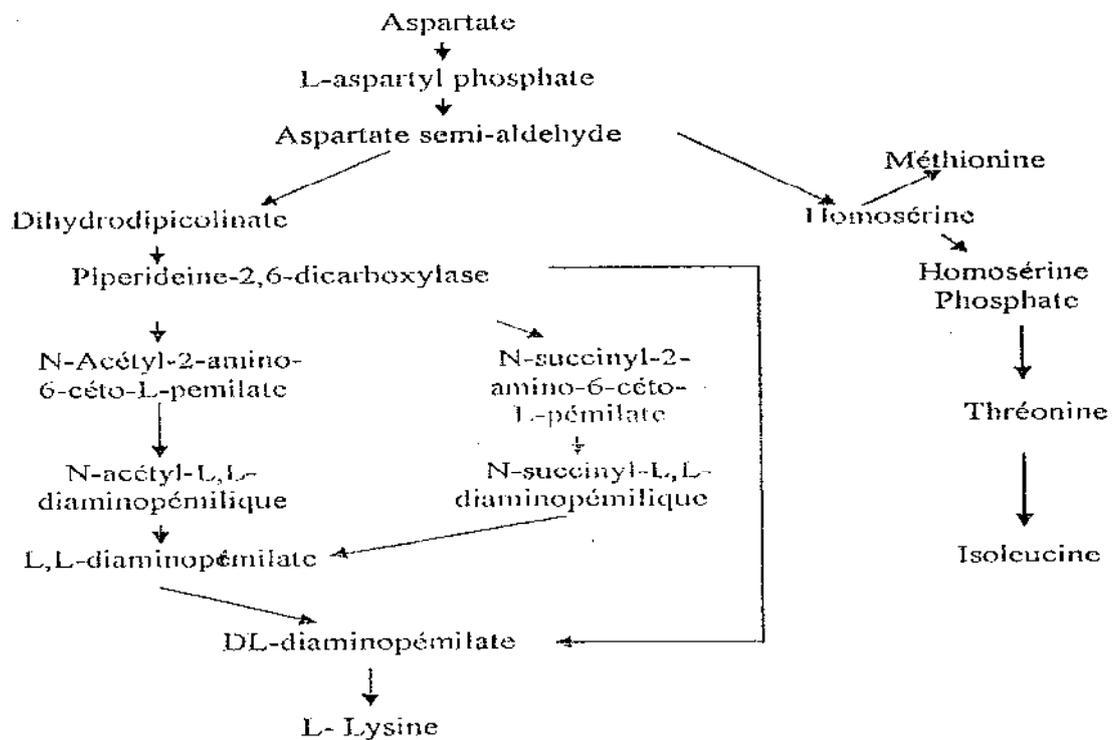


Figure 6 : Voie de biosynthèse des acides aminés dérivés de l'aspartate

(KHACHATOURIANS, 1995)

VIII-4- Mécanismes de régulation de la biosynthèse des acides aminés

La régulation, autrement dit, le maintien des valeurs des paramètres dans les limites assignées, est observée dans les systèmes équilibrés (NIKOLAIV, 1991).

Ces phénomènes de régulation assurent à la fois l'adaptation des microorganismes aux conditions du milieu et des économies énergétiques (L'HERITIER, 1975; HESLOT, 1977 ; SCRIBAN, 1993) et de reproduire de manière coordonnée l'ensemble de ses structures (L'HERITIER, 1975).

Au niveau du catabolisme, ils sélectionnent la voie métabolique la plus appropriée, et au niveau de l'anabolisme, ils limitent les synthèses au niveau nécessaire (SCRIBAN, 1993) ; donc ces mécanismes de régulation lui permettent de synthétiser que la quantité de métabolites qui lui est strictement nécessaire (RIVIERE, 1975).

C'est le cas de la majorité des acides aminés qui ne sont pas produits abondamment par les souches sauvages car leur synthèse est rigoureusement régulée par les mécanismes de rétro-inhibition (SHIIO, 1982).

L'existence de ces phénomènes de régulation a été clarifiée au moment de l'isolement de *Corynebacterium* et sont maintenant très bien connus (KINOSHITA et NAKAYAMA, 1978 ; NAKAYAMA, 1982), ce qui est nécessaire pour l'utilisation des microorganismes à des fins industrielles. Cette connaissance permet de modifier les conditions de fonctionnement des voies métaboliques et même grâce à des moyens génétiques, de modifier ces voies (SCRIBAN, 1993 ; GUIRAUD, 2003).

La régulation du métabolisme cellulaire consiste principalement en la rétro-inhibition et la répression (SANO et SHIIO, 1967; PLACHY, 1984; SASSON, 1985) en excitant une surproduction des métabolites primaires (SANO et SHIIO, 1967; SASSON, 1985; GLANEMANN *et al.*, 2003), tels que les acides aminés, nucléotides (SASSON, 1985).

Leur production en grande quantité peut être obtenue en dérégulant le système (SCRIBAN, 1993).

La perméabilité membranaire est aussi impliquée dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés (NAKAYAMA, 1979; PLACHY, 1984), elle constitue un autre mécanisme qui protège les microorganismes du gaspillage du matériel organique vers le milieu extérieur, ce qui permet aux cellules de retenir les intermédiaires et les macromolécules nécessaires pour leur survie (NAKAYAMA, 1979).

I.5.3.1. La régulation du métabolisme

La régulation du métabolisme intervient aussi bien au niveau de catabolisme que l'anabolisme (SCRIBAN, 1993 ; LYNCH, 2003).

Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire des enzymes qui catalysent les réactions biologiques et s'exerce au niveau de la synthèse et au niveau de l'activité (LECLERC et *al.*, 1995). Elle s'effectue par deux grands types de mécanismes.

- Régulation du fonctionnement des enzymes ;
- Contrôle de la biosynthèse des enzymes.

Le premier mode de régulation (activité) est de l'ordre biochimique et concerne la réaction enzymatique elle-même et les relations enzyme-substrat, les effets sont immédiatement exprimés.

Le second mode de régulation (synthèse) est d'ordre génétique, son efficacité est toute relative et ses effets ne sont observés que tardivement (LECLERC et *al.*, 1995).

Dans la voie de biosynthèse des acides aminés, la régulation de l'activité des enzymes par la rétro-inhibition et la régulation de la synthèse des enzymes par la répression sont aussi incriminées (PLACHY, 1984 ; LYNCH, 2003).

I.5.3.1.1. La rétro-inhibition

Dans les phénomènes de rétro inhibition le (ou les) produit (s) obtenu (s) en fin de chaîne de la voie biosynthétique inhibent lorsqu'ils sont en excès, le fonctionnement du ou des enzymes intervenant au début de la chaîne (PLACHY, 1984 ; REHM et REED, 1993). Tandis que la répression résulte en la suppression de la synthèse d'un ou de plusieurs enzymes de la voie biosynthétique par le produit final (PLACHY, 1984 ; REHM et REED, 1993).

La rétro-inhibition empêche la cellule de gaspiller des ressources chimiques et ce en s'opposant à ce qu'elle produise plus de substance qu'elle n'en a besoin (TORTORA et *al.*, 2003).

Il existe divers systèmes de rétro-inhibition

;

A. Rétro inhibition simple chaîne

Le cas le plus simple est celui d'une voie non branchée où le produit final inhibe le fonctionnement de la première enzyme de la chaîne (GUIRAUD, 1993).

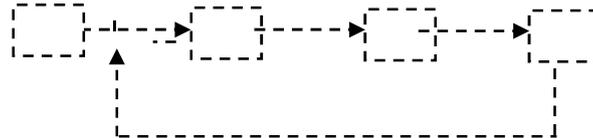


Figure : Rétro inhibition simple chaîne (GUIRAUD, 1993)

A. Rétro inhibition multivalente ou concertée

La présence des divers produits finaux est indispensable pour assurer l'inhibition ; chaque produit agissant séparément est inefficace (SCRIBAN ,1999).

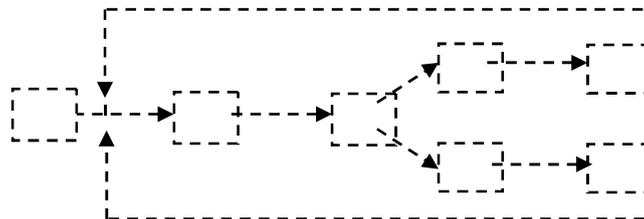


Figure (10) : Rétro inhibition covalente ou concertée (GUIRAUD, 1993)

. Rétro inhibition cumulative et coopérative

Chacun des produits finaux inhibe partiellement l'activité de la première enzyme et la présence de plusieurs entraîne une inhibition croissante avec possibilité de synergie (MARTIN et LIRAS, 1981 ; GUIRAUD, 1993).

La régulation cumulative intervient lorsque des quantités en excès de tous les produits terminaux sont exigées pour une inhibition complète ou répression (PLACHY, 1984 ; REHM et REED, 1993).

Dans la régulation coopérative l'enzyme est inhibée ou répressé, seulement lorsque plus d'un produit terminal est présent en excès (NAKAYAMA, 1982 ; PLACHY, 1984).

Comme par exemple, l'aspartokinase, chez *Corynebacterium glutamicum* qui est sujette à une inhibition par la présence conjugué d'un excès d'acides aminés responsables de la rétro inhibition, à savoir la lysine et la thréonine (NAKAYAMA, 1982 ; PLACHY, 1984 ; PONS et *al.*, 1993).

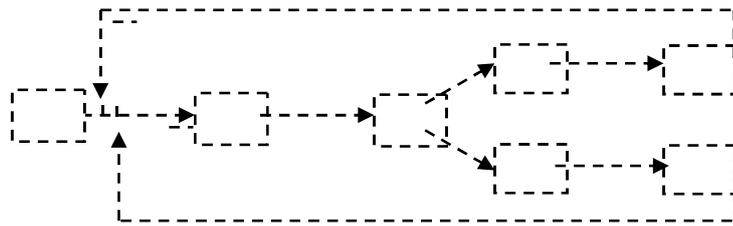


Figure (11) : Rétro inhibition cumulative ou coopérative (GUIRAUD, 1993)

D. Rétro inhibition par isoenzymes

L'enzyme responsable de la première étape se trouve sous plusieurs formes « isoenzymes », dont chacune est sensible à différents produits (SCRIBAN, 1999)

Chez les microorganismes équipés de plusieurs iso-enzymes, une certaine réaction biosynthétique est synthétisée par plusieurs formes de la même enzyme, régulée par différents produits terminaux (REHM et REDD, 1993 ; PLACHY, 1984 ; NEIDHARDT et *al.*, 1994).

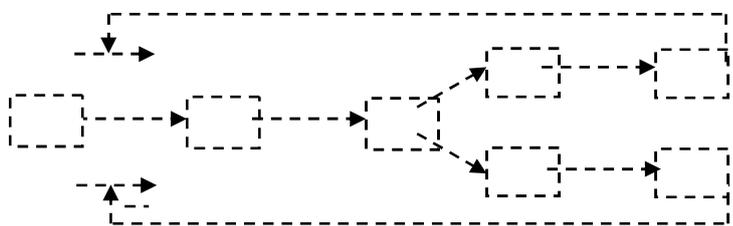


Figure (12): Rétro inhibition par isoenzymes (GUIRAUD, 1993)

E. Inhibition séquentielle

Dans ce cas des intermédiaires de la chaîne peuvent être des inhibiteurs de la première enzyme (SCRIBAN, 1999). Quant aux différents produits finaux, ils agissent séparément sur les diverses branches de la voie de biosynthèse (NEIDHARDT *et al.*, 1994).

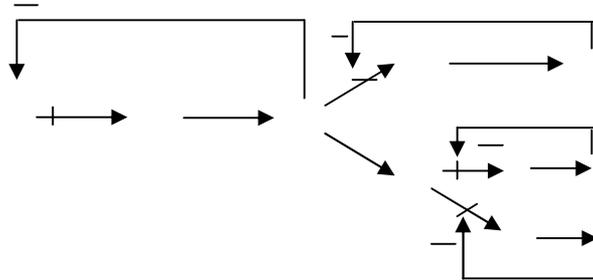


Figure (13) : Rétro inhibition séquentielle (GUIRAUD, 1993)

F. Rétro inhibition plus activation

Certaines voies plus complexes, dans lesquelles un intermédiaire synthétisé dans la branche alimente une autre voie, sont parfois régulées par une combinaison d'inhibition et d'activation allostériques ; le produit final d'une branche est l'inhibiteur tandis que l'intermédiaire qui dans l'autre voie est juste avant le point de jonction, est l'activateur.

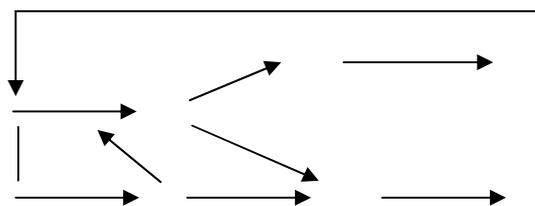


Figure (14) : Rétro inhibition plus activation (NEIDHARDT *et al.*, 1994)

I.5.3.1.2. La répression

Contrairement aux phénomènes d'induction qui touchent généralement les opérons impliqués dans le catabolisme, ceux de répression touchent les opérons impliqués dans l'anabolisme (GUIRAUD, 1993).

Dans les deux cas, il en résulte une économie pour la cellule car les deux enzymes correspondantes ne sont synthétisées qu'en cas de besoin (GUIRAUD, 1993; SCRIBAN, 1993).

V-3-2- La perméabilité membranaire

La membrane cytoplasmique joue un rôle de barrière, en empêchant d'une part la fuite des composés intra cytoplasmiques quel que soit leur poids moléculaire, d'autre part les pénétrations anarchiques des constituants extracellulaires, elle régit donc l'entrée et la sortie des métabolites (MEYER *et al.*, 2000). De ce fait ; elle est le plus important composant du système de la perméabilité (PLACHY, 1984 ; KIKUCHI et NAKAO, 1986).

Chez les bactéries Gram positif, la membrane cytoplasmique constituée d'une bicouche lipidique et de protéines, entourée par la paroi cellulaire, elle-même constituée de peptidoglycane, polymère de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique. Cette paroi assure la rigidité de la cellule (PONS *et al.*, 1993; EGGELING et SAHM, 2001).

Dans le but d'atteindre des rendements élevés lors de la production des acides aminés par fermentation, il est nécessaire d'altérer la perméabilité de la barrière entraînant une augmentation de l'excrétion des acides aminés synthétisés par la cellule dans le milieu (PLACHY, 1984). L'augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne pour permettre l'excrétion des acides aminés est obtenue par limitation de biotine, ou par l'addition de la pénicilline à un milieu riche en biotine, au cours de la phase de croissance, ou bien par l'addition des acides gras saturés dans le milieu de culture (DEMAIN et BIRNBAUM, 1968 ; PLACHY, 1984 ; MARQUET *et al.*, 1986).

La concentration idéale en biotine pour la production d'acide glutamique est généralement inférieure à 5µg/l de milieu (NAKAYAMA, 1982).

- A faible concentration de biotine la croissance bactérienne est réduite, la membrane est pauvre en phospholipides et le taux d'acide palmitique est supérieur au taux d'acide oléique. Dans ces conditions, l'acide glutamique est excrété.
- A forte concentration en biotine, la croissance devient optimale, la membrane est plus riche en phospholipides et en acide oléique, et l'acide glutamique n'est plus excrété (PONS *et al.*, 1993).

La limitation du taux de biotine ou des acides gras saturés C₁₆-C₁₈ provoque une biosynthèse incomplète de l'acide oléique, ce qui cause la diminution de taux de phospholipides dans la paroi cellulaire (KINOSHITA, 1985).

La figure explique l'excrétion du glutamate à travers la membrane bactérienne en relation avec leur contenu en phospholipides (HIROSE et *al.*, 1985).

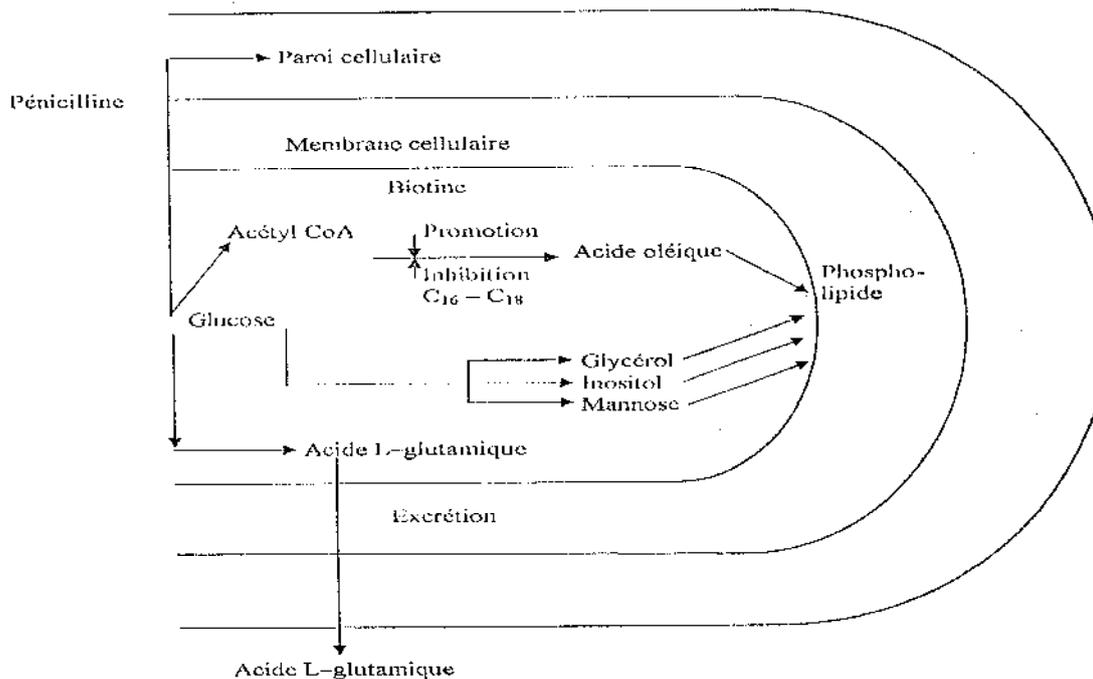


Figure 17 : La perméabilité cellulaire de l'acide glutamique en relation avec contenu de la membrane en phospholipides (HIROSE et *al.*, 1985).

I.5.3.2. La régulation de la biosynthèse de la lysine chez *Corynebacterium glutamicum*

Dans le chemin de la biosynthèse de L-lysine dans *C. glutamicum* qui est illustré dans la figure (08), l'aspartate sert tout d'abord à la synthèse de l'isoleucine car l'homosérine déshydrogénase est naturellement plus active que la dihydrodipicolinate synthétase (SIMON, 1995).

La première enzyme, aspartokinase, est réglée par une rétro-inhibition dû à la concentration de L-thréonine et L-lysine. L-thréonine cause une inhibition de l'homosérine

dehydrogenase, pendant que L-méthionine réprime la synthèse de cette enzyme (LEGLER et al., 1999).

Les mutants de *C. glutamicum* défectueux de l'enzyme homoserine dehydrogenase sont des auxotrophes, ne peuvent croître sauf si l'homoserine (ou un mélange de thréonine et méthionine) est fourni. Ces mutants produisent des grands montants de lysine. La première enzyme dans le chemin commun (aspartokinase) est le sujet d'une action concentrée de lysine et thréonine et le niveau de thréonine trop bas ne sera pas cause pour une inhibition de l'aspartokinase (DALE et PARK, 2010).

VIII-5- Amélioration des souches en vue de la surproduction des acides aminés

Dans de nombreuses voies de biosynthèse, le produit final inhibe le fonctionnement des enzymes ou bien réprime leur synthèse (SCRIBAN, 1993), mais la production d'un métabolite, en grandes quantités peut être obtenue en « dérégulant » le système de régulation (SCRIBAN, 1993 ; GUIRAUD, 1998).

La production de nombreux métabolites par fermentation microbienne fait généralement appel à l'utilisation des mutants (GUIRAUD, 1993). C'est la raison pour laquelle de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des souches industrielles de corynébactéries par mutagenèse et sélection des mutants (SANO et SHIIO, 1967 ; PONS et al., 1993 ; CHASSAGNOLE et al., 2003).

La mutagenèse permet de modifier le fonctionnement des voies et leur régulation. Elle permet de rendre productrices des souches qui ne le sont pas, et de rendre hyper productrices celles qui le sont (GUIRAUD, 1993).

Une stratégie assez sévère a été utilisée pour l'obtention des souches surproductrices d'acides aminés (SHIIO, 1982, SHIIO et NAKAMORI, 1989 ; KHACHATOURIANS, 1995).

- L'utilisation de la génétique pour la suppression des mécanismes de rétrocontrôle ;
- Altération des chaînes intermédiaires des différentes voies ;
- Augmentation de la concentration du substrat de régulation des enzymes en compétition avec l'effet rétrocontrôle ;
- Diminution de la concentration de l'effecteur ou du produit final de la voie ;

- Stimulation de l'assimilation cellulaire du précurseur ;
- Inhibition ou inactivation de l'enzyme concernée par la dégradation de l'acide aminé produit ;

Les souches de *Brevibacterium flavum* ou *Corynebacterium glutamicum* sont très utilisées dans la production des acides aminés de forme L (KINOSHITA, 1985 ; GUIRAUD, 1993), particulièrement des mutants dérivés de ces espèces sont d'un intérêt industriel pour la production de la L-lysine et L-glutamate (MARX *et al.*, 2003).

L'apparition d'une mutation est un phénomène naturel (GUIRAUD, 1993). Les fréquences spontanées très faibles peuvent être augmentées dans d'énormes proportions lorsqu'on soumet le matériel biologique à l'action de certains agents qualifiés de mutagènes (agents physiques, ou agents chimiques) (L'HERITIER et LEBLON, 1999). Pour améliorer une mutation, il est possible de cumuler plusieurs mutations (KINOSHITA, 1985 ; GUIRAUD, 1993).

VI-1- Types de mutants utilisés pour la surproduction des acides aminés

Les microorganismes utilisés dans les processus microbiologiques pour la production des acides aminés, sont divisés en quatre classes : les souches sauvages, les mutants auxotrophes, les mutants de régulation et les mutants auxotrophes de régulation (PLACHY, 1984).

VI-1-1- Les mutants auxotrophes

Les mutants auxotrophes forment un des groupes les plus étudiés (MEYER *et al.*, 2000). Les mutants auxotrophes sont des mutants ayant perdu une enzyme d'une chaîne de biosynthèse en vue d'obtenir un intermédiaire de cette chaîne (RIVIERE, 1975).

La production directe de la L-lysine à partir des hydrates de carbone, a été développée avec un mutant auxotrophe de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en homoserine ou thréonine plus méthionine par KINOSHITA *et al.* (1958) ; NAKAYAMA (1982) ; FLICKINGER et DREW (1999).

La mutation du gène de l'homoserine deshydrogenase a pour effet de supprimer l'activité de cette enzyme et par conséquent, causer la surproduction de la lysine (SHIIO et NAKAMORI, 1989) et d'annuler la synthèse de la thréonine et de la méthionine ; l'un des

inhibiteurs (thréonine) de l'aspartokinase se trouve donc éliminer (OTHMER, 1984; NAKAYAMA, 1985 ; PADIRAC, 1985 ; SASSON, 1985).

Le mécanisme de régulation de la biosynthèse de la lysine chez *Corynebacterium glumicum* est représenté dans le schéma suivant (PONS *et al.*, 1993).

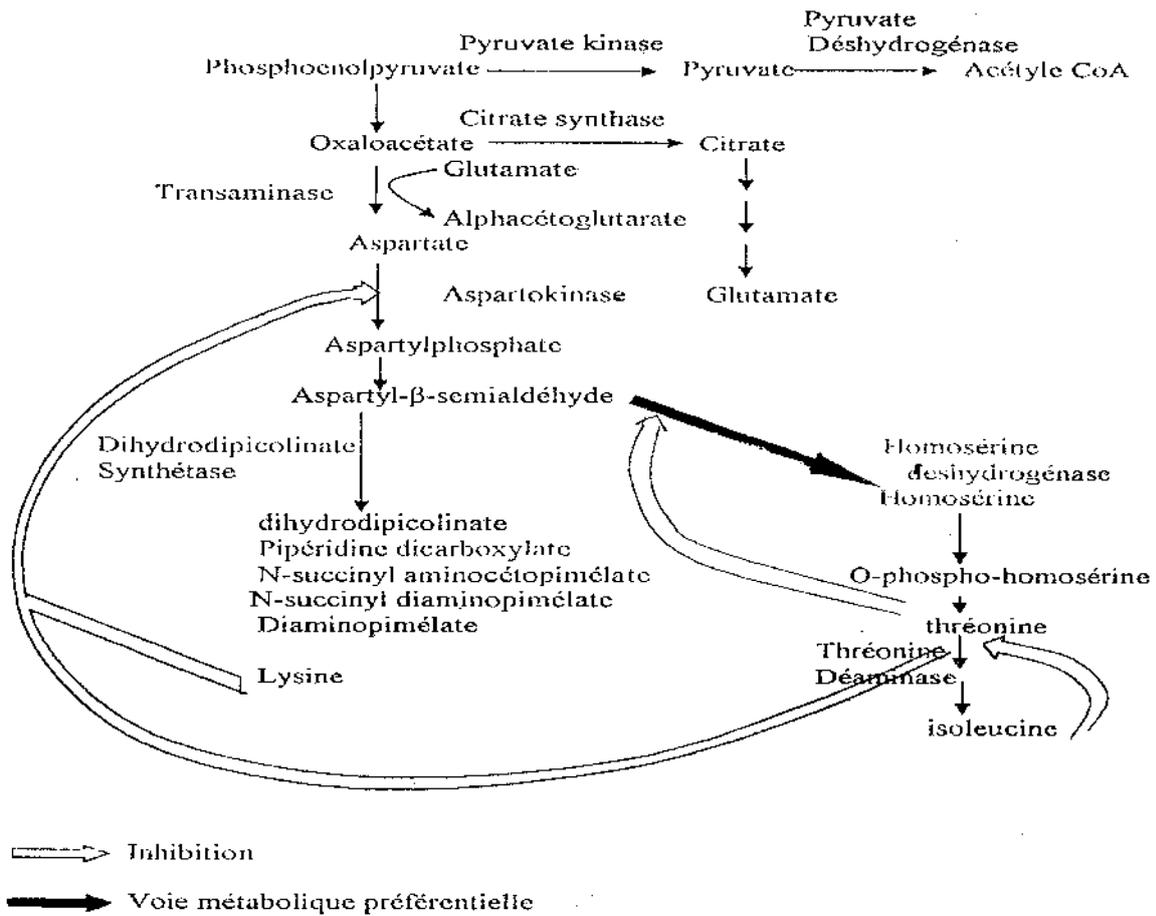


Figure 18 : Voies métaboliques et régulation de la biosynthèse des acides aminés de la familles de l'acide aspartique (PONS *et al.*, 1993).

Introduction générale

Partout dans le monde, la flambée des prix alimentaires a suscité des inquiétudes quant à la sécurité alimentaire mondiale (FAO, 2009).

La forte augmentation des prix alimentaires dans le monde qui, conjuguée à des problèmes de pénurie dans certains pays en développement, menace la sécurité alimentaire mondiale.

La sécurité alimentaire reste l'objectif principal des pays du tiers monde, dans lequel l'une des préoccupations majeures, est l'exigence qualitative et quantitative de la mise à niveau des approvisionnements alimentaires face à une population en expansion (FAO, 2013).

A la lumière des rendements de conversion agricoles, des changements climatiques et ses aléas, il semblerait logique de favoriser la production de protéines végétales plutôt que la production animale, mais il faut se rappeler que cette matière végétale a une qualité nutritionnelle inférieure, liée aux faibles niveaux de certains acides aminés essentiels (Sève, 2010).

De récentes estimations du marché indiquent que la demande mondiale de lysine était de 1,697 Ktonnes en 2011, mais devrait atteindre 2,518 Ktonnes en 2018.

Cette augmentation est attribuable à une demande croissante de viande dans les pays en développement. Le marché des aliments de bétail représente plus de 90% de cette demande (Transparency Market Research, 2013).

En Afrique du Nord, le régime alimentaire est principalement céréalier et la capacité d'utiliser la supplémentation des acides aminés essentiels soit comme apport nutritionnel direct ou comme composant d'aliment de volailles est importante comme ce qui a été utilisé ailleurs pour améliorer la production du bétail.

Sachant que ces acides aminés essentiels ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme, il est donc nécessaire de trouver une manière efficace de produire de tels compléments alimentaires. Il suffit d'exploiter la capacité des bactéries à produire des acides aminés spécifiques, par fermentation, à partir de substrats carbonés bon marché (Jacotot et Campillo, 2003).

Ceci peut être réalisé en utilisant des microorganismes GRAS tel que *Corynebacterium glutamicum*, largement utilisé industriellement pour la production de glutamate et de lysine, la biomasse générée peut aussi être exploitée pour l'alimentation animale (Delaunay et al., 2003).

Toutefois, ce groupe de bactérie ne produit pas naturellement des acides aminés autres que le glutamate et des mutations sont nécessaires pour exploiter cette grande capacité de synthèse des autres acides aminés.

Si cela a été réalisé à des niveaux élevés avec la lysine, les autres acides aminés se sont également révélés être des cibles réelles. Des études de mutations génétiques combinées ainsi que des techniques de screening efficaces ont été utilisées de pair avec des conditions de fermentation optimisées et développées au fil des années pour atteindre des niveaux de production nettement supérieurs à 100g/l (Lee et *al.*, 2012).

Beaucoup de ces souches sont développées industriellement et sont donc protégées par des brevets, mais les souches « sauvages » sont abondantes dans l'environnement et peuvent être de bonnes sources de potentiel producteur pouvant être développé pour répondre aux contraintes spécifiques de production.

Le séquençage du génome de *C. glutamicum* a fourni une base solide pour l'ingénierie métabolique et l'application des techniques de génie génétique (Kalinowski et *al.*, 2003).

Mais, l'opinion des consommateurs joue, encore, un rôle déterminant dans le choix des techniques à appliquées aux microorganismes, à savoir, l'utilisation des techniques d'amélioration modernes, comme le génie génétique, ou plutôt des approches plus classiques par l'emploi de mutation non ciblée (Becker et *al.*, 2011). Dans le premier cas, la souche est classée comme OGM ce qui n'est le cas avec l'approche mutagénèse-sélection qui est, donc, l'approche privilégiée dans cette étude.

L'objectif de ce travail est d'isoler des souches de bactéries corynéformes à partir de différents substrats, de mettre en évidence la production de glutamate et ensuite essayer de voir si les souches isolées pourraient être des sources possibles de souches productrices d'autres acides aminés.

Une mutation classique, en utilisant un agent mutagène chimique, en l'occurrence, l'Ethylméthane Sulfonate (EMS), ainsi qu'un criblage en vue d'obtenir des bactéries auxotrophes à certains acides aminés.

La composition du milieu de fermentation, son influence sur la productivité, en lysine, et sur la croissance de la souche ainsi que les conditions de culture ont été étudié en vue d'optimiser la production de la lysine par le mutant sélectionné.

Un des facteurs potentiellement limitant de la production de lysine est l'inhibition par son accumulation dans le milieu, provoquant ainsi les régulations par rétro-inhibition de la voie de biosynthèse. Pour examiner le potentiel naturel de la souche mutée a accumulé la lysine, les effets des ajouts de lysine dans le milieu de culture ont été étudiés.

L'étude du rétablissement ou la levée de la rétro-inhibition a été suivi par les quantités de méthionine et de thréonine ajoutées dans le milieu et leurs effets sur la productivité et la croissance de la souche mutée.

Des études sur la physiologie de la souche isolée ont donné lieu au calcul des taux de croissance ainsi que l'influence de la pression osmotique sur la productivité de la souche.

Enfin, l'analyse stœchiométrique des flux métaboliques est examinée afin de voir l'influence du flux sur le métabolisme central et le rendement en acide aminé.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES

Le terme « protéine » provient du Grec « proteno », signifiant je prends la première place (Biesalski et Grimm, 2001 ; Chikhi et Bensegueni, 2002). Dans presque tous les aliments, il existe des protéines, mais de nature différente (Jbernier *et al.*, 1988), ce sont des nutriments particulièrement importants, représentant 15 à 25 % de la matière sèche des aliments.

L'homme en consomme chaque jour environ 60 à 100g (Jacotot et Campillo, 2003). Ce sont des substances organiques d'origine animales ou végétales qui forment la trame des structures cellulaires de l'organisme. Les protéines devraient représenter 15 % de notre ration alimentaire quotidienne (Montignac, 1991 ; Weil, 1994). Elles interviendraient sur des fonctions intéressantes comme la satiété, le contrôle de la glycémie, la résistance à l'insuline, les fonctions du système immunitaire, la décalcification osseuse ou encore la fonte musculaire (Tome, 2008).

Les protéines assurent un rôle structural de participation au renouvellement des tissus de l'organisme ainsi que de nombreuses fonctions physiologiques ; par exemple sous la forme d'enzymes digestives, d'hémoglobine, d'hormones, de récepteurs et d'immunoglobuline (Bouvier *et al.*, 2010).

Leur rôle nutritionnel est de fournir des acides aminés, de l'azote et de l'énergie (Tome, 2009).

Ce sont de grosses molécules constituées de nombreux acides aminés qui en formant l'élément de base (Montignac, 1991). Il est généralement admis qu'il y a huit acides aminés indispensables qui doivent être présents dans la nourriture que nous mangeons, ce sont : l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine (Voet et Voet, 1998).

II. HISTORIQUE

Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines qu'elles soient végétales ou animales (Letutour, 1989), elles occupent dans le monde vivant une place importante. Ceux-ci sont de connaissance relativement récente, les vingt plus importants n'ont été caractérisés qu'entre 1820 (glycocolle par BRACONNOT) et 1935 (thréonine par ROSE) (Louisot, 1980 ; Loos *et al.*, 2001).

Jusqu'à la fin du siècle dernier et le milieu de ce siècle, les acides aminés n'étaient obtenus que par synthèse chimique ou par extraction à partir des hydrolysats des protéines (Plachy, 1984 ; Kinoshita et *al.*, 1985), ainsi ces méthodes ne servaient qu'aux besoins de simple expérimentation (Kinoshita et *al.*, 1985).

En 1908, Ikeda a découvert l'acide glutamique sous la forme du L-glutamate, monosodique (Kinoshita et Tanaka, 1972 ; Hirasawa et *al.*, 2001). Ce dernier est un acide aminé non essentiel qui est principalement utilisé en alimentation humaine (Marquet et *al.*, 1986 ; Pons et *al.*, 1993 ; Dudeck, 2003) vu ses qualités organoleptiques.

Les asiatiques utilisent traditionnellement dans leur alimentation des algues de la famille des laminaires pour renforcer le goût propre de leurs aliments (Chassagnole et *al.*, 2003).

Ikeda a montré que les propriétés gustatives de ces algues étaient due à leur forte teneur en L-glutamate de sodium (Pons et *al.*, 1993 ; Moll et Moll, 1998), qui est de loin l'exhausteur de goût le plus répandu sur le marché mondial (Moll et Moll, 1998).

Depuis cette découverte, les demandes des industries alimentaires ont été de plus en plus importantes à travers le monde, en particulier durant la 2^{ème} guerre mondiale (Hirasawa et *al.*, 2001).

A la fin des années cinquante des chercheurs japonais ont mis au point un procédé pour la préparation de l'acide glutamique et plus tard la lysine (Kinoshita et Nakayama, 1978).

En 1957, le premier procédé de fermentation pour la production industrielle des acides aminés par les micro-organismes a été décrit par Kinoshita et *al.* Des cultures ont été utilisées pour la production de l'acide glutamique puis de la L-Lysine (Kikuchi et Nakao, 1986 ; Guyonvarch, 1993 ; Lessaro et Sinsky, 2003). Le développement de cette production a été stimulé par une demande croissante en acide glutamique, lequel a été produit par les japonais en 1909 en rapport avec l'utilisation de cet acide aminé comme un moyen pour rehausser le goût des plats traditionnels du Japon (Kinoshita, 1972 ; Kwinn, 2003 ; Lessaro et Sinsky, 2003).

Comme la demande pour le glutamate augmente, des processus plus performant que les anciennes méthodes sont recherchées (Hirasawa et *al.*, 2001).

En 1960, des études fondamentales et appliquées utilisant le glucose et la mélasse comme source de carbone étaient extrêmement réussies dans la détermination des conditions de la fermentation élucidant les mécanismes d'accumulation d'acide glutamique et régulant la perméabilité membranaire de ce dernier (Kikuchi et Nakao, 1986 ; Kwinn, 2003).

La production des acides aminés par fermentation est devenue une réalité industrielle après la découverte d'un producteur efficace d'acide glutamique *Micrococcus glutamicus* appelé plus tard *Corynebacterium glutamicum* par Kinoshita et *al.*, en 1957 (Khachatourians, 1995 ; Moritz et *al.*, 2000 ; Hall et *al.*, 2003) qui est le meilleur producteur (Melaouene, 1993), suivi de peu par Asahi et *al.*, en 1979, en décrivant des souches productrices d'acide glutamique (Glanemann et *al.*, 2003).

D'importante activité de recherche ont été concentrée sur la production microbienne des acides aminés (Sauvageot, 1984).

La première raison de ces efforts est l'espoir d'améliorer la valeur nutritionnelle des protéines végétales, bon marché, avec des acides aminés essentiels (Radmacher et *al.*, 2002).

Il se trouve que la plupart des souches isolées de la nature ne peuvent pas produire de grande quantité d'acides aminés à l'exception de quelques un (Val, Ala, Leu), à cause de la régulation du métabolisme cellulaire évitant donc le gaspillage des métabolites microbiens (Sano et Shiio, 1967 ; Nakayama, 1982).

Pour accumuler dans le milieu des quantités importantes d'acides aminés, il est parfois nécessaire de modifier le métabolisme cellulaire ou la régulation du métabolisme (Khachtourians, 1995 ; Flickinger et Drew, 1999).

La régulation du métabolisme cellulaire consiste surtout dans la rétro-inhibition et la répression, qui évitent les surproductions des métabolites primaires comme les acides aminés et les nucléotides (Nakayama, 1982 ; Flickinger et Drew, 1999).

L'existence de ces phénomènes de régulation a été clarifiée au moment de l'isolement de *Corynebacterium glutamicum* et sont maintenant très bien connues (Nakayama, 1982 ; Glanemann et *al.*, 2003).

La modification du métabolisme cellulaire exige une bonne connaissance de la voie de biosynthèse des acides aminés ce qui a contribué d'une façon considérable au développement du processus de fabrication (Khachatourians, 1995).

Escherichia coli a été largement utilisée pour la bonne connaissance de sa biologie moléculaire et de l'utilisation des techniques de l'ADN recombiné, mais on a trouvé que *Corynebacterium glutamicum* était d'un meilleur intérêt dans la production des acides aminés (Khachatourians, 1995 ; Delaunay et al., 2003).

Par la suite, Nakayama et al., (1961) ont décrit des mutants auxotrophes de *Corynebacterium glutamicum* capables d'excréter de la lysine, obtenus à partir de souches productrices d'acides glutamique (Pons et al., 1993 ; Marx et al., 2003).

Plus tard un autre processus utilise un mutant de régulation de *Brevibacterium flavum* qui est développé par la compagnie AJINOMOTO. Récemment, ces deux processus impliqués dans la préparation de l'acide glutamique et de la lysine par des moyens de fermentation à l'échelle industrielle, le succès de la biochimie et de la génétique dans la clarification du mécanisme de biosynthèse et de la régulation ont rendu possible les procédés de fabrication d'un grand nombre d'acides d'aminés présents dans les protéines (Plachy, 1984).

A l'heure actuelle, des procédés de fermentation ont été décrits pour pratiquement tout les acides aminés (Pons et al., 1993 ; Hirasawa et al., 2001 ; Kwinn , 2003). Ces derniers peuvent être produits par diverses souches mutantes de *Corynebacterium*, *Brevibacterium* ou *Arthrobacter* (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990). La première raison de cet effort est l'espoir d'améliorer la valeur nutritionnelle des protéines végétales, bon marché, par l'incorporation des acides aminés essentiels (Kinoshita et Nakayama, 1979 ; Delaunay et al., 2001).

La principale motivation de ces efforts est la production de protéines alimentaires capables de compléter, voir de remplacer les protéines animales ou végétales (Meyer et al., 2000).

III. GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES

Plus de 250 acides aminés différents sont actuellement répertoriés, toute fois, toutes les protéines (qu'elles soient d'origine bactérienne, végétale ou animale) sont constituées à partir d'un groupe de 20 acides aminés. Ils sont qualifiés d'acides aminés standard (Alais et Linden, 1997 ; Masson, 2002 ; Jacotot et Campillo, 2003).

Ces vingt acides aminés, sont les unités structurales de la plupart des protéines, on les a nommé acides aminés, car ce sont des substances organisées autour d'un atome de carbone portant la fonction acide (COOH) ; la fonction basique – NH₂ (d'où le nom acide aminé), un

atome d'hydrogène et un radical R (Adrian et *al.*, 1981, Dupin et *al.*, 1992 ; Pascaud, 1999) qui diffère pour chaque acide aminé. Ils ont pour structure moléculaire commune :

- Une fonction carboxylique
 - Une fonction amine primaire
- } **Portées par le carbone α d'où le terme parfois rencontré d'acide α -aminé**
- Un radical dont la composition détermine la nature de l'acide aminé.

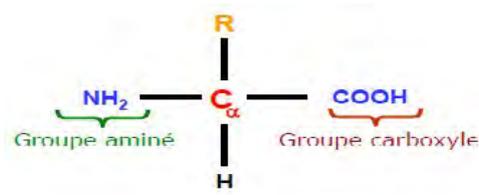


Figure n°1: Structure générale des acides aminés (Sève, 2010)

Hormis dans la glycine, l'atome α -carbone est chiral (asymétrique), il possède quatre groupement différents fixés chimiquement, donc les acides aminés peuvent exister comme paires de stéréo-isomères (D et L) optiquement actifs, cependant on ne trouve que les L-isomères dans les protéines (Turner et *al.*, 2000).

III.1. Les sources des acides aminés

Généralement une molécule a plusieurs origines et dérive de divers précurseurs. Ainsi une protéine, macro polymère d'acides aminés, est synthétisée en partie à partir des acides aminés apportés par les protéines des aliments (précurseurs exogènes), en partie à partir des acides aminés résultant de la dégradation des protéines cellulaires pré-existantes (précurseurs endogènes) (Pascaud, 1999).

III.1.1. Sources exogènes (l'alimentation protéique)

Les sources des protéines sont généralement des produits d'origine animale et végétale. Cependant les protéines d'origine végétale sont pauvres en acides aminés indispensables, contrairement aux protéines d'origine animale qui en sont riches et équilibrées (Jacotot et Campillo, 2003).

Pour l'ensemble des populations humaines, ce sont les sources végétales qui fournissent la majorité des protéines alimentaires (50 à 60 % par les céréales, 20 % par les tubercules), alors que les protéines animales ne représentent que 20 à 25 %.

Mais la répartition est très différente selon le niveau de vie et le degré d'industrialisation. Environ 50% des protéines sont d'origine animale dans les pays riches, contre moins de 20% dans le tiers monde (Jacotot et Campillo, 2003). A l'occasion du renouvellement des protéines corporelles, certains acides aminés peuvent être synthétisés à partir des nutriments carbonés et des groupements NH₂ fournis par le métabolisme intermédiaire, d'autres ne le sont que très lentement ou ne peuvent l'être ; ces dernières sont « indispensables » et toute ration équilibrée doit les apporter (Jacquot, 1999).

L'alimentation doit donc couvrir les besoins qui sont à la fois quantitatifs et qualitatifs.

III.1.1.1. Besoins quantitatifs

Les études sur les besoins nutritionnels et les apports recommandés ont été faites par des personnes hautement compétentes et qualifiées (Dupin et Moreau, 1981).

Un adulte a un besoin minimum de 10 à 15 g d'azote protéique par jour, ces quantités augmentent dans la période de croissance, au cours de la grossesse et dans les circonstances pathologiques.

Le tableau n°1 expose les besoins de l'enfant et de l'adulte en acides aminés indispensables (en mg/kilocalorie/jour), le besoin a deux justifications : renouvellement des protéines (entretien) chez l'adulte et croissance chez l'enfant (Pascaud, 1999).

Tableau n°1 : Les besoins de l'enfant et de l'adulte en acides aminés indispensables (mg/kilocalorie/jour) (Adrian et *al.*, 1981 ; Cheftel et *al.*, 1992 ; Pascaud, 1999)

Acide aminé indispensable	Enfant d'un an	Enfant de 5 ans	Homme adulte
Histidine	28	0	0
Leucine	160	25	14
Isoleucine	70	18	10
Lysine	103	22	12
Méthionine + Cystéine	58	24	13
Phénylalanine+Tyrosine	125	25	14
Thréonine	87	13	7
Tryptophane	17	7	4
Valine	93	18	10

III.1.1.2. Besoins qualitatifs

Certains acides aminés doivent obligatoirement être présents dans la ration alimentaire, pour assurer une croissance normale, et le maintien des tissus chez l'adulte.

Ces acides aminés essentiels correspondent aux acides aminés dont l'organisme humain est incapable de faire la synthèse (Jacotot et Campillo, 2003) ; ce sont les acides aminés « indispensables » (Pilardeau, 1985 ; Jacotot et Campillo, 2003).

Les protéines ingérées auront alors d'autant plus de valeurs qu'elles renfermeront ces acides aminés (supériorité des protéines animales par rapport aux protéines végétales).

Chez l'homme les acides aminés indispensables sont au nombre de huit ; se sont :

❖ Les acides aminés strictement indispensables

- La leucine ;
- La lysine ;
- L'isoleucine ;
- La méthionine ;
- La phénylalanine ;
- La valine ;
- Le tryptophane.

(Polonovski et *al.*, 1973 ; Adrian et *al.*, 1981 ; Cheftel et *al.*, 1985 ; Jacotot et Campillo, 2003).

D'autres sont potentiellement indispensables dans certaines circonstances physiologiques ou pathologiques (Jacotot et Campillo, 2003).

❖ Acides aminés potentiellement indispensables

- Histidine (en période de croissance) ;
- Lysine ;
- Tyrosine ;
- Arginine (en période de croissance) ;
- Taurine ;
- Glycine ;
- Glutamine ;
- Proline.

❖ Acides aminés non indispensables

- Acide aspartique ;
- Acide glutamique ;
- Alanine ;
- Cystéine ;
- Asparagine ;
- Ornithine ;
- Sérine.

(Jacotot et Campillo, 2003).

Mader (2002) propose la classification suivante :

AAs essentiels	AAs semi-essentiels	AAs non essentiels
- Isoleucine	- Histidine	- Alanine
- Leucine	- Arginine	- Acide aspartique
- Lysine	- Tyrosine	- Acide glutamique
- Méthionine	- Cystéine	- Glycine
- Phénylalanine		- Proline
- Thréonine		- Sérine
- Tryptophane		- Ornithine
- Valine		- Citrulline

III.1.2. Sources endogènes

Chez l'adulte à l'entretien, l'usure des protéines corporelles correspond à la dépense endogène spécifique d'azote qui a la signification inéluctable du métabolisme de base et lui est contingente : cette dépense est d'environ 2mg d'azote par kilocalorie basale dans toute cellule animale (Jacquot, 1999, Jacotot et Campillo, 2003).

La libération des acides aminés s'effectue à partir des protéines tissulaires, ou à partir d'un pool d'acide aminé et la synthèse de certains d'entre eux « acides aminés non indispensables » (Jacotot et Campillo, 2003).

IV. ROLE DES ACIDES AMINES

Les acides aminés sont indiscutablement les nutriments fondamentaux indispensables. A l'origine, ce sont des constituants des protéines qui comptent parmi les substances constitutives essentielles de la matière vivante, servant à l'édification, au renouvellement et à la réparation des cellules (Boussaboua, 2005).

Les acides aminés constituent également des agents de structure irremplaçables des muscles, mais aussi des neurotransmetteurs, des chromosomes, des anticorps, des récepteurs et de certaines hormones, et sont impliqués dans de nombreuses synthèses (Boussaboua, 2005).

IV.1. Rôle de quelques acides aminés essentiels (Tome, 2009)

- **L'isoleucine** : c'est un anti-stress, il a un rôle cétogénique et glycogénique ;
- **La leucine** : c'est un anti-stress, joue un rôle cétogénique, un excès en leucine exacerbe la pélagre (carence en B₃ par stimulation de son élimination) ;
- **La valine** : c'est un anti-stress, glycogénique, serait un des coupables des allergies alimentaires et des intolérances en lien avec une sub-carence en B₆ et Mg ;
- **La phénylalanine** : c'est un antalgique et un antidépresseur par élévation de norepinéphrine ;
- **La thréonine** : relaxeur d'immunité, nécessaire surtout chez l'enfant ;
- **Le tryptophane** : Inducteur du sommeil, mais il s'agit d'un métabolite toxique capable de provoquer les myalgies avec hyper éosinophilie ;
- **La méthionine** : c'est un acide aminé anti-allergique, en carence il cause des athéroscléroses prématurée, une utilisation insuffisante de B₉ et des allergies ;
- **La lysine** : il augmente les défenses immunitaires globalement, L-lysine a un rôle détoxiquant du plomb et autres métaux lourds chez les personnes âgées.

VI.2. Rôle de quelques acides aminés non essentiels (Mader, 2002)

- **Arginine** : est utilisé dans les cas de lésions du foie, accélère la cicatrisation, régularise le cycle de l'urée ;
- **Acide aspartique** : améliore le rendement corporel ;
- **Cystéine** : capte les radicaux libres pour la désintoxication, important pour la peau et les cheveux.
- **Acide glutamique/glutamate** : nutriment du cerveau, améliore le pouvoir de concentration chez les personnes atteintes d'ulcère et de dépression ;

- **Glycine** : important pour la formation des acides biliaires. Augmente l'élimination de l'acide urique par le rein, stabilise le système immunitaire ;
- **Histidine** : protège les nerfs, important pour la production du sang ; aide en cas d'arthrite ;
- **Ornithine**: stimule le système immunitaire, soutient l'hypophyse, ralentit le processus du vieillissement ;
- **Taurine** : important pour la formation des acides biliaires, meilleure désintoxication du foie, soutient l'activité cardiaque ;
- **Tyrosine** : important pour les transmetteurs et la formation des hormones.

V. ECONOMIE DE PRODUCTION DES ACIDES AMINES PAR FERMENTATION

Les principales firmes productrices d'acides aminés dans le monde sont au nombre de dix-sept. Ces firmes, produisant essentiellement de l'acide glutamique, dont treize sont situées dans le Sud-est asiatique (Pons, 1979 ; Dudeck, 2003).

Ainsi le Japon est le principal producteur d'acides aminés et KYOWA HAKO et AJINOMOTO CO ont le monopole mondial (Plachy, 1984, Arepit, 1986), et détient pratiquement toutes les licences pour une vingtaine d'acides aminés dont le marché est d'environ 1 milliard de Dollars (Arepit, 1986).

Les acides aminés sont fabriqués par fermentation soit en utilisant des souches sauvages, soit, des souches ayant subi des mutations génétiques (Lessard et Sinsky, 2003).

En Europe, où la France occupe une position favorable, les principaux producteurs sont ORSAN (aujourd'hui faisant partie du groupe Ajinomoto) pour l'acide glutamique (Pons et *al.*, 1979 ; Arepit, 1989), EUROLYSINE pour la lysine et la thréonine (Pons, 1979 ; Padirac, 1985, Arepit, 1986) et RHONE POULENC pour la méthionine (Faure et *al.*, 1984 ; Arepit, 1986).

Depuis 1974, 48 brevets importants ont été entrepris aux Etats Unis sur la production d'acides aminés par voie biologique. Sur les 48 brevets, huit concernant la L-lysine, quatre pour l'acide glutamique (Pons, 1979).

Mais sur le plan de tonnages, La production annuelle des acides aminés dans le monde est d'environ 2 millions de tonnes, dont la production de glutamate de sodium est de l'ordre

de 1 million alors que celle de L-lysine est de l'ordre de 0,6 million utilisés comme additifs dans l'alimentation animale (Lessard et Sinsky, 2003 ; Eggeling et Bott, 2005).

A l'heure actuelle, les acides aminés tels que L-glutamate et L-lysine sont produits sur une échelle de million de tonnes par fermentation (Udaka, 2008 ; *in*: Burkovski, 2008).

La production mondiale annuelle d'acide aminé a augmenté année après année, et elle est estimée actuellement à 2 millions de tonnes (Ikida, 2003 ; *in*: Faurie et Thommel, 2003).

La consommation mondiale se répartit pour 66% dans les additifs alimentaires, 33% pour l'alimentation animale et pour 1% dans les spécialités chimiques, représentant respectivement 52,30 et 18% d'un marché mondial estimé à plus de 800 millions de dollars (Ikida, 2003 ; *in*: Faurie et Thommel, 2003).

Les principaux producteurs de lysine sont Ajinomoto, ADM, Kyowa, Hakko, Cheil Jedang, BASF et Degussa. La L-lysine est produite exclusivement par des bioprocédés utilisant les bactéries de la famille de corynéformes (Hermann, 2003).

Le tableau n°2 résume les principales firmes de production des acides aminés (Flickinger et Drew, 1999 ; Hermann, 2003).

Tableau n°2 : Principales firmes de production des acides aminés par fermentation (Pons, 1979; Flickinger et Drew, 1999)

Firmes	Pays
ADM	ALLEMAGNE
AJINOMOTO	JAPON
ASAHI CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
BASF	ALLEMAGNE
DEGUSSA	ALLEMAGNE
EUROLYSINE (groupe Ajinomoto)	FRANCE
KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
KYOWA HAKKO HOGGYO	JAPON
MI.WON	COREE DU SUD
ORSAN	FRANCE
STAUFFER CHEMICAL	USA
TANNABLE CHEMICAL INDUSTRY	JAPON
TANNABLE SEIYAKU	JAPON
TUNGAL INDUSTRIAL FERMENTATION	TAIWAN
WEI CHUAN FOODS	TAIWAN
WEI WANG INDUSTRIAL FERMENTATION	TAIWAN

L'estimation de la production mondiale annuelle, en tonnes, d'acides aminés par fermentation en 2007, 2011 et les perspectives en 2015 sont représentées respectivement dans le tableau n°3.

Tableau n°3 : La production mondiale (en tonnes) d'acides aminés par fermentation en 2007, 2011 et les perspectives en 2015 (Vertes et *al.*, 2013 ; *in*: Yokawa et Inui, 2013)

Acide aminé	2007	2011	2015
Acide glutamique	251.600	266.200	299.800
Lysine	139.200	159.400	212.500
Méthionine	217.000	236.100	280.600
Phénylalanine	93.000	99.900	116.100
Les autres acides aminés	181.200	201.500	250.200

VI. UTILISATION DES ACIDES AMINES

Les acides aminés ont trois aires majeures d'utilisation : Alimentation, médecine et comme matières premières dans l'industrie chimique (cuir artificiel, édulcorant, etc....) (Othmer, 1984 ; Hirose et Enei, 1985) comme ils peuvent aussi être utilisés dans le domaine de cosmétologie (Pons, 1979). Le tableau suivant résume les utilisations des acides aminés (Plachy, 1984 ; Delaunay et *al.*, 2001) :

Tableau n°4: Principales utilisations des acides aminés (Plachy, 1984 ; Delaunay et *al.*, 2001)

Aires d'application	Application	Acides aminés
Alimentation animale	<ul style="list-style-type: none">• Supplémentarité des fourrages	<ul style="list-style-type: none">• Méthionine, lysine
Industries alimentaires	<ul style="list-style-type: none">• Agent d'aromatisation• Supplémentarité des aliments• Agents édulcorants	<ul style="list-style-type: none">• Acide glutamique• Lysine• Glycine
Médecine	<ul style="list-style-type: none">• Solution d'infusion• Application thérapeutique	<ul style="list-style-type: none">• Acides aminés essentiels et non essentiel.+ Arginine+ 2,4 dihydro-phényl-alanine+ tryptophane
Industrie chimique	<ul style="list-style-type: none">• Agents tensioactifs et détergents• Polymères	<ul style="list-style-type: none">• Acide aminoacyls• Polyamination-acides

VI.1. Utilisation des acides aminés en alimentation

Un apport quotidien d'acides aminés est indispensable pour couvrir les besoins des organismes humains et animaux (Padirac, 1985 ; Lessard et Sinsky, 2003).

VI.1.1. Utilisation des acides aminés en alimentation humaine

Le besoin nutritionnel quotidien est estimé selon les « Recommended Daily Allowance » (RDA) entre 44 et 56 grammes par jour pour l'ensemble des acides aminés, ce

besoin doit être considéré comme un minimum, car l'organisme a un besoin continu en acides aminés, pour fabriquer chaque seconde environ 2,5 millions de globules rouges, pour remplacer tout les quatre jours environ les plaquettes, les entérocytes, et huit ou dix jours pour renouveler la plus part des leucocytes etc... , c'est à dire que la synthèse protéique est incessante et donc que les apports en acides aminés doivent être suffisants, en ce qui concerne surtout les acides aminés essentiels (Jacotot et Campillo, 2003).

La composition en acides aminés d'une protéine détermine, dans une large mesure, sa valeur comme source d'acide.

En effet, l'homme se procure ainsi les acides aminés essentiels dont il est incapable d'effectuer la synthèse (Rivière, 1975 ; Jacotot et Campillo, 2003).

La qualité nutritionnelle des protéines alimentaires correspond à leur capacité à couvrir les besoins en azote et en acides aminés pour assurer la croissance et l'entretien des tissus. Cette capacité dépend non seulement de la composition des protéines en acides aminés essentiels mais aussi, de leur digestibilité, et du métabolisme des acides aminés absorbés (Tome, 1999).

Cette valeur nutritionnelle des protéines dépend considérablement de l'importance des quantités et de l'équilibre naturel des acides aminés pris individuellement et peut être augmenté par une supplémentation des aliments en acides aminés absents des protéines, spécialement d'origine végétale (Dudeck, 2003 ; Kwinn, 2003), mais s'il manque un seul de ces acides aminés, ou s'il est en quantité insuffisante, il ne sera plus possible d'assimiler les protéines alimentaires dans leur totalité.

Othmer (1984), définit le coefficient protéique (CEP) comme étant le rapport du gain de poids du corps par le poids de protéine consommée par rapport à la protéine de référence pendant une durée donnée.

Il a montré que presque toutes les protéines végétales ont un CEP inférieur à celui des protéines animales.

Deux acides aminés ont une importance majeure car ils se trouvent en faible quantité dans beaucoup d'aliments en particulier les céréales, il s'agit de la lysine et de la méthionine (Padirac, 1985 ; Mader, 2002 ; Jacotot et Campillo, 2003).

Cependant, la valeur nutritive des protéines végétales peut être améliorée par supplémentation des acides aminés limitants ; tel que la lysine qui est utilisée pour enrichir les aliments (Othmer, 1984 ; Lessard et Sinsky, 2003).

Les valeurs de CEP de quelques protéines de céréales avant et après fortification avec les acides aminés essentiels limitant tel que la L-lysine, DL-thréonine et DL-tryptophane sont exposées dans le tableau suivant :

Tableau n°5 : Evaluation biologique de la fortification des acides aminés des céréales (Othmer, 1984)

Céréales	Acides aminés fortifiés	CEP chez le rat
Riz	L-lysine 0,2 %	1,50
	DL-thréonine 0,2 %	2,61
Farine de blé	L-lysine 0,2 %	0,65
	L-lysine 0,2 %	1,56
	DL-thréonine 0,3 %	2,67
Maïs	L-lysine 0,4 %	0,85
	L-lysine 0,4 %	1,08
	Tryptophane	2,55
Grains de sorgho	L-lysine-HCl 0,2 %	0,69
		1,77
Orge	L-lysine-HCl 0,2 %	1,66
	DL-thréonine 0,2 %	2,28

Les acides aminés donnent du goût (Othmer, 1984) ; ils sont largement utilisés en alimentations, certains sont utilisés comme exhausteur du goût, tel que l'acide glutamique (E620) utilisé sous forme de L-glutamate monosodique (MSG) pour rehausser le goût de quelques produits alimentaires grâce à des propriétés sapides (Moll et Moll, 1998 ; Chassagnole et *al.*, 2003), il est employé dans l'industrie alimentaire comme un aromate, car il donne un goût agréable aux plats japonais traditionnels (Moll et Moll, 1998) dont il est nommé en japonais « Umami » que l'on tente de traduire en français par goût « saveur », « délicieux », « satisfaisant », « palatabilité », « plus cuisiné » (Pons, et *al.*, 1993 ; Moll et

Moll, 1998) ; c'est la raison pour laquelle que le glutamate monosodique est de loin l'exhausteur de goût le plus répandu sur le marché mondial (Moll et Moll, 1998 ; Flickinger et Drew, 1999).

Ainsi que L-aspartyl-L-phénylalanine méthyle ester, a un goût très fort, excellent et doux (Othmer, 1984) ; alors que la cystéine est utilisée pour améliorer la texture du pain (Sasson, 1985; Hirasawa *et al.*, 2001).

D'autres acides aminés sont utilisés pour rehausser la valeur nutritive de certains aliments, tel que les protéines végétales, il s'agit principalement de la lysine et de la méthionine (Moll et Moll, 1998).

L'omission ou la carence d'un seul acide aminé indispensable a des répercussions plus graves particulièrement chez le jeune en croissance.

On appelle facteur limitant l'acide aminé qui se trouve en quantité relativement insuffisante par rapport aux autres.

De façons générales, les protéines animales sont assez bien équilibrées (Cheftel *et al.*, 1992). La supplémentation par les acides aminés consiste à combler le déficit en acides aminés limitants secondaires (Cheftel *et al.*, 1992).

En alimentation humaine, quelques essais encourageants ont été effectués en Inde et en Afrique sur des enfants initialement mal nourris et recevant du blé enrichi en lysine, du soja ou des légumineuses enrichies en méthionine. Malheureusement de nombreux autres essais n'ont pas conduit aux résultats escomptés (Cheftel *et al.*, 1992).

Sur un plan pratique, dans certains pays en voie de développement, d'Amérique latine et d'Afrique du Nord, on a introduit des farines pour l'alimentation infantile à base de protéines locales complémentaire entre elles et correctement associées et parfois enrichis en acides aminés (Cheftel *et al.*, 1992).

VI.1.2. Utilisation des acides aminés en alimentation animale

L'utilisation de la lysine en alimentation animale a connu un développement considérable ces dernières années (Letutour, 1989 ; Chassagnole *et al.*, 2003 ; Kwinn, 2003).

La méthionine et la lysine sont ajoutés aux mélanges de fourrages (Othmer, 1984 ; Enei et Hirose, 1985, Sasson, 1985), afin d'améliorer la qualité nutritionnelle de leur protéine,

ces suppléments sont constitués de matière sèche issue de la fermentation et ne nécessitant pas de purification car l'organisme utilisé n'est un OGM (Glanemann *et al.*, 2003).

Ces suppléments ont diminué les coûts relatifs à l'utilisation de la farine de graine de soja ainsi que la farine de poisson (Nakayama, 1985; Lessard et Sinsky, 2003).

Ces deux farines étaient utilisées pour équilibrer une alimentation végétale qui peut être réalisée en mélangeant judicieusement des végétaux ne présentant pas les mêmes déficits ou bien de préférence en ajoutant des produits d'origine animale (Padirac, 1985).

Les niveaux de suppléments en lysine que l'on peut rencontrer en pratique selon les espèces animales sont représentés dans le tableau n°8, les secteurs porcins et volailles de chair constituent le principal débouché de l'utilisation actuelle de lysine, mais des applications diverses telles que l'alimentation du lapin, du veau de boucherie sont loin d'être négligeable. Les applications chez les chiens et les chats se développent actuellement (Letutour, 1989 ; Kwinn, 2003).

La lysine n'est pas utilisée chez les ruminants dont la configuration de l'appareil digestif ne permet pas une valorisation satisfaisante dans sa forme actuelle (Dudeck, 2003 ; Kwinn, 2003) et le tableau suivant résume les exemples d'utilisation pratique de L-lysine-HCl dans les aliments composés (Letutour, 1989).

Tableau n°6 : Exemple d'utilisation pratique de la L-lysine-HCl dans les aliments composés (Letutour, 1989)

Catégories	Exemples	Quantité (g/tonne d'aliment)
Porc	Porcelet	1.500 à 3.500
	Truite	
	Porc charcutier	500 à 1.000
Volailles	Poulet jaune et pintade	1.000 à 2.500
	Poulet blanc	1.000 à 2.500
	Poule pondeuse	500 à 1.000
	Dindon	1.500 à 3.000
Veau	Lactoreplaceurs 60 % poudre de lait	1.000 à 1.500
Lapin	Lapin en croissance	500 à 1.500
	Reproducteur	500 à 1.500
Animaux domestiques	Chiens et chats	500 à 1.000
Poisson	Truite	1.000 à 2.000

De très nombreux essais effectués sur le rat montrent que la supplémentation des céréales par la lysine conduit à des effets favorables sur la croissance et le coefficient d'efficacité protéique (Cheftel et *al.*, 1992).

Le tableau n°7, représente de façon schématique les démarches qui président aujourd'hui à l'utilisation de la lysine en alimentation animale (Letutour, 1989).

En effet, l'amélioration des processus industriels de production des acides aminés associés à la recherche des conditions optimales de nutrition azotée, accentuera sans doute, dans le future le développement de l'utilisation des acides aminés purs dans les aliments des animaux afin de répondre à deux objectifs majeurs :

- Mettre à la disposition des consommateurs à coût économique des produits camés sans cesse améliorés ;

- Valoriser au mieux les matières premières produites par l'agriculture et consommées par l'élevage (Hirasawa et *al.*, 2001 ; Dudeck, 2003 ; Kwinn, 2003).

VI.2. Utilisation médicales et industrielles

VI.2.1. Utilisations médicales

Dans le domaine médical ou en médecine, les acides aminés sont largement employés dans la transfusion. En effet, il est très difficile de préparer des transfusions pyrogènes libres à partir des hydrolysats de protéines, ce problème a été résolu par l'utilisation des L-acides aminés cristallisés (Othmer, 1984).

Actuellement, l'utilisation de L-thyptophane est essentiellement thérapeutique comme composant des solutions de transfusion, en plus de son utilisation dans la supplémentation des aliments (Nakayama, 1985).

Quelques acides aminés sont utilisés dans le domaine pharmaceutique, la phénylalanine et l'acide aspartique sont les deux constituants de l'aspartame (Chibata et *al.*, 1985 ; Torck, 1987) ; édulcorant artificiel approuvé par la FDA (Torck, 1987). L'acide glutamique est aussi un médicament, car il active les cellules nerveuses du cerveau (Delaunay et *al.*, 2001).

VI.2.2. Utilisations industrielles

Actuellement, les acides aminés sont aussi utilisés dans des domaines à caractère non biologique (Marx, 2003).

Peu d'acides aminés sont utilisés dans l'industrie chimique (Othmer, 1984). A partir du poly- γ -méthyl glutamate, on a réussi à fabriquer du tissu artificiel ainsi que du cuir synthétique qui est remarquable par sa grande perméabilité à l'humidité, sa grande résistance à la chaleur et surtout sa force (Othmer, 1984; Torck, 1987).

Des amino-acyls sont utilisés dans les détergents (Othmer, 1984; Torck, 1987) le N-lauroyl glutamate est un détergent anionique, alors que le N-lauroyl glycine est reconnu par sa grande activité contre certaine maladie virales des plantes (Delaunay et *al.*, 2001). En fin le N-acyl glutamate (dérivé de l'acide L-glutamique) est commercialement utilisable comme un détergent biodégradable avec des propriétés faibles d'irritation de la peau, il est aussi utilisé comme un additif dans le cosmétique, les savons et les shampoings (Hirose et *al.*, 1985).

- D'autres polyamino-acides sont utilisés dans la synthèse de polymères pour la production de fibres synthétiques qui sont largement recherchés (Othmer, 1984; Torck, 1987).
- Un autre dérivé de l'acide glutamique (l'acide oxopyrolydine carboxylique) est utilisé comme un facteur naturel hydratant dans le cosmétique jouant un rôle important dans la maintenance de l'eau au niveau de la peau (Delaunay et *al.*, 1985).

VII. PROCÉDES DE PRODUCTION DES ACIDES AMINES

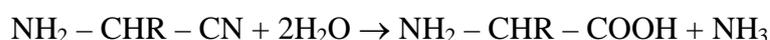
La production des acides aminés fait intervenir des techniques diverses (Delaunay et *al.*, 2001).

- La synthèse chimique (méthionine) ;
- Extraction à partir des protéines naturelles (arparagine, hydroxyprolines, des hydrolysats de protéines, cystéines) ;
- Synthèse biochimique :
 - Par bioconversion ou voie enzymatique (acide aspartique, DOPA, tryptophane) ;
 - Fermentation directe (acide glutamique, lysine).

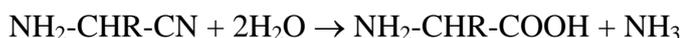
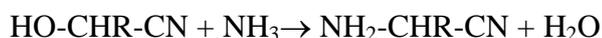
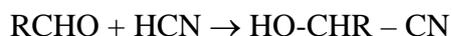
VII .1. Synthèse chimique

Certaines méthodes de synthèse des aminoacides sont empruntées aux réactions classiques de création des fonctions amines et acides, d'autres sont spécifiques tel que la synthèse des aminoacides de STRECKER (Arnaud, 1985).

La réaction de STRECKER consiste à faire réagir sur un aldéhyde ou une cétone de l'ammoniac pour former une imine. Cette imine réagit alors avec un acide cyanhydrique HCN pour former un α -aminonitrile. L'hydrolyse de nitrile conduit finalement à l'acide aminé correspond (Allinger et *al.*, 1984; Arnaud, 1985).



Dans la réaction de KILIANI, HCN réagit directement sur l'aldéhyde pour donner la cyanhydrine. L'ammoniac agit donc sur cette cyanhydrine pour former un aminonitrile. L'hydrolyse de l'aminonitrile conduit à l'acide aminé, comme ci-dessus (Brack, 1999) :



Plusieurs acides aminés sont produits par synthèse chimiques, parmi les quels on peut citer la glycine (Othmer, 1984; Plachy, 1984) qui est obtenue par amination d'un acide α -halogéné (exemple : monochloroacétique) (Arnaud, 1985), la DL-alanine et la DL-méthionine (Othmer, 1984; Plachy, 1984).

L'acide aminé synthétique le plus largement produit est la DL-méthionine (Othmer, 1984), car les deux formes (L et D) de cet acide aminé obtenues simultanément par procédé chimique sont utilisables sans problème par l'organisme (Padirac, 1985). Sa production a été de 3000.000 tonnes en 1996 (Delaunay et *al.*, 2001).

Dans la synthèse chimique, le produit est souvent dans la forme racémique (DL forme) (Delaunay et *al.*, 2001), il est donc nécessaire d'effectuer des résolutions dans le but d'obtenir des isomères optiquement actifs (Kinoshita, 1959), celles-ci sont réalisées par des méthodes difficile et coûteuses (Su et Yamada, 1960).

Cependant ce procédé est particulièrement avantageux dans le cas des acides aminés difficiles à obtenir par fermentation (Scriban, 1993).

VII.2. Extraction à partir des hydrolysats de protéines

L'hydrolyse des protéines par des acides et des bases fournit un mélange de leurs éléments constitutifs : les acides aminés. Chaque protéine fournit par hydrolyse complète une proportion caractéristique des différents acides aminés (Delaunay et *al.*, 2001).

De plus, toutes les protéines ne contiennent pas la totalité des vingt aminoacides (Lehninger, 1989).

L'obtention des acides aminés par hydrolyse des protéines se réalise par des acides forts et à chaud. En général, on utilise HCl 6 N à 120°C pendant 10 à 24 heures. C'est la méthode la plus utilisée, l'inconvénient de cette hydrolyse est que sérine et thréonine sont partiellement détruites et le tryptophane est totalement détruit.

L'hydrolyse acide du gluten a été la première source d'acide glutamique semi industriel, de même que l'hydrolyse de soja (Hirose et *al.*, 1985).

L'acide aspartique a pu être obtenu par hydrolyse de l'asparagine isolée à partir du jus de l'asparagus (Chibata, 1985).

En 1925, Schryver et Buston ont été les premiers à isoler la thréonine par hydrolyse du gluten d'avoine (Shimura, 1985).

L'hydrolyse des protéines est utilisée pour l'obtention de certains acides aminés comme la cystéine et la proline (Delaunay et *al.*, 2003).

La cystéine et la cystine sont produites par isolement à partir des hydrolysats de protéine et l'hydroxy-proline sont précipitées à partir des hydrolysats de gélatine (Othmer, 1984).

L'inconvénient de cette méthode est le coût élevé des matériaux utilisés, de plus la purification des acides aminés est très difficile vu la présence de beaucoup d'impuretés (Hirose et *al.*, 1985).

Le dosage de tryptophane nécessite une hydrolyse alcaline (NaOH 2 à 4 N, 4 à 8 heures à 100°C). Ce mode d'hydrolyse n'est pas valable pour les autres acides aminés car il y a racémisation de tous les acides aminés et la destruction de la cystéine, sérine et thréonine (Kessous, 1996).

VII.3. Synthèse biochimique

La production des acides aminés par voie biochimique est une activité économiquement importante puisqu'elle concerne un tonnage annuel d'environ 300.000 tonnes et un chiffre d'affaire minimum $2,5 \cdot 10^9$ F/an (Pons, 1979).

Sur le plan tonnage, la part la plus importante est prise par la production de glutamate de sodium et par celle de la lysine (Ivanov et *al.*, 2013).

Les procédés biochimiques sont préférables dans la plupart des cas puisqu'ils mènent directement à des formes actives d'acides aminés (forme L) donc assimilables directement par l'organisme (Kinoshita, 1959; Padirac, 1985 ; Kiss et *al.*, 1992; Udeh et *al.*, 1993). Ce qui les rend plus avantageux comparé aux processus synthétiques (Kiss et *al.*, 1992; Udeh et *al.*, 1993).

La production des acides aminés par les procédés microbiologiques a l'avantage sur les autres méthodes de conduire uniquement aux formes naturelles (Meyer et *al.*, 2000), les

microorganismes réalisent des synthèses chimiques en une seule étape, en comparaison aux nombreuses étapes successives nécessaires en chimie avec des opérations de recyclage récupération - réparation obligatoires entre chaque étape, et les coûts que cela implique.

De plus, ils peuvent réaliser des synthèses hors de portée de la chimie traditionnelle et en un temps très court (Aperit, 1986).

Parmi les procédés développés, on distingue les procédés de fermentation directe dans lesquels un microorganisme transforme par fermentation une source de carbone (sucre, hydrocarbure, méthanol ou acide acétique) en un acide aminé avec une production simultanée de biomasse et de CO₂ (Kitai, 1972) et des procédés de bioconversions au cours desquels un précurseur est transformé en acide aminé au moyen d'une enzyme produite préalablement et qui dans certains cas est insolubilisée sur un support de façon à permettre sa récupération pour réutilisation (Pons, 1979; Plachy, 1984; Scriban, 1993; Meyer et al., 2000).

VII.3.1. Production des acides aminés par conversion (Fermentation indirecte/par voie enzymatique)

Les acides aminés peuvent aussi être préparés par méthode enzymatique lorsque les enzymes microbiennes sont utilisées dans la conversion d'un substrat approprié en acides aminés (Nakayama, 1972).

L'avantage de la synthèse enzymatique par rapport à la fermentation est sa faible consommation d'eau, ce qui entraîne moins d'eau usée à traiter (Kiss et al., 1992 ; Udeh et al., 1993 ; Delaunay et al., 2003).

L'intérêt des procédés de bioconversion réside aussi, dans le fait que l'on obtient des performances élevées en productivité de concentration finale en acides aminés (exemples : 250 g/l d'acides L-aspartique).

Cependant, les opérations de purification sont simplifiées grâce à une bonne pureté des bouillons à traiter (Pons, 1979; Guiraud, 1998).

Comme elle possède de multiples avantages de fabrication, dont principalement la spécificité de la réaction, la conformité stéréochimique du produit, l'action du pH et température modérée indispensable à la fabrication de molécules biologiquement actives (Boussaboua, 2005).

Les bioconversions, appelés aussi biotransformations, sont des réactions biochimiques catalysées par des microorganismes ou par leurs enzymes et permettant la transformation d'un substrat donné en un produit spécifique (Adrian, 1995 ; Boussaboua, 2005).

Elles consistent donc en la transformation par les cellules microbiennes d'un métabolite en un composé de structure voisine (Champagnat et Adrian, 1974 ; Adrian, 1995).

Les bioconversions sont réalisées au moyen soit d'enzymes libres ou fixées. Soit de cellules entières ou fixées.

Lorsqu'on utilise le microorganisme entier, il joue le rôle d'un enzyme ou d'un complexe multienzymatique (Guiraud, 1993 ; Scriban, 1993).

Les cellules microbiennes peuvent être en croissance, au repos ou sous forme de spores, à l'état libre ou immobilisées. Les substrats transformés sont ajoutés au milieu à l'état pur ou dilués dans un solvant adéquat (Boussaboua, 2005).

Les bioconversions conduisant aux acides aminés, combinent la synthèse chimique d'un ou plusieurs précurseurs avec la transformation au moyen d'un système enzymatique microbien (Scriban, 1993 ; Delaunay et *al.*, 2001).

La production considérable par catalyse enzymatique est actuellement mise en place pour l'alanine, l'acide aspartique, la cystéine, la cystine, la méthionine, la phénylalanine, la sérine, le tryptophane et la valine (Ivanov et *al.*, 2013).

Deux types de procédés sont possibles :

→ Soit l'enzyme est préparé dans un bouillon de fermentation dans lequel on introduit, après la phase de croissance la source productrice des substrats à transformer.

→ Soit l'enzyme est préparée par fermentation, insolubilisée par entrappage ou réticulation et montée dans une colonne que l'on alimente en continu avec le substrat (Pons, 1979 ; Hirasawa et *al.*, 2001 ; Chassagnole et *al.*, 2003).

Par contre, certains procédés existent, mais ne se développent pas du fait que le coût élevé des produits de départ ne permet pas d'abaisser le prix d'acide aminé. C'est le cas de la production de L-tryptophane à partir d'indole ou d'acide antranilique qui sont beaucoup trop chers pour que le L-tryptophane puisse être fabriqué à des prix bas (Pons et *al.*, 1993).

En 1978, la société Toray-Ind, à commencer au Japon, la fabrication industrielle de L-Lysine, par ce procédé enzymatique à partir de DL α -amino- ϵ -caprolactame grâce à une α -amino- ϵ -carpolactamase (Scriban, 1993).

VII.3.2. Production des acides aminés par fermentation directe

Actuellement, les acides aminés sont produits essentiellement par fermentation directe et le nombre des acides aminés, préparés par cette voie, est en nette augmentation (Kiss et *al.*, 1992 ; Udeh et *al.*, 1993).

Cette technique s'applique principalement à la production de l'acide L-glutamique L-lysine, L-tryptophane, L-arginine, L-histidine, L-phenylalanine, L-serine, et L-valine (Oishi, 1972 ; Pons, 1979 ; Plachy, 1984 ; Furukawa et *al.*, 1988).

La majorité des procédés de ce type utilisent comme souche ce qu'on commence à appeler les bactéries productrices d'acide glutamique. En général, la plupart des souches appartiennent à la famille des corynéformes (Kinoshita, 1959, Plachy, 1984, Kinoshita, 1985), ce sont des souches de *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* (Pons, 1979; Plachy, 1984; Hodgson; 1998; Tauch et *al.*, 2002) qui sont, aujourd'hui, regroupés dans le genre *C.glutamicum* (LIEBL, 2005) et *Brevibacterium lactofermentum* (Khachatourians, 1995), qui naturellement ont la capacité de produire de l'acide glutamique dans certaines conditions de croissance bien spécifiques (Pons et *al.*, 1993 ; Khachatourians, 1995).

Ces acides aminés sont donc obtenus par fermentation au moyen de bactéries dont les systèmes de régulation ont été perturbés (Leclerc, 1977 ; Furukawa et *al.*, 1988). Ce sont des souches à partir des quelles on a eu la possibilité d'obtenir des mutants au métabolisme altéré (auxotrophie) ne produisant pas l'acide glutamique mais capable d'accumuler dans le milieu un autre acide aminé, exemple L-lysine (Pons, 1979 ; Delaunay et *al.*, 2001).

Ce sont des mutants de Corynebactéries, *Brevibacterium* ou *Arthrobacter* (Plachy, 1984 ; Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Les matières premières utilisées pour la fermentation sont assez diverses ; au Japon la matière première la plus utilisée est soit l'acide acétique, soit la mélasse de canne (Hirose et *al.*, 1985).

Par contre en Europe, la matière première la mieux adaptée est la mélasse de betterave (Pons, 1979 ; Radmacher et *al.*, 2002).

La production des acides aminés par fermentation directe se fait dans des fermenteurs de grande capacité (60 à 3000 m³) (Champagnat et Adrian, 1974 ; Flickinger et Drew, 1999). Des fermenteurs de 200.000 L sont généralement utilisés s'il est désiré d'aller vers de grands volumes (Rehm et Reed, 1993). La réaction est fortement exothermique, comme la fermentation se fait généralement entre 30 et 35°C, la réfrigération de fermenteurs peut poser quelques problèmes (Champagnat et Adrian, 1974).

Le risque de contamination des corynébactéries par les bactériophages constitue un autre problème (Pons, 1979 ; Pons et *al.*, 1993). Cela suppose que des précautions draconiennes doivent être prises à tous les niveaux pour empêcher la pénétration des bactériophages dans les fermenteurs (Pons, 1979), et cela par l'utilisation de souches non lysogènes et le maintien de conditions sanitaires satisfaisantes (Pons et *al.*, 1993).

De nombreuses études ont porté sur la protection de ces souches contre les phages au moyen d'agent chimique. Les meilleurs résultats semblent être obtenus avec des dérivés N-acylés des acides aminés, utilisés à environ 50 mg/L dans le milieu de culture. Le même résultat est obtenu après ajout d'agent chélatant qui permet de diminuer la concentration de calcium dans le milieu. En effet le calcium est indispensable au processus de l'infection phagique (Pons et *al.*, 1993).

La durée de la production industrielle des acides aminés par fermentation est en général de 25 à 40 heures (Flickinger et Drew, 1999).

Une fois la fermentation terminée, le bouillon est, soit, centrifugé pour éliminer les cellules bactérienne (Othmer, 1984 ; Plachy, 1984), soit que la séparation est faite par ultrafiltration. La purification de l'acide aminé se fait ensuite soit par précipitation au point isoélectrique, soit par fixation élution sur résine échangeuse d'ions. Dans ces deux cas, on obtient une eau mère qu'il faut traiter pour éviter toute pollution (Pons, 1979 ; Plachy, 1984).

Le tableau n°7 résume la production mondiale des principaux acides aminés ainsi que les méthodes de leur production (Scafer et *al.*, 1990 ; Pons et *al.*, 1993).

Tableau n°7: Production mondiale des principaux acides aminés et les méthodes de leur production (Scafer et *al.*, 1990 ; Pons et *al.*, 1993 ; Flickinger et Drew, 1999)

Acides aminés	Tonnage annuel	Méthode de production
Acide L-glutamique	> 800.000	Production par corynébactérie
L-lysine	330.000	Production par corynébactérie
DL-méthionine	350.000	Synthèse chimique
Acide L-aspartique	10.000	Bioconversion par <i>E.coli/Pseudomonas</i>
L-phénylalanine	5.000	Production par corynébactérie
L-thréonine	1.000	Production par corynébactérie, <i>E.coli</i> et <i>Brevibacterium</i>

VIII. PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE DES ACIDES AMINES

L'intérêt de la production des acides par voie microbienne est le caractère stéréospécifique de cette biosynthèse (Scriban, 1993).

Depuis 1955, des études quantitatives et qualitatives sur la formation des acides aminés par divers micro-organismes ont été entreprises.

Le but, de ces études est l'examen des possibilités de production des acides par fermentation (Kinoshita, 1959 ; Hirasawa et *al.*, 2001 ; Loos *etal.*, 2001 ; Kwinn, 2003).

Peu d'acides d'aminés sont accumulés en quantités significatives par des microorganismes isolés directement de la nature (Plachy, 1984 ; Khachatourians, 1995). Seul l'acide glutamique, la valine, la proline et l'acide aspartique sont produits en quantité relativement importante (Chassagnole et *al.*, 1984).

VIII.1. Microorganismes producteurs d'acides aminés

En général, les microorganismes capables d'accumuler les acides aminés sont les bactéries, les actinomycètes, les levures et les moisissures. Mais les bactéries sont de loin les producteurs les plus performants (Abe et *al.*, 1967 ; Nakayama, 1982 ; Tosaka et Takinami, 1986 ; Euverink, 2003).

Cependant Su et Yamada (1960) ont pu isoler 203 souches productrices d'acide glutamique dont 127 souches sont des bactéries, 42 sont des moisissures et enfin 34 sont des levures.

Abe et *al.*, (1967) ont examiné 212 souches productrices d'acide glutamique. Ils ont groupés ces souches en 12 types, 60 % des souches appartenant à un type possédant une uréase, réduisant le nitrate et produisant l'acide à partir du glucose. Il est remarquable que la plupart des souches représentées, employées pour la production commerciale de l'acide glutamique étaient de ce type (Hall et *al.*, 2003 ; Kwinn, 2003).

La plupart des souches utilisées dans la production d'acide aminé, par fermentation appartiennent à la famille des corynéformes (Keddie et *al.*, 1980 ; Eggeling et Sahm, 2001 ; Glanemann et *al.*, 2003) qui sont les producteurs d'acides aminés les plus performants (Kinoshita, 1959 ; Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984 ; Kinoshita, 1985 ; Shiio et *al.*, 1989) dont les genres *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* et *Microbacterium* sont les plus utilisés (Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984 ; Kinoshita, 1985 ; Shiio et *al.*, 1989 ; Flickinger et Drew, 1999).

Les corynébactéries sont largement utilisées dans le secteur industriel pour la production d'acides aminés et de nucléotides (Flickinger et Drew, 1999).

Elles sont similaires au genre *Corynebacterium glutamicum* isolé par Kinoshita en 1957 (Khachatourians, 1995), se sont des souches de :

- *Corynebacterium glutamicum*
- *Brevibacterium flavum*

Qui naturellement ont la capacité de produire de grandes quantités d'acides glutamiques (Hirasawa et *al.*, 2001 ; Kwinn, 2003).

A partir de ces souches, il a été possible d'obtenir des mutants au métabolisme altéré ne produisant plus l'acide glutamique mais capables d'accumuler dans le milieu un autre acide aminé, par exemple la lysine (Sano et Shiio, 1967 ; Rivière, 1975 ; Pons, 1979 ; Marquet et *al.*, 1986 ; Cremer et *al.*, 1990 ; Radmacher et *al.*, 2002 ; Marx et *al.*, 2003).

D'autres procédés utilisant *Escherichia coli* (notamment avec les souches génétiquement modifiées où les outils sont nettement plus performants que pour les corynébactéries) ont été mis au point pour la production de tryptophane par bioconversion (Pons et *al.*, 1993 ; Lynch, 2003).

Dans la production mondiale des acides aminés où l'acide glutamique vient en premier, en tonnage, *Corynebacterium glutamicum* produit plus de 100 g/L à partir de mélasse suivi par la L-lysine (*Achromobacter obae*, *Brevibacterium lactofermum* ou *flavum*), etc... 60 % de la production sert à la nutrition humaine, 33 % à la nutrition animale et le reste à des applications médicales ou industrielles (Meyer et *al.*, 2000).

VIII.1.1. Caractéristiques des bactéries corynéformes

Tout ce qui est Gram positif, bacillaires, plus ou moins déformé n'est pas corynébactérie. Ceci n'était pas vrai il y a quelques années car le genre *Corynebacterium* était comme d'autres genres bactériens, une fourretout regroupant des entités que l'on sentait bien différentes (Shukla et *al.*, 2003).

Biochimie et génétique aidant, la classification a pu être améliorée et des genres nouveaux ont été séparés des corynébactéries (Coyle et Lipsky, 1990 ; Flickinger et Drew, 1999). Pour le bactériologiste penché sur son microscope la séparation est loin d'être évidente « corynéforme » a encore de beaux jours devant lui (Smith et Easman, 1990).

Ce terme recouvre différentes appellations : Corynéformes, corynébactéries, *Corynebacterium* (Eberlin, 1997 ; Hall et *al.*, 2003) ; ce sont des bactéries très ubiquistes donc leur origine c'est l'environnement et le tube digestif (Rosier, 1985 ; Shukla et *al.*, 2003).

Les corynéformes sont des sphères ellipsoïdales à bâtonnets, courtes, arrondies à l'extrémité, de taille variable fréquemment en massue (Su et Yamada, 1960 ; Abe et *al.*, 1967 ; Daguet, 1972, Leclerc et *al.*, 1977 ; Nagahama et *al.*, 1977 ; Guiraud et Galzy, 1980 ; Hirose et *al.*, 1985, Kinoshita, 1985 ; Rozier et *al.*, 1985 ; Eberlin, 1997 ; Riegel, 1998 ; Hirasawa et *al.*, 2001 ; Kwinn, 2003). Ils se produisent par fusion binaire inégale et présentent des groupements ou associations très caractéristiques (Leclerc et *al.*, 1995) et leur arrangement est irrégulier, en palissade et en lettres majuscules (V, L, N) en caractères chinois et en chiffre romains (Daguet, 1972 ; Leclerc, 1995 ; Riegel, 1998 ; Kwinn, 2003).

Ils se colorent irrégulièrement et possèdent fréquemment des granulations (Daguet, 1972 ; Shukla et *al.*, 2003).

Les corynéformes sont pléomorphes, leur morphologie est en général influencée par les conditions de culture, le milieu ainsi que l'âge de la culture (Abe et *al.*, 1967 ; Guiraud et Galzy, 1980 ; Liebl, 2005). Elle est bacillaire, lorsqu'ils sontensemencés dans un milieu neuf, sphérique ou ovöide en fin de phase de croissance (Leclerc et *al.*, 1977).

Selon Abe et *al.*, (1967) ; Kinoshita, (1985), dans des milieux complexes, les cultures en phase exponentielle présentent des bâtonnets irréguliers qui changent considérablement en taille, forme et renferment des lignes droites courbées, ovales et des formes en cœur, une proportion de bâtonnets est arrangée en forme de « V » (Hall et *al.*, 2003 ; Shukla et *al.*, 2003).

Les formes en « V » sont dues au bourgeonnement des cellules ainsi qu'à leurs mouvement après division par cassure (Nakayama et *al.*, 1977 ; Kinoshita, 1985). Cette disposition reste une particularité très importante des corynéformes (Bourgeois et *al.*, 1996 ; Chassagnole et *al.*, 2003).

En phase stationnaire, les cellules sont plus courtes moins irrégulières et une proportion variable est de forme de cocci (Abe et *al.*, 1967 ; Kinoshita, 1985).

Un autre caractère des bactéries corynéformes est qu'elles ne peuvent pas former des chaînes de cellules durant la phase de croissance (Abe et *al.*, 1967 ; Kinoshita, 1985 ; Leclerc et *al.*, 1995 ; Flickinger et Drew, 1999).

Mais lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu riche, on n'observe pas ces changements morphologiques. Cependant ces changements apparaissent fréquemment chez les bactéries cultivées dans des milieux à basse concentration en biotine ou en présence d'antibiotiques (Kinoshita, 1985 ; Marx et *al.*, 2003).

Les cellules apparaissent isolées, en paires mais aussi en masses irrégulières donnant une image de massue. (Su et Yamada, 1960 ; Abe et *al.*, 1967 ; Leclerc et *al.*, 1977 ; Kinoshita, 1985 ; Shiio et Nakamori, 1989 ; Pons et *al.*, 1993 ; Flickinger et Drew, 1999).

Elles sont souvent incurvées, de taille variable, 0,3 – 0,8 micromètres sur 0,8 à 8 micromètres (Guiraud et Galzy, 1980 ; Liebl, 2003) et de 0,7 – 1,0 x 1,0 – 3,0 µm selon (Abe et *al.*, 1967).

Les bactéries corynéformes sont en général immobiles, leur coloration est de type Gram positif (Su et Yamada, 1960 ; Abe et *al.*, 1967, Nagahama et *al.*, 1977 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Kinoshita, 1985 ; Eberlin, 1997 ; Rigel, 1998 ; Usuda et *al.*, 2001, Tauch et *al.*, 2002 ; Kwinn, 2003), mais elles deviennent Gram négatif dans les vieilles cultures (Larpent, 1991), asporulées, aéroanaérobies facultatives,

Elle accumulent en aérobiose, de large quantité d'acide glutamique (Abe et *al.*, 1967 ; Nagahama et *al.*, 1977 ; Hirose et *al.*, 1985), très oxydantes c'est à dire catalase positive, elles forment des granulations métachromatiques (Leclerc et *al.*, 1995) exigent la biotine pour leur croissance (Abe et *al.*, 1967 ; Nagahama et *al.*, 1977 ; Nakayama, 1985 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Kinoshita, 1985 ; Rozier et *al.*, 1985).

Certaines espèces exigent la thiamine ou l'acide para-amino-benzoïque en plus de la biotine. Pour *Corynebacterium glutamicum*, elle n'exige que la biotine (Abe et *al.*, 1967 ; Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Hirasawa et *al.*, 2001).

En outre, elles sont mésophiles (Rozier et *al.*, 1985 ; Pons et *al.*, 1993). La température maximale de croissance est 40°C (Pons et *al.*, 1993), mais la température optimale de croissance diffère suivant ces études ; selon ABE et *al.*, (1967) elle est de 25 à 37°C, par contre selon Pons et *al.*, (1993) elle se situe vers 35°C, mais pour Kinoshita (1985) elle est située entre 28 à 30°C, alors que pour Guiraud, (1998) elle est de 30°C.

Les bactéries corynéformes sont non acido-alcool résistantes, cette particularité peut les différencier de l'espèce pathogènes *Corynebacterium diphtheriae* (Mossed et *al.*, 1995), non ramifiées et souvent arrangées de manière angulaire (Abe et *al.*, 1967 ; Guiraud et Galzy, 1980 ; Bourgeois et Larpent, 1989 ; Guiraud, 1998).

Nous insisterons sur l'importance des lipides dans la paroi des corynébactéries, ce qui les individualise des autres Eubactéries. On compte en effet 30 % de lipides dans la paroi des corynébactéries, au lieu de 1 % dans la paroi des bactéries Gram négatif (Daguet, 1972).

Les bactéries productrices d'acide glutamique appartiennent au genre chimio-organohétérotrophes (Singleton, 1999). Ils ont la particularité de produire plus de 30 grammes/litre d'acide glutamique sous des conditions d'aérobiose à partir d'un milieu contenant du glucose et de l'urée ou bien des sels ammoniacaux qui sont considérés comme les principaux ingrédients (Kinoshita, 1959 ; Abe et *al.*, 1972). En effet, l'acide glutamique a une fonction importante dans le métabolisme azoté de ces cellules ; il sert d'une part à la fabrication d'autres acides aminés et d'autre part à la construction du bloc protéique ainsi que d'autres tissus cellulaires (Marx et *al.*, 2003).

En fin, les colonies de ces bactéries se présentent sous forme d'une tache de bougie avec une pigmentation en général jaune pâle à jaune orangé de type caroténoïdique aromatique, de taille variable (Leveau et Bouix, 1993).

Ces colonies jaunâtres, apparaissent après 48 heures d'incubation (Su et Yamada, 1960, Nagahama et *al.*, 1977) et sont très variables de souche en souche, surtout après modification par mutation- sélection (Nakayama, 1985).

Leur ADN contient des proportions de guanine plus cytosine (coefficient de CHARGAFF) compris entre 55,5 % et 57,7 % mais quelques souches ont des valeurs qui se situent entre 53 % et 65 % (Abe et *al.*, 1967 ; Flickinger et Drew, 1999).

Selon Leclerc et *al.*, (1995), le coefficient de CHARGAFF est compris entre 51-63%, et selon Singleton (1999) le pourcentage de G+C est de 51-59%.

Les caractéristiques communes et variables des corynébactéries productrices d'acides aminés sont données respectivement dans les tableaux n°8 et 9.

Tableau n°8: Caractéristiques communes aux corynébactéries productrices d'acides Aminés
(Abe et *al.*, 1967)

Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sphère ellipsoïdale à bâtonnets courts, souvent incurvés, 0,7-1,0-3,0μ. ▪ Apparaissent par paires, en cellules isolées ou en masse irrégulières. ▪ Gram positif ▪ Immobiles ▪ Asporulées
Caractères cultureux	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sur gélose nutritive : croissance modérée, colonies circulaires, entières légèrement brillantes. ▪ Sur bouillon nutritif trouble léger a modéré, culot floculant. ▪ Sur milieu au tellurate : Colonie grises à noires.
Physiologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Température : optimum de 25 à 30° - 37°C, faible croissance à 42°C. ▪ pH optimum de 7 à 8, croissance entre 6 et 9. ▪ Pas de production d'indole. ▪ Amidon non hydrolysé ▪ Respiration : aéroanaérobie facultatif. ▪ Catalase positif. ▪ Production d'H₂S : faiblement positive en général mais fortement positive occasionnellement. ▪ Pas de production de gaz à partir des hydrates de carbone. ▪ Phosphatase : négative ou très faible. ▪ Caséine non hydrolysé. ▪ Bleu de méthylène réduit. ▪ Présence d'acide méso-diaminopimélique dans la paroi cellulaire. ▪ Biotine nécessaire à la croissance. ▪ Accumulation de larges quantités d'acide glutamique sous des conditions aérobiques.

Tableau n°9 : Caractéristiques variables chez les corynébactéries productrices d'acides Aminés (Abe et *al.*, 1967)

<p>Production de pigments</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches sont jaunes pâles à jaunes ▪ Elles sont quelquefois d'un blanc crémeux ou rose. ▪ Des mutants blancs, jaunes profond ou roses sont facilement obtenus.
<p>Réduction des nitrates</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches réduisent les nitrates en nitrites, mais certaines ne le font pas.
<p>Production d'acide à partir des hydrates de carbone</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Habituellement production de l'acide à partir de glucose, fructose, mannose, maltose, saccharose et tréhalose. ▪ Quelquefois, production d'acide à partir de mannitol, arabinose, salicine et esculine.
<p>Test rouge de méthyle</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Souvent faiblement positif mais quelque souches sont négatifs.
<p>Besoins en vitamines</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Besoin général en biotine, mais certaines souches ont également besoins de thiamine ou d'acide para-amino-benzoïque.
<p>Guanine + cytosine % de l'ADN</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La majorité des souches ont un G + C % compris entre 55,5 et 57,7 mais quelques souches ont des valeurs au tour de 65 ou de 53.

VIII.1.2. Taxonomie et écologie des corynébactéries d'intérêt industriel

Les bactéries corynéformes posent encore actuellement de nombreux problèmes de classifications et de taxonomie et il ne paraît plus possible aujourd'hui de définir valablement une famille de Corynébacteriaceae (Bebear, 1989).

La diversité des bactéries appartenant ou proches du genre *Corynebacterium*, sur la base des seuls critères morphologiques, est si grande que l'on a souvent regroupé sous le nom de corynéformes des espèces très éloignées les unes des autres (Leclerc et *al.*, 1995).

Les premières souches productrices d'acides aminés ont été nommées *Micrococcus glutamicus* (Kinoshita et Nakayama, 1985 ; Hall et *al.*, 2003), mais il a été par la suite proposé de classer ces souches parmi les corynébactéries (Pons et *al.*, 1993 ; Moritz et *al.*, 2000).

VIII.1.2.1. Taxonomie générale des corynébactéries

Selon Holt et *al.*, (1994) dans le Bergey's manuel of déterminative bacteriology (9^{ème} édition), les corynébactéries appartiennent à l'ordre des actinomycétales (Pons et *al.*, 1993, Leclerc et *al.*, 1995 ; Lessard et Sinsky, 2003).

Les actinomycétales sont de types Gram positif, la plus part des genres sont aérobies, coques, bâtonnet, mycélium (selon le genre), habituellement non mobile, sporulant pour beaucoup de genres, se trouvent dans le sol, dans les composts, dans les eaux etc ..., certaines espèces sont symbiotes de plantes, certaines pathogènes chez l'homme, chez d'autres animaux ou chez des plantes (Singleton, 1999 ; Euverink, 2003).

L'ordre des actinomycétales comprend sept groupes supragénériques comme il est montré dans le tableau n°10.

Tableau n°10 : Actinomycètes groupe supra génériques et principaux genres (Leclerc et *al.*, 1995)

Groupe supra générique	Genre
Actinobacteria	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Agromyces</i> ▪ <i>Arthrobacter</i> ▪ <i>Micrococcus</i> ▪ <i>Cellulomonas</i> ▪ <i>Actinomyces</i> ▪ <i>Arachnia</i> ▪ <i>Brevibacterium</i>
Actinoplanètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinoplanes</i> ▪ <i>Micromonospora</i>
Moduromycètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinonadura</i> ▪ <i>Streptosporangium</i>
Micropolyspora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinopolyspora</i> ▪ <i>Pseudonocardia</i>
Sporangemultilobé	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Frankia</i>
Nocardioformes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Corynebacterium</i> ▪ <i>Mycobacterium</i> ▪ <i>Nocardia</i> ▪ <i>Phodfococcus</i>
Nocardioides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Nocardioides</i>
Streptomycètes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Intrasporangium</i> ▪ <i>Streptomycètes</i>
Thermonomonospora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Actinomaduramaduræ</i> ▪ <i>Thermomonospora</i>

La condition strictement nécessaire pour qu'un organisme soit classé parmi les corynébactéries est la présence d'arabinogalactane et de mésodiaminopimélate (DAP) dans la paroi qui est un caractère taxonomique important (Pons et *al.*, 1993 ; Leclerc et *al.*, 1995).

Les principaux sucres sont l'arabinose et le galactose. Des acides mycoliques en chaînes courtes sont aussi présents (Leclerc et *al.*, 1995).

Ces bactéries sont regroupées dans le groupe des bâtonnets à Gram positif non sporulant de forme irrégulière (Holt et *al.*, 1994), ce groupe est ainsi constitué de 22 genres (Pons et *al.*, 1993).

En général, les bactéries productrices d'acides glutamiques sont classées dans des genres différentes comme *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* et *Arthrobacter* (Demain et Birnbaum, 1968 ; Guiraud et Galzy, 1980 ; Plachy, 1984).

VIII.1.2.2. Taxonomie d'après les caractéristiques morphologiques et Culturelles

Le genre *Corynebacterium* a été établi par LEHMAN et NEUMANN, en 1896 pour classer le bacille de la diphtérie et quelques espèces parasites étroitement apparentés (Keddie et Bousfield, 1980 ; Bebear, 1989). Ce genre a été défini, en se basant sur certains caractères morphologiques, ainsi que des réactions de colorations. Cependant, dans les années suivantes, il a été montré que des organismes de morphologie similaire, se rencontrent dans un très grand nombre d'habitats, autre que le corps animal et à cause de cette similarité morphologique, ces organismes sont encore classés dans le genre *Corynebacterium* par plusieurs chercheurs.

Ensuite, le nom de *Corynebacterium* a été appliqué non seulement pour *Corynebacterium diptheriae* et d'autres espèces parasites apparentées, mais aussi pour une collection hétérogène de morphologie similaire des espèces phytopathogènes et saprophytes provenant de plusieurs habitats (Keddie et Bousfield, 1980 ; Hirasawa et *al.*, 2001).

Kinoshita et *al.*, (1960) avaient étudié les caractéristiques taxonomiques d'environ 20 souches de bactéries corynéformes productrices d'acide glutamique et ils avaient montré l'existence de six caractères communs de base qui sont :

Gram positifs de forme sphérique ellipsoïdale jusqu'à la forme de petits bâtonnets arrondis à l'extrémité (forme de massue) et plus particulièrement ayant la disposition en « V », asporulées, immobiles, produisant l'acide L-glutamique dans des conditions aérobiques et enfin exigeants la biotine pour leur croissance. Les microorganismes ayant ces six

caractéristiques de base peuvent avoir un nom commun et classer dans le groupe de bactéries corynéformes productrices d'acide glutamique (Abe et *al.*, 1967).

En outre, ces souches sont capables d'utiliser différents hydrates de carbone. Certaines sont capables de métaboliser les hydrocarbures comme *Corynebacterium hydrocarbolastus*.

VIII.1.2.3. Taxonomie d'après les caractères structuraux

Des méthodes chimiotaxonomiques sont largement utilisées, actuellement, pour l'identification et la classification de groupe corynéforme ; comme par exemple l'analyse de leur paroi cellulaire qui permet de déterminer des composants utiles dans les différenciations (Keddie et Bousfield, 1980).

L'application répandue des méthodes chimiotaxonomiques a fourni une nouvelle voie pour définir largement le genre *Corynebacterium* en termes chimiques (Kinoshita, 1985).

Une étude des caractéristiques structurales des bactéries corynéformes en général et leur taxonomie ont été publiées par Bousfield et Galley (1978) et Takeuchi et *al.*, (1989). L'étude comparative des polysaccharides de paroi des bactéries corynéformes, confirment la présence des méso-diaminopiméliques et des arabinogalactanes qui sont spécifiques du genre *Corynebacterium* (More, 1993).

Les bactéries corynéformes et les mycobactéries sont les seuls organismes à posséder au niveau de leur parois des acides mycoliques, composés de haut poids moléculaires, d'acide gras à longue chaîne C₂₂-C₈₂ (Daguet, 1972 ; Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Chez les corynébactéries, les acides nommés corynomycoliques, ont généralement 22 à 36 atomes de carbone (Keddie et Bousfield, 1980 ; Pons et *al.*, 1993). Par contre chez les mycobactéries, ces acides mycoliques ont un nombre d'atome de carbone supérieur à 36, pouvant atteindre plus de 80 (Daguet, 1972 ; Keddie et Bousfield, 1980 ; Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990 ; Pons et *al.*, 1993). Ces acides gras sont ramifiés (Pons et *al.*, 1993) et possède des cycles propanes internes et ils sont responsables des caractères de coloration de type acido-alcoolrésistance (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Huchenq et *al.* (1984) ont montré la présence de ces acides gras dans une souche industrielle de *Corynebacterium glutamicum* et ont étudié le rôle de ces molécules dans le processus de fermentation.

VIII.2. Facteurs influençant la croissance et la viabilité des corynéformes

La croissance ou le développement des bactéries est tributaire d'une part du milieu et des éléments physiques de ce dernier, d'autre part des besoins nutritifs spécifiques (Leclerc et *al.*, 1995).

VIII.2.1. La biotine

Les bactéries corynéformes productrices d'acides glutamiques, exigent pour leur développement la présence de substances organiques qu'elles soient incapables de synthétiser et qu'on appelle facteur de croissance (Meyer et *al.*, 2000). La notion de facteur de croissance est à rapprocher de celle de métabolite essentiel (Leclerc et *al.*, 1995 ; Flickinger et Drew, 1999).

Le plus important facteur entrant dans la composition du milieu de fermentation pour la production d'acide glutamique est la biotine, qui est essentielle pour la croissance des bactéries productrices de cet acide aminé (Kinoshita, 1985), mais quelques souches exigent aussi la thiamine ou l'acide para-amino-benzoïque ou la cystéine (Abe et *al.*, 1967 ; Kinoshita, 1985 ; Nakayama, 1982, Flickinger et Drew, 1999).

La biotine (Vitamine B₈) est une molécule très stable, cependant elle est très peu sensible à la chaleur (Adrian et *al.*, 1995), elle est peu soluble dans l'eau (Jbernier et *al.*, 1988). Cependant, seule la D-biotine est biologiquement active et présente dans la nature (Biesalski et Grimm, 2001).

La limitation en biotine n'affecte pas seulement la morphologie mais aussi la perméabilité (Nakayama, 1982 ; Shiio et Nakamori, 1989). Donc la capacité d'excréter l'acide glutamique est liée au besoin des souches en biotine, à la concentration en biotine des milieux de culture et à la composition de la membrane bactérienne (Duperray, 1993 ; Eggeling et Sahm, 2001).

En effet, la biotine participe, notamment à la synthèse des acides aminés ainsi que des acides gras et indirectement à la synthèse de certaines protéines et des bases purines (Adrian et *al.*, 1995).

De plus, la biotine est un facteur majeure impliquée pour contrôler la fermentation, s'il l'on ajoute un excès de biotine pour avoir une croissance optimale, l'organisme va produire de

l'acide lactique, par contre sous des conditions de croissances sub-optimales, c'est l'acide glutamique qui va être excréter (Demain et Birnbaum, 1968 ; Eggeling et Sahm, 2001).

La concentration optimale de biotine pour la production d'acide glutamique par fermentation diffère d'une souche à l'autre et de la source de carbone (Kinoshita et Tanaka, 1972 ; Rivière, 1975 ; Pons et *al.*, 1993).

Un excès de biotine favorise l'accumulation de l'alanine, l'acide aspartique et l'acide succinique, elle peut être remplacée par l'acide aspartique ou l'acide oléique (Hirasawa et *al.*, 2001).

VIII.2.2. Sources d'azote

Pour synthétiser leurs protéines, qui représentent environ 50 % de leur poids sec, les microorganismes ont besoins d'azote (Rehm et Reed, 1993 ; Meyer et *al.*, 2000).

L'azote constitue environ 15 % du poids sec des cellules (Senez, 1968) et il est assimilé par tous les microorganismes sous forme d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux (Senez, 1968 ; Rivière, 1975 ; Scriban, 1993).

En outre, la source d'azote organique qui peut être utilisée dans l'industrie comprend la peptone, tryptone, l'hydrolysate de caséine, l'extrait de viande ainsi que l'extrait de levure (Plachy, 1984 ; Joffin et Joffin, 1999).

VIII.2.3. Sources de carbone

La croissance des corynébactéries dépend d'un apport de composés carbonés. Ils peuvent en employer une grande variété de sucres, des acides gras, des alcools et diverses autres substances organiques (Singleton, 1999 ; Kiefer et *al.*, 2002). Le glucose et le saccharose, sont largement utilisés dans la production industrielle des acides aminés par fermentation (Akashi et *al.*, 1979 ; Joffin et Joffin, 1999).

A l'échelle industrielle la source de saccharose est la mélasse de betterave, alors que celle du glucose et du fructose est la mélasse de canne (Flickinger et Drew, 1999).

L'acide acétique est aussi suggéré comme étant une très bonne source de carbone surtout pour son prix de revient relativement bas.

Les substrats suivants sont également utilisés comme sources de carbone par *Corynebacterium glutamicum* (Hirose et *al.*, 1985 ; Joffin et Joffin, 1999) : Fructose, maltose, ribose, xylose, mélasse, éthanol, méthanol, acide salicylique acide benzoïque.

VIII.2.4. Les sels minéraux

D'une manière générale, les besoins des corynéformes en sels minéraux sont satisfaits par l'addition au milieu de culture de K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , PO_4^{--} et SO_4^{--} , en quantités de l'ordre de mg/litre (Delaunay *et al.*, 2001). Le phosphate de magnésium apporte à la fois les ions Mg^{++} et PO_4^- (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Certains éléments jouent sans aucun doute un rôle dans l'équilibre physicochimique de la cellule, ce sont notamment le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore (Leclerc *et al.*, 1995). Les principaux oligo-éléments nécessaires à la croissance sont le fer, le cuivre, le manganèse et le zinc (Cejka, 1981).

Le cuivre et le manganèse jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques (Meyer *et al.*, 2000).

VIII.2.5. Les antibiotiques

Les corynéformes productrices de glutamate sont sensibles à différents genres d'antibiotiques. Par exemple, la pénicilline a pour effet d'altérer les caractéristiques de perméabilité cellulaire (Kikuchi et Nakao, 1986), d'empêcher l'accumulation intracellulaire de glutamate ce qui lève la rétro-inhibition qui règle le pool intracellulaire de cet acide aminé et de ce fait, de grandes quantités sont accumulées dans le milieu (Radmacher *et al.*, 2002 ; Glanemann *et al.*, 2003).

Lors de l'utilisation d'un excès en biotine pour la production de l'acide glutamique, il est nécessaire d'ajouter, avant la phase logarithmique de croissance de la souche, de la pénicilline ou des acides gras saturés qui permettent l'excrétion de l'acide glutamique (Clément *et al.*, 1984 ; Plachy, 1984 ; Shio et Nakamori, 1989 ; Hisarawa *et al.*, 2001).

VIII.2.6. Effets des conditions de culture

Un certain nombre de facteurs interviennent au cours de la croissance, ils peuvent l'empêcher, l'inhiber, ou la favoriser (Leclerc *et al.*, 1995).

Le taux de croissance des bactéries est une donnée théorique difficile à connaître car elle correspond à des conditions idéales dont on n'est jamais sûr qu'elles soient atteintes (Guiraud, 2003). Le taux réel ainsi que la production de métabolites dépendent de :

VIII.2.6.1. Action du pH

En ce qui concerne les bactéries corynéformes, la plupart tolèrent des variations de pH comprises entre 6 et 8 (Abe *et al.*, 1967) et doivent cette propriété du fait que leur membrane cytoplasmique est peu perméable aux H⁺, OH⁻ et aux molécules minérales ou organiques fortement ionisées. Les molécules faiblement acides ou alcalines qui à l'état ionisé sont arrêtées par la barrière de perméabilité (Senez, 1968 ; Guiraud, 2003), peuvent par contre pénétrer librement dans le cytoplasme lorsque le pH du milieu est situé en dehors de leur zone d'ionisation.

C'est ainsi que NH₃ et l'acide acétique à pH respectivement alcalin ou acide pénètrent dans la cellule et peuvent dans ces conditions exercer une action toxique à l'égard de nombreuses bactéries (Guiraud, 2003).

Le pH optimum pour la croissance de bactéries productrices d'acide glutamique est au voisinage de la neutralité ou très légèrement alcalin (Abe *et al.*, 1967 ; Kinoshita, 1972 ; Kinoshita et Tanaka, 1972).

Dans un milieu contenant du glucose, le réajustement du pH est nécessaire tout au long de la fermentation car le milieu tend à devenir acide, cela est dû à la formation de l'acide glutamique et d'autres acides organiques (Kinoshita, 1972).

VIII.2.6.2. Action de la température

Richter *et al.* (1985) ont étudié la composition des acides gras des fractions entières des lipides et phospholipides de *Corynebacterium glutamicum*, il est bien sur que le changement de la température de croissances ou la limitation de l'oxygène peut causer des altérations significatives dans la composition des lipides cellulaires.

La température influence profondément la multiplication aussi bien que le métabolisme (action sur la vitesse des réactions chimiques et biochimiques) (Meyer *et al.*, 2000). La température optimale de croissance des corynéformes est comprise entre 30 et 35°C.

A une température supérieure à 37°C, il y formation d'acide lactique à cause de la diminution de dissolution de l'oxygène (Kinoshita, 1972 ; Kikuchi et Nakao, 1986), ainsi qu'un stress thermique et une dénaturation des constituants cellulaires (Guiraud, 2003).

Le froid ralentit et bloque le métabolisme microbien sans habituellement tuer la cellule, et intervient aussi sur les transferts physiques (Meyer *et al.*, 2000).

VIII.2.6.3. Action de l'oxygène

La biosynthèse des acides aminés par fermentation est un processus aérobique, (Hirose *et al.*, 1985 ; Chassagnole *et al.*, 2003).

Donc l'évaluation de la quantité d'oxygène transférée durant la fermentation est indispensable pour d'une part optimiser cette opération et d'autre part, avoir des productions à grande échelle (Akashi *et al.*, 1979 ; Plachy, 1984).

L'apport en oxygène dans les cultures de microorganismes, peut affecter le pool intracellulaire des acides aminés, le métabolisme des acides gras ainsi que celui des phospholipides (Hanel *et al.*, 1981 ; Flickinger et Drew, 1999).

Le niveau de la production des acides aminés est en relation avec les quantités d'oxygène injectées (Akashi *et al.*, 1979) qui diffèrent dans leurs valeurs en oxygène dissout et le degré d'inhibition ou de stimulation de la production des acides aminés par l'oxygène (Plachy, 1984).

La production du glutamate est fortement inhibée par des apports en oxygène insuffisants et sous ces conditions, la production du glutamate est faible et d'importantes quantités d'acide lactique et succinique s'accumulent, tandis que l'excès d'oxygène augmente la quantité d'acide α -cétoglutarique (Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984 ; Kikuchi et Nakao, 1986).

Par contre avec la lysine, l'inhibition, due au manque d'oxygène est faiblement prononcée (Plachy, 1984).

En outre, durant la production de L-lysine par *Corynebacterium glutamicum* 9366, la limitation d'oxygène a pour effet de tripler le pool intracellulaire de la lysine alors que son excrétion dans le milieu diminue.

Au même moment, les phospholipides des cellules augmentent d'une façon remarquable pendant que la proportion de l'acide oléique dans les acides gras des phospholipides diminue.

Donc, la diminution de l'apport en oxygène fourni cause, d'une part une altération dans la structure de la membrane cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* 9366, d'autre part une diminution du flux de L-lysine (Hanel *et al.*, 1981).

VIII.2.6.4. Action de la pression osmotique

Lorsque le milieu de culture contient une faible concentration en ions ou autre solutés, il est dit «hypotonique » ; la concentration plus élevée en solutés dans le cytoplasme des microorganismes qui vivent dans ce milieu entraîne un mouvement d'eau à travers la membrane, ce qui crée une pression vers l'intérieur des cellules et tend à les faire gonfler.

Dans un tel milieu, la pression osmotique représente une menace sérieuse pour l'intégrité des cellules microbiennes, qui pourraient éclater (lyse cellulaire). Chez tous les microorganismes, une paroi cellulaire contenant des polymères tels que le peptidoglycane, chez les bactéries et la chitine, chez les levures et les moisissures donne une rigidité aux cellules et leur confère ainsi une protection contre la lyse osmotique. Par contre, si les cellules sont placées dans un milieu hypertonique, fortement concentré en ions ou autres solutés, la pression osmotique s'inverse et l'eau contenue dans les cellules traverse la membrane plasmique pour se retrouver dans le milieu. Cette perte d'eau entraîne la diminution du volume cellulaire, ce qui perturbe l'activité enzymatique et ralentit le métabolisme au point d'inhiber complètement la croissance si le milieu est très hypertonique (Charbonneau *et al.*, 2007)

La pression osmotique est un facteur inhérent à la fermentation glutamique car l'accumulation de glutamate et des ions ammoniums utilisés pour contrôler le pH dans le milieu de fermentation contribue à l'augmentation de la pression osmotique. Chez *C. glutamicum*, l'étude de la réponse à une augmentation de l'osmolarité, pour différentes conditions de croissance, a montré la mise en action de différents mécanismes. On observe une diminution du volume cellulaire, l'accumulation intracellulaire d'ions (transitoire) et l'accumulation par biosynthèse d'acides aminés (proline, glutamate, glutamine) et de tréhalose (Lambert *et al.*, 1995).

Parallèlement, l'augmentation de l'osmolarité induit une diminution du taux de croissance et du rendement en biomasse qui traduit une redistribution du flux carboné vers les mécanismes de réponse au stress osmotique (Guillouet et Engasser, 1996).

De plus, *C. glutamicum* peut en réponse à une augmentation de l'osmolarité, accumuler des métabolites osmoprotecteurs extracellulaires comme la glycine-bétaine

(osmoprotecteur le plus efficace), l'ectoïne et la proline (Farwick et *al.*, 1995). Quatre transporteurs assurant le transport de ces molécules ont été mis en évidence chez *C. glutamicum*. Ces mécanismes de réponse sont communs à de très nombreuses bactéries (Imhoff, 1986 ; Wood, 1999).

L'augmentation de la pression osmotique peut jouer sur différents points clefs du métabolisme comme l'entrée du glucose par le système PTS (système de la phosphotransférase de sucre), le système de sortie du glutamate et la respiration. Il a été montré chez *E. coli* et *Clostridium pasteurianum* qu'une augmentation de la pression osmotique inhibant le transport du glucose via le système PTS et ce même en présence de bétaïne pour *E. coli* (Roth et *al.*, 1985. Walter et *al.*, 1987 ; Hossin et *al.*, 1991).

Lambert et *al.* (1995) ont montré lors de l'étude de l'excrétion du glutamate par ajout d'anesthésique qu'une augmentation de la pression osmotique inhibait la sortie du glutamate.

Cette inhibition est levée par l'addition de la glycine bétaïne.

Enfin, Meury(1994) a décrit chez *E. coli* une inhibition transitoire de 75% de la respiration après un choc osmotique (Gourdon., 1999).

VIII.3. Voies de biosynthèse des acides aminés

Les voies de biosynthèse qui conduisent aux 20 acides aminés sont non seulement nombreuses mais également complexes (Lehninger, 1989).

façon générale, les voies métaboliques connues chez les corynébactéries industrielles n'ont pas de spécificité par rapport à celle connues chez d'autres microorganismes tels que *Escherichia coli*, par contre les enzymes participant à ces voies métaboliques n'ont généralement pas les mêmes caractéristiques, ni les mêmes régulations (Pons et *al.*, 1993).

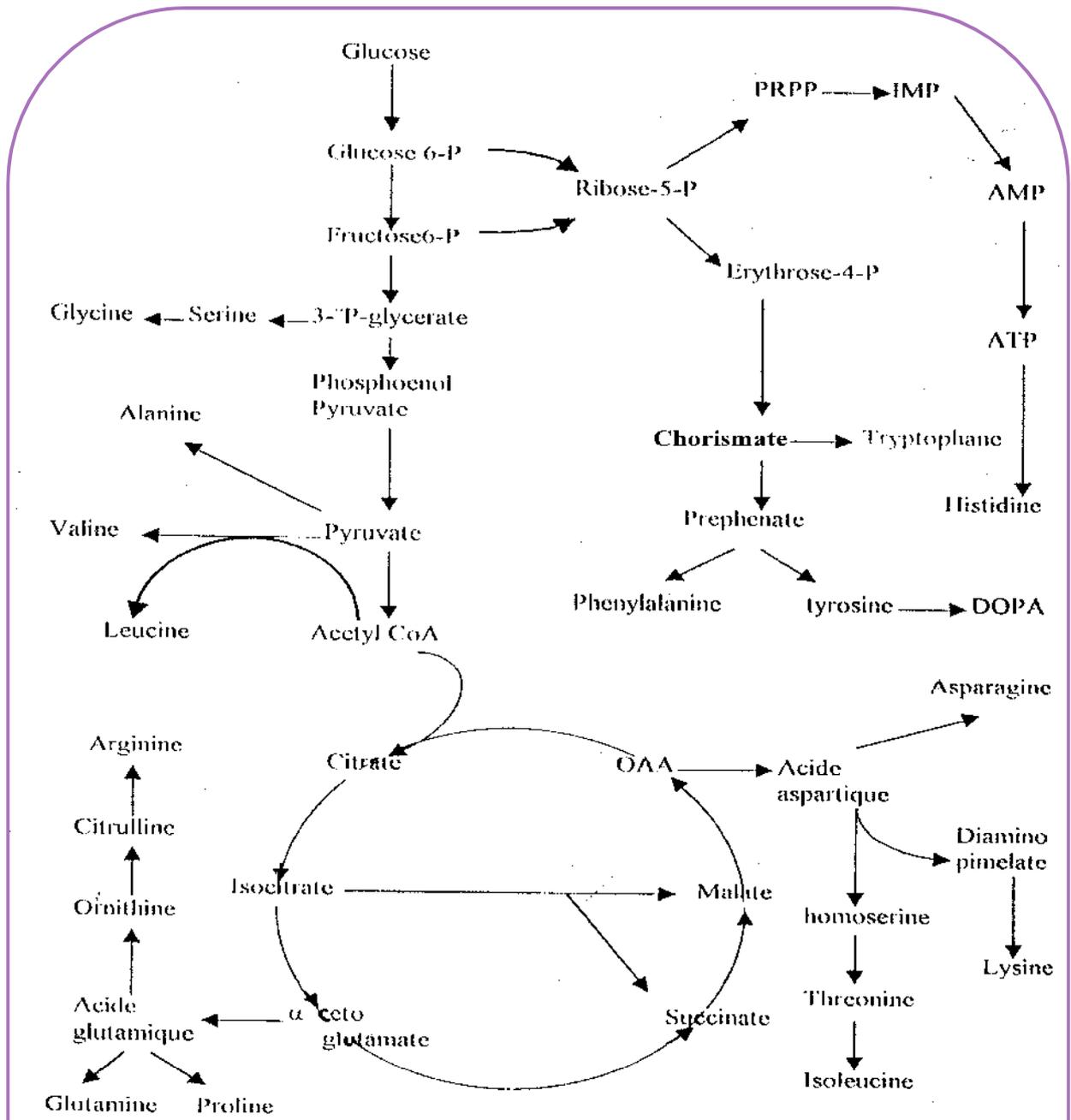


Figure n° 2 : Biosynthèse des différentes familles d'acides aminés (Othmer, 1984)

VIII .3.1. Famille du glutamate

La famille du glutamate comprend le glutamate et d'autres acides aminés dont les chaînes carbonées dérivent de l'acide glutamique (Demain et Birnbaum, 1968).

A partir du glutamate s'ouvrent les voies de synthèse de la glutamine, de l'ornithine et de l'arginine ainsi que celle de la proline (Demain et Birnbaum, 1968).

La principale voie métabolique de biosynthèse de l'acide glutamique à partir de glucose chez les corynébactéries est donnée par la figure n° 3.

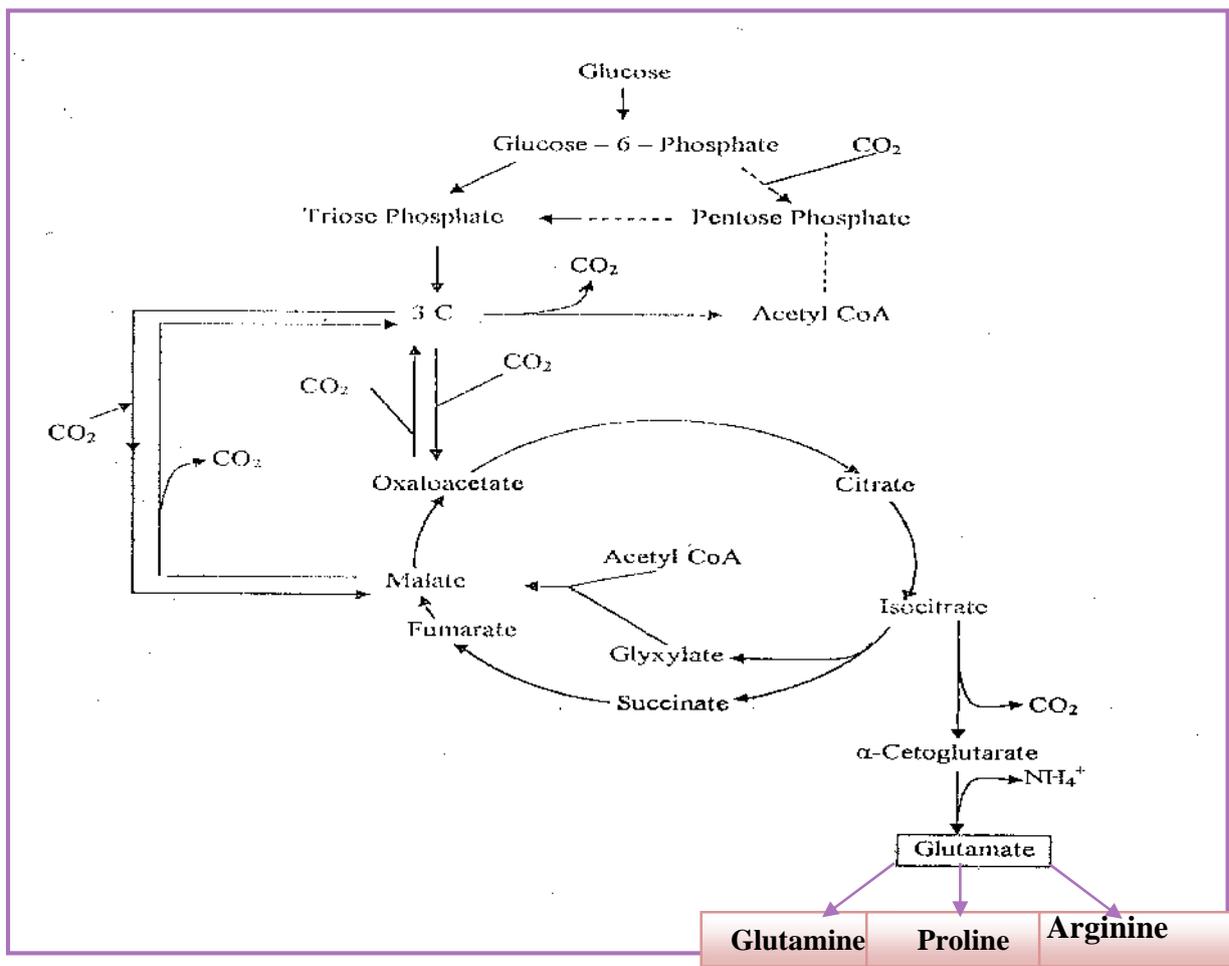


Figure n°3 : Voies métaboliques de la biosynthèse de l'acide glutamique à partir du glucose (Demain et Birnbaum, 1968)

VIII.3.2. La famille du pyruvate

La famille du pyruvate comprend trois acides aminés qui dérivent du pyruvate : alanine, valine et leucine (Sing et Shaner, 1995).

La lysine est considéré comme membre de la famille de l'aspartate, la moitié de ses carbones dérivent du pyruvate (Kinoshita, 1985 ; Glanemann *et al.*, 2003).

Ci-dessous le schéma de biosynthèse de la famille du pyruvate (Nakayama, 1982).

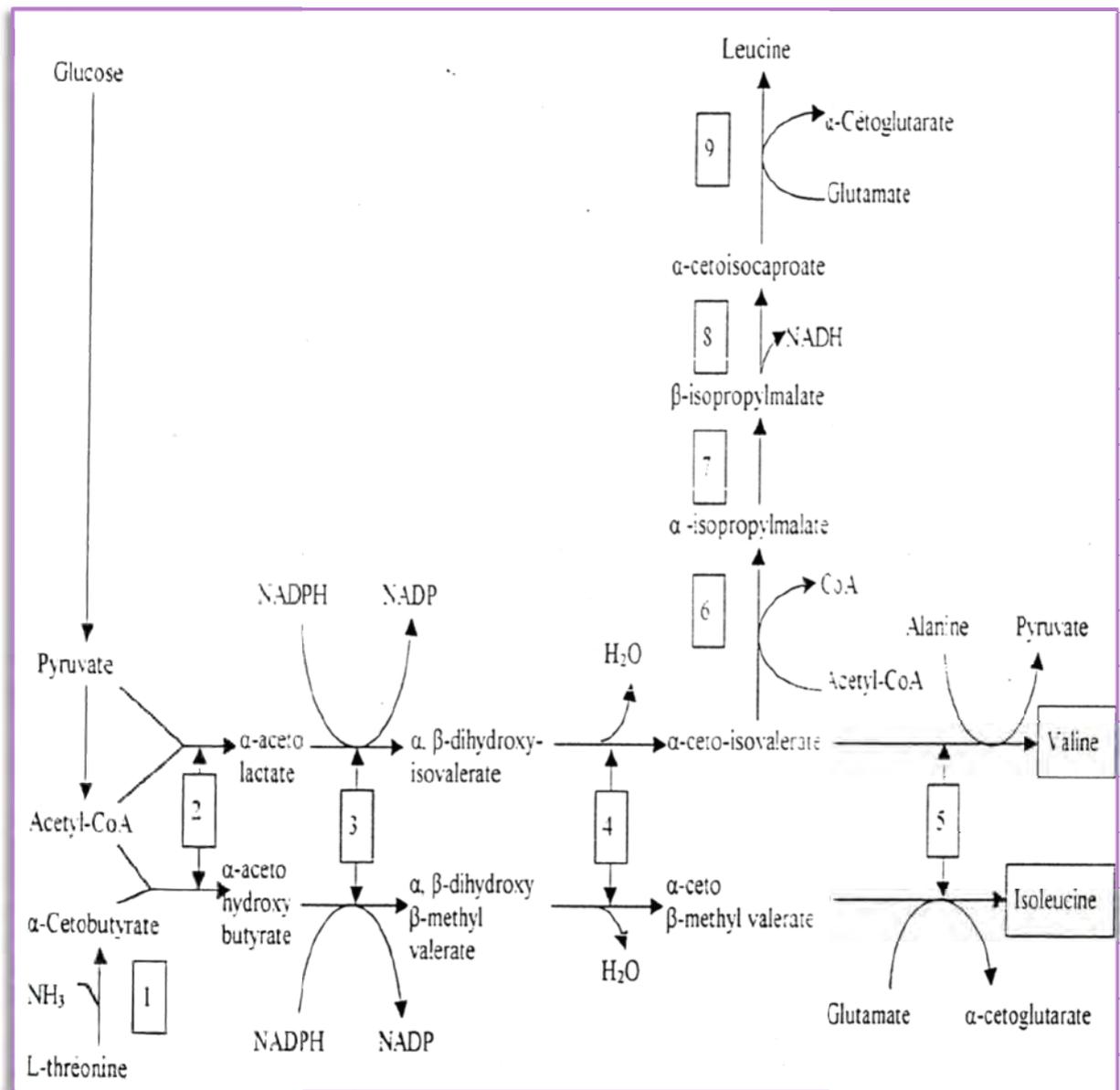


Figure n° 4 : Biosynthèse de la leucine, valine et isoleucine (Nakayama, 1982)

VIII.3.3. Famille de l'aspartate

La famille de l'aspartate comprend essentiellement la lysine, l'aspartate, l'asparagine, méthionine, thréonine et l'isoleucine (Demain et Birnbaum, 1968; Shaver *et al.*, 1996).

Ainsi, les bactéries, les actinomycètes, quelques phycomycètes, les algues bleues, les protozoaires et les plantes supérieures synthétisent la lysine à partir de l'acide diaminopimélique (DAP) qui est produit à partir de l'aspartate, tandis que la synthèse de la lysine chez les levures, les champignons et les algues vertes, débute avec l'acide α -amino-adipique qui est formé à partir de α -cétoglutarate (Plachy, 1984 ; Tosaka et Takinami, 1986 ; Kwinn, 2003).

Concernant la production de la lysine par fermentation, la biosynthèse de lysine par la voie du diaminopimélate par les bactéries est plus importante (Kinoshita, 1978; Plachy, 1984 ; Tosaka et Takinami, 1986 ; Hirasawa *et al.*, 2001).

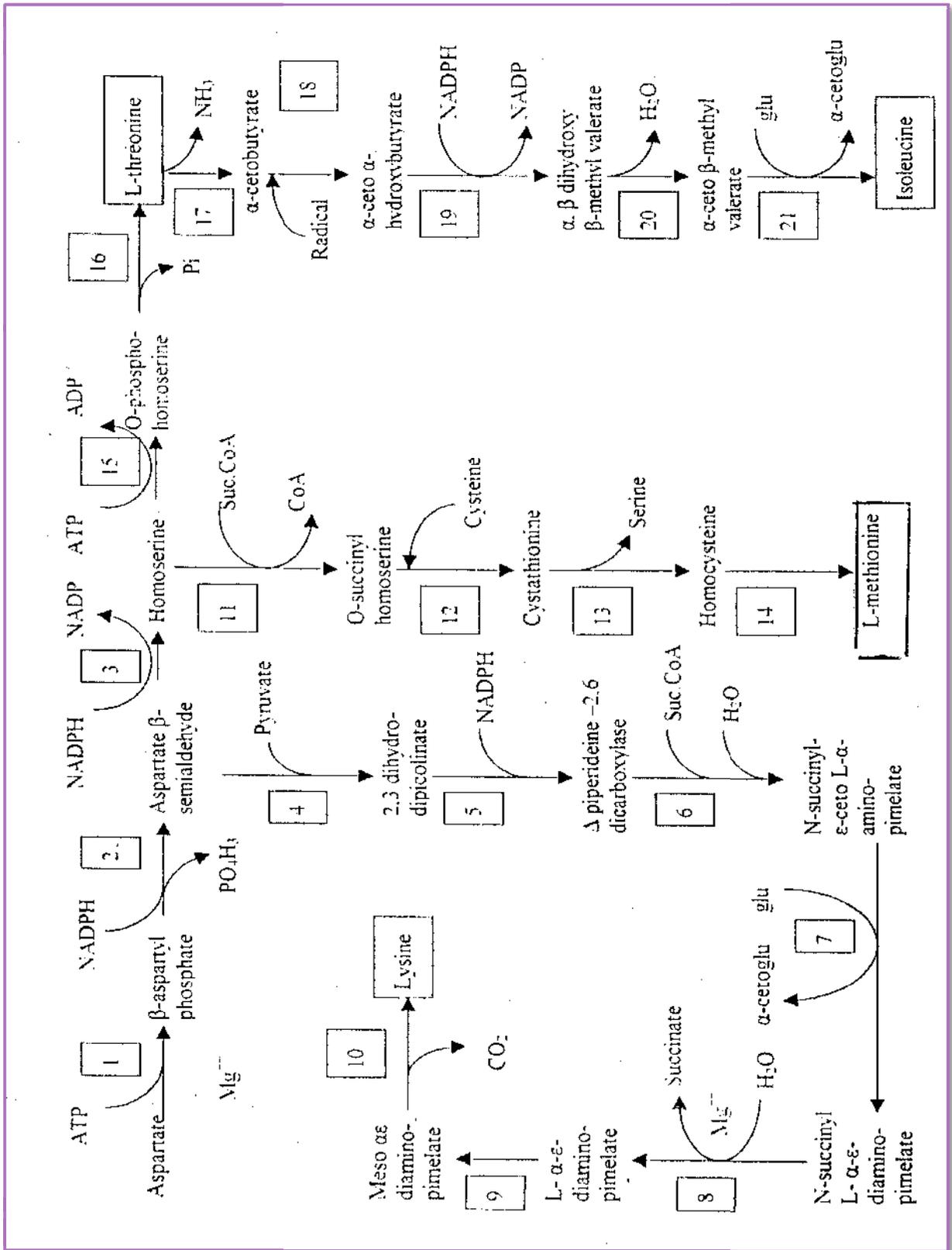


Figure n°5 : Schéma de la biosynthèse de l'aspartate chez les bactéries (Glanemann *et al.*, 2003)

Le L-aspartate sert de précurseur pour la voie du diaminopimelate. Le L-aspartate est obtenu par transamination entre le glutamate et l'oxaloacétate, qui est intermédiaire du cycle de KREBS. Elle est catalysée par une aspartate aminotransférase (Tosaka et Takinami, 1986).

L'acide aspartique est métabolisé jusqu'à un intermédiaire commun de la biosynthèse des quatre acides aminés, la lysine, méthionine, thréonine, isoleucine (Tosaka et Takinami, 1986 ; Sahm *et al.*, 1995).

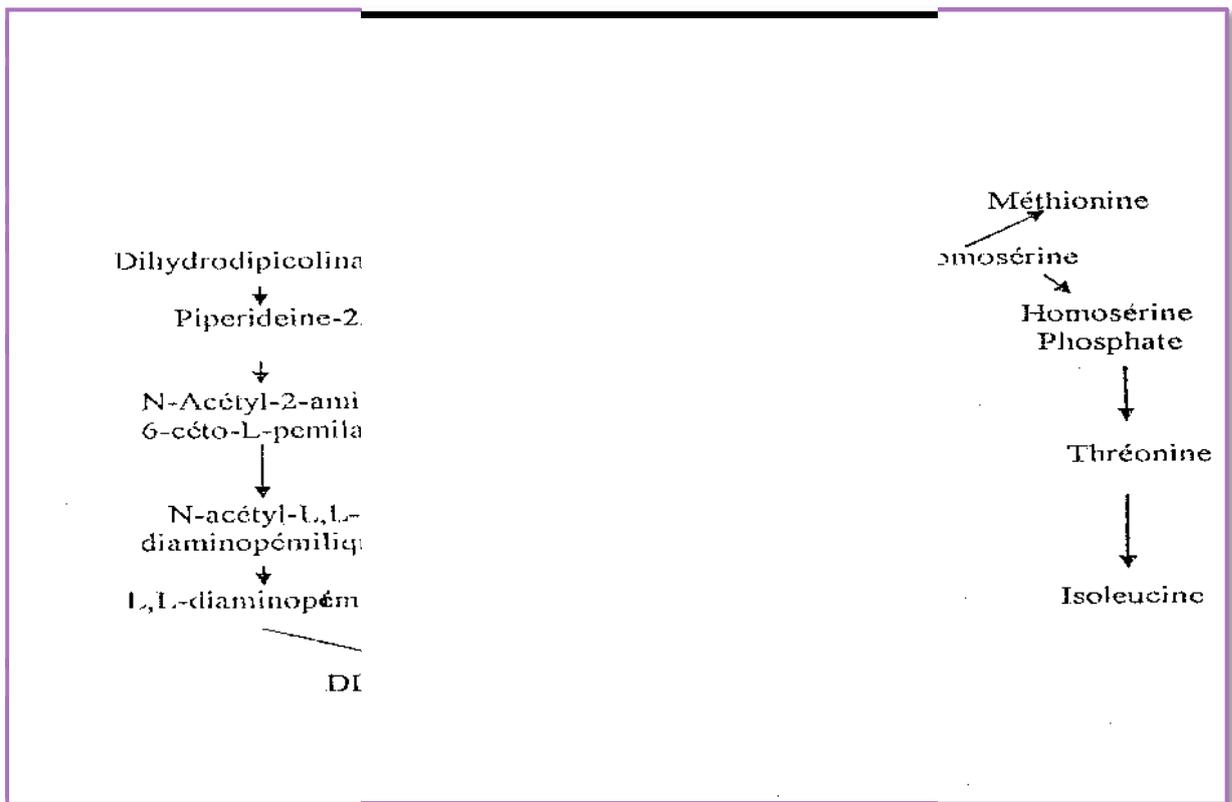


Figure n°6 : Voie de biosynthèse des acides aminés de l'aspartate (Khachatourians, 1995)

VIII.4. Mécanismes de régulation de la biosynthèse des acides aminés

La régulation, autrement dit, le maintien des valeurs des paramètres dans les limites assignées, est observée dans les systèmes équilibrés (Nikolaiv, 1991).

Ces phénomènes de régulation assurent à la fois l'adaptation des microorganismes aux conditions du milieu et des économies énergétiques (L'héritier, 1975; Heslot, 1977 ; Scriban, 1993) et de reproduire de manière coordonnée l'ensemble de ses structures (L'héritier, 1975).

Au niveau du catabolisme, ils sélectionnent la voie métabolique la plus appropriée, et au niveau de l'anabolisme, ils limitent les synthèses au niveau nécessaire (Scriban, 1993) ; donc ces mécanismes de régulation lui permettent de synthétiser que la quantité de métabolites qui lui est strictement nécessaire (Rivière, 1975).

C'est le cas de la majorité des acides aminés qui ne sont pas produits abondamment par les souches sauvages car leur synthèse est rigoureusement régulée par les mécanismes de rétro-inhibition (Shiio, 1982).

L'existence de ces phénomènes de régulation a été clarifiée au moment de l'isolement de *Corynebacterium* et sont maintenant très bien connus (Kinoshita et Nakayama, 1978 ; Nakayama, 1982), ce qui est nécessaire pour l'utilisation des microorganismes à des fins industrielles. Cette connaissance permet de modifier les conditions de fonctionnement des voies métaboliques et même grâce à des moyens génétiques, de modifier ces voies (Scriban, 1993 ; Guiraud, 2003).

La régulation du métabolisme cellulaire consiste principalement en la rétro-inhibition et la répression (Sano et Shiio, 1967; Plachy, 1984; Sasson, 1985) en excitant une surproduction des métabolites primaires (Sano et Shiio, 1967; Sasson, 1985; Glanemann *et al.*, 2003), tels que les acides aminés, nucléotides (Sasson, 1985).

Leur production en grande quantité peut être obtenue en dérégulant le système (Scriban, 1993).

La perméabilité membranaire est aussi impliquée dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés (Nakayama, 1979; Plachy, 1984), elle constitue un autre mécanisme qui protège les microorganismes du gaspillage du matériel organique vers le milieu extérieur, ce qui permet aux cellules de retenir les intermédiaires et les macromolécules nécessaires pour leur survie (Nakayama, 1979).

VIII.4.1. La régulation du métabolisme

La régulation du métabolisme intervient aussi bien au niveau de catabolisme que l'anabolisme (Scriban, 1993 ; Lynch, 2003).

Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire des enzymes qui catalysent les réactions biologiques et s'exerce au niveau de la synthèse et au niveau de l'activité (Leclerc *et al.*, 1995). Elle s'effectue par deux grands types de mécanismes.

- ❖ Régulation du fonctionnement des enzymes ;
- ❖ Contrôle de la biosynthèse des enzymes.

Le premier mode de régulation (activité) est de l'ordre biochimique et concerne la réaction enzymatique elle-même et les relations enzyme-substrat, les effets sont immédiatement exprimés.

Le second mode de régulation (synthèse) est d'ordre génétique, son efficacité est toute relative et ses effets ne sont observés que tardivement (Leclerc et *al.*, 1995).

Dans la voie de biosynthèse des acides aminés, la régulation de l'activité des enzymes par la rétro-inhibition et la régulation de la synthèse des enzymes par la répression sont aussi incriminées (Plachy, 1984 ; Lynch, 2003).

VIII.4.1.1. La rétro-inhibition

Dans les phénomènes de rétro inhibition le (ou les) produit (s) obtenu (s) en fin de chaîne de la voie biosynthétique inhibent lorsqu'ils sont en excès, le fonctionnement du ou des enzymes intervenant au début de la chaîne (Plachy, 1984 ; Rehm et Reed, 1993). Tandis que la répression résulte en la suppression de la synthèse d'un ou de plusieurs enzymes de la voie biosynthétique par le produit final (Plachy, 1984 ; Rehm et Reed, 1993).

La rétro-inhibition empêche la cellule de gaspiller des ressources chimiques et ce en s'opposant à ce qu'elle produise plus de substance qu'elle n'en a besoin (Tortora et *al.*, 2003).

Il existe divers systèmes de rétro-inhibition :

A. Rétro inhibition simple chaîne

Le cas le plus simple est celui d'une voie non branchée où le produit final inhibe le fonctionnement de la première enzyme de la chaîne (Guiraud, 1993).

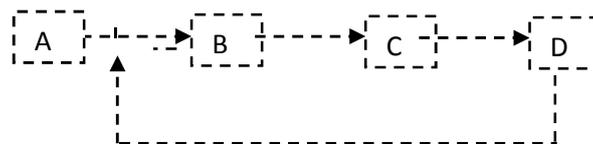


Figure n°7 : Rétro inhibition simple chaîne (Guiraud, 1993)

B. Rétro inhibition multivalente ou concertée

La présence des divers produits finaux est indispensable pour assurer l'inhibition ; chaque produit agissant séparément est inefficace (Scriban ,1999).

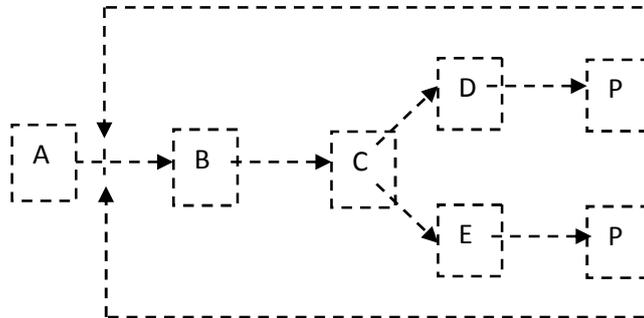


Figure n° 8 : Rétro inhibition covalente ou concertée (Guiraud, 1993)

C. Rétro inhibition cumulative et coopérative

Chacun des produits finaux inhibe partiellement l'activité de la première enzyme et la présence de plusieurs entraîne une inhibition croissante avec possibilité de synergie (Martin et Liras, 1981 ; Guiraud, 1993).

La régulation cumulative intervient lorsque des quantités en excès de tous les produits terminaux sont exigées pour une inhibition complète ou répression (Plachy, 1984 ; Rehm et Reed, 1993).

Dans la régulation coopérative l'enzyme est inhibée ou répressé, seulement lorsque plus d'un produit terminal est présent en excès (Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984).

Comme par exemple, l'aspartokinase, chez *Corynebacterium glutamicum* qui est sujette à une inhibition par la présence conjugué d'un excès d'acides aminés responsables de la rétro inhibition, à savoir la lysine et la thréonine (Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984 ; Pons et al., 1993).

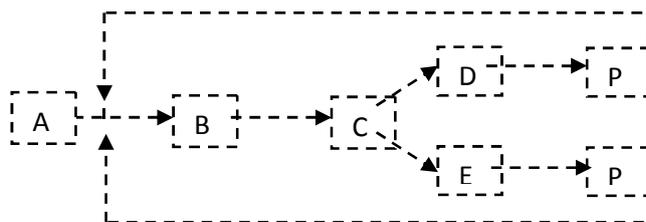


Figure n°9 : Rétro inhibition cumulative ou coopérative (Nakayama, 1982)

D. Rétro inhibition par isoenzymes

L'enzyme responsable de la première étape se trouve sous plusieurs formes « iso-enzymes », dont chacune est sensible à différents produits (Scriban, 1999)

Chez les microorganismes équipés de plusieurs iso-enzymes, une certaine réaction biosynthétique est synthétisée par plusieurs formes de la même enzyme, régulée par différents produits terminaux (Rehm et Reed, 1993 ; Plachy, 1984 ; Neidhardt et *al.*, 1994).

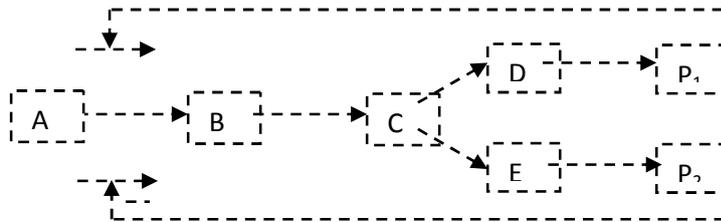


Figure n°10 : Rétro inhibition par isoenzymes (Guiraud, 1993)

E. Inhibition séquentielle

Dans ce cas des intermédiaires de la chaîne peuvent être des inhibiteurs de la première enzyme (Scriban, 1999). Quant aux différents produits finaux, ils agissent séparément sur les diverses branches de la voie de biosynthèse (Neidhardt et *al.*, 1994).

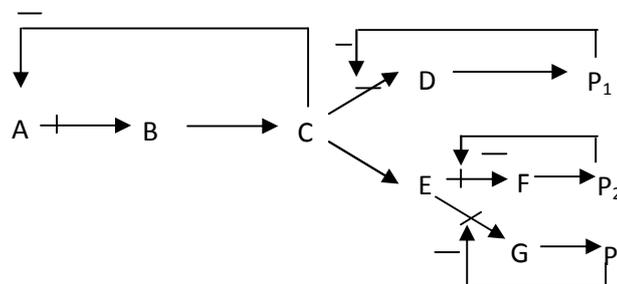


Figure n°11 : Rétro inhibition séquentielle (GUIRAUD, 1993)

F. Rétro inhibition plus activation

Certaines voies plus complexes, dans lesquelles un intermédiaire synthétisé dans la branche alimente une autre voie, sont parfois régulées par une combinaison d'inhibition et d'activation allostériques ; le produit final d'une branche est l'inhibiteur tandis que l'intermédiaire qui dans l'autre voie est juste avant le point de jonction, est l'activateur.

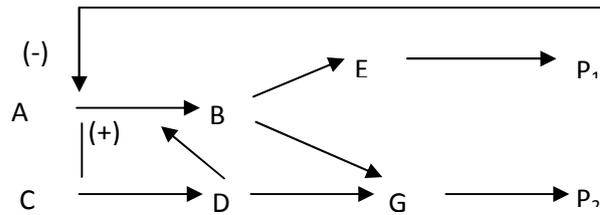


Figure n°12 : Rétro inhibition plus activation (Neidhart et *al.*, 1994)

VIII.4.1.2. La répression

Contrairement aux phénomènes d'induction qui touchent généralement les opérons impliqués dans le catabolisme, ceux de répression touchent les opérons impliqués dans l'anabolisme (Guiraud, 1993).

Dans les deux cas, il en résulte une économie pour la cellule car les deux enzymes correspondantes ne sont synthétisées qu'en cas de besoin (Guiraud, 1993; Scriban, 1993).

VIII.4.2. La perméabilité membranaire

La membrane cytoplasmique joue un rôle de barrière, en empêchant d'une part la fuite des composés intra cytoplasmiques quelques soit leur poids moléculaire, d'autre part les pénétrations anarchiques des constituants extracellulaires, elle régit donc l'entrée et la sortie des métabolites (Meyer et *al.*, 2000). De ce fait ; elle est le plus important composant du système de la perméabilité (Plachy, 1984 ; Kikuchi et Nakao, 1986).

Chez les bactéries Gram positif, la membrane cytoplasmique constituée d'une bicouche lipidique et de protéines, entourée par la paroi cellulaire, elle même constituée de peptidoglycane, polymère de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique. Cette paroi assure la rigidité de la cellule (Pons *et al.*, 1993; Eggeling et Sahm, 2001).

Dans le but d'atteindre des rendements élevés lors de la production des acides aminés par fermentation, il est nécessaire d'altérer la perméabilité de la barrière entraînant une augmentation de l'excrétion des acides aminés synthétisés par la cellule dans le milieu (Plachy, 1984). L'augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne pour permettre l'excrétion des acides aminés est obtenue par limitation de biotine, ou par l'addition de la pénicilline à un milieu riche en biotine, au cours de la phase de croissance, ou bien par l'addition des acides gras saturés dans le milieu de culture (Demain et Birnbaum, 1968 ; Plachy, 1984 ; Marquet *et al.*, 1986).

La concentration idéale en biotine pour la production d'acide glutamique est généralement inférieure à 5µg/l de milieu (Nakayama, 1982).

- A faible concentration de biotine la croissance bactérienne est réduite, la membrane est pauvre en phospholipides et le taux d'acide palmitique est supérieur au taux d'acide oléique. Dans ces conditions, l'acide glutamique est excrété.
- A forte concentration en biotine, la croissance devient optimale, la membrane est plus riche en phospholipides et en acide oléique, et l'acide glutamique n'est plus excrété (Pons *et al.*, 1993).

La limitation du taux de biotine ou des acides gras saturés C₁₆-C₁₈ provoque une biosynthèse incomplète de l'acide oléique, ce qui cause la diminution de taux de phospholipides dans la paroi cellulaire (Kinoshita, 1985).

La figure explique l'excrétion du glutamate à travers la membrane bactérienne en relation avec leur contenu en phospholipides (Hirose *et al.*, 1985).

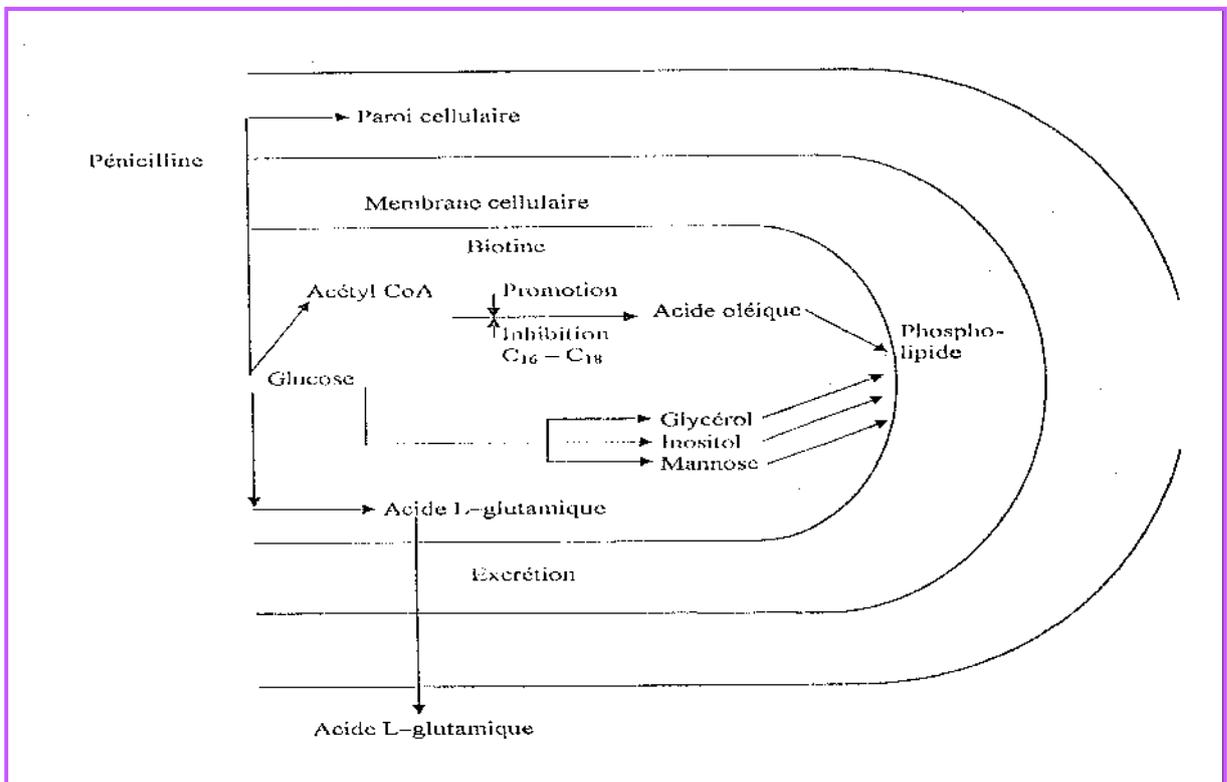


Figure n° 13 : La perméabilité cellulaire de l'acide glutamique en relation avec contenu de la membrane en phospholipides (Hirose *et al.*, 1985).

VIII.4.3. La régulation de la biosynthèse de la lysine chez *Corynebacterium glutamicum*

Dans le chemin de la biosynthèse de L-lysine dans *C. glutamicum* qui est illustré dans la figure n°5, l'aspartate sert tout d'abord à la synthèse de l'isoleucine car l'homosérine déshydrogénase est naturellement plus active que la dihydrodipicolinate synthétase (Simon, 1995).

La première enzyme, aspartokinase, est réglée par une rétro-inhibition dû à la concentration de L-thréonine et L-lysine. L-thréonine cause une inhibition de l'homoserine dehydrogenase, pendant que L-méthionine réprime la synthèse de cette enzyme (Lengler et al., 1999).

Les mutants de *C.glutamicum* défectueux de l'enzyme homoserine dehydrogenase sont des auxotrophes, ne peuvent croître sauf si l'homoserine (ou un mélange de thréonine et méthionine) est fourni. Ces mutants produisent des grands montants de lysine. La première enzyme dans le chemin commun (aspartokinase) est le sujet d'une action concentrée de lysine et thréonine et le niveau de thréonine trop bas ne sera pas cause pour une inhibition de l'aspartokinase (Dale et Park, 2010).

VIII.5. Amélioration des souches en vue de la surproduction des acides aminés

Dans de nombreuses voies de biosynthèse, le produit final inhibe le fonctionnement des enzymes ou bien réprime leur synthèse (Scriban, 1993), mais la production d'un métabolite, en grandes quantités peut être obtenue en « dérégulant » le système de régulation (Scriban, 1993 ; Guiraud, 1998).

La production de nombreux métabolites par fermentation microbienne fait généralement appel à l'utilisation des mutants (Guiraud, 1993). C'est la raison pour laquelle de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des souches industrielles de corynébactéries par mutagenèse et sélection des mutants (Sano et Shiiro, 1967 ; Pons et al., 1993 ; Chassagnole et al., 2003).

La mutagenèse permet de modifier le fonctionnement des voies et leur régulation. Elle permet de rendre productrices des souches qui ne le sont pas, et de rendre hyper productrices celles qui le sont (Guiraud, 1993).

Une stratégie assez sévère a été utilisée pour l'obtention des souches surproductrices d'acides aminés (Shiiro, 1982, Shiiro et Nakamori, 1989 ; Khachatourians, 1995).

- L'utilisation de la génétique pour la suppression des mécanismes de rétrocontrôle ;
- Altération des chaînes intermédiaires des différentes voies ;
- Augmentation de la concentration du substrat de régulation des enzymes en compétition avec l'effet rétrocontrôle ;

- Diminution de la concentration de l'effecteur ou du produit final de la voie ;
- Stimulation de l'assimilation cellulaire du précurseur ;
- Inhibition ou inactivation de l'enzyme concernée par la dégradation de l'acide aminé produit.

Les souches de *Brevibacterium flavum* ou *Corynebacterium glutamicum* sont très utilisées dans la production des acides aminés de forme L (Kinoshita, 1985 ; Guiraud, 1993), particulièrement des mutants dérivés de ces espèces sont d'un intérêt industriel pour la production de la L-lysine et L-glutamate (Marx *et al.*, 2003).

L'apparition d'une mutation est un phénomène naturel (Guiraud, 1993). Les fréquences spontanées très faibles peuvent être augmentées dans d'énormes proportions lorsqu'on soumet le matériel biologique à l'action de certains agents qualifiés de mutagènes (agents physiques, ou agents chimiques) (L'héritier et Leblon, 1999). Pour améliorer une mutation, il est possible de cumuler plusieurs mutations (Kinoshita, 1985 ; Guiraud, 1993).

VII.5.1. Types de mutants utilisés pour la surproduction des acides aminés

Les microorganismes utilisés dans les processus microbiologiques pour la production des acides aminés, sont divisés en quatre classes : les souches sauvages, les mutants auxotrophes, les mutants de régulation et les mutants auxotrophes de régulation (Plachy, 1984).

VII.5.1.1. Les mutants auxotrophes

Les mutants auxotrophes forment un des groupes les plus étudiés (Meyer *et al.*, 2000). Les mutants auxotrophes sont des mutants ayant perdu une enzyme d'une chaîne de biosynthèse en vue d'obtenir un intermédiaire de cette chaîne (Rivière, 1975).

La production directe de la L-lysine à partir des hydrates de carbone, a été développée avec un mutant auxotrophe de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en homoserine ou thréonine plus méthionine par Kinoshita *et al.* (1958) ; Nakayama (1982) ; Flickinger et Drew (1999).

La mutation du gène de l'homoserine deshydrogenase a pour effet de supprimer l'activité de cette enzyme et par conséquent, causer la surproduction de la lysine (Shiio et Nakamori, 1989) et d'annuler la synthèse de la thréonine et de la méthionine ; l'un des inhibiteurs (thréonine) de l'aspartokinase se trouve donc éliminer (Othmer, 1984; Nakayama, 1985 ; Padirac, 1985 ; Sasson, 1985).

Le mécanisme de régulation de la biosynthèse de la lysine chez *Corynebacterium glutamicum* est représenté dans le schéma suivant (Pons *et al.*, 1993).

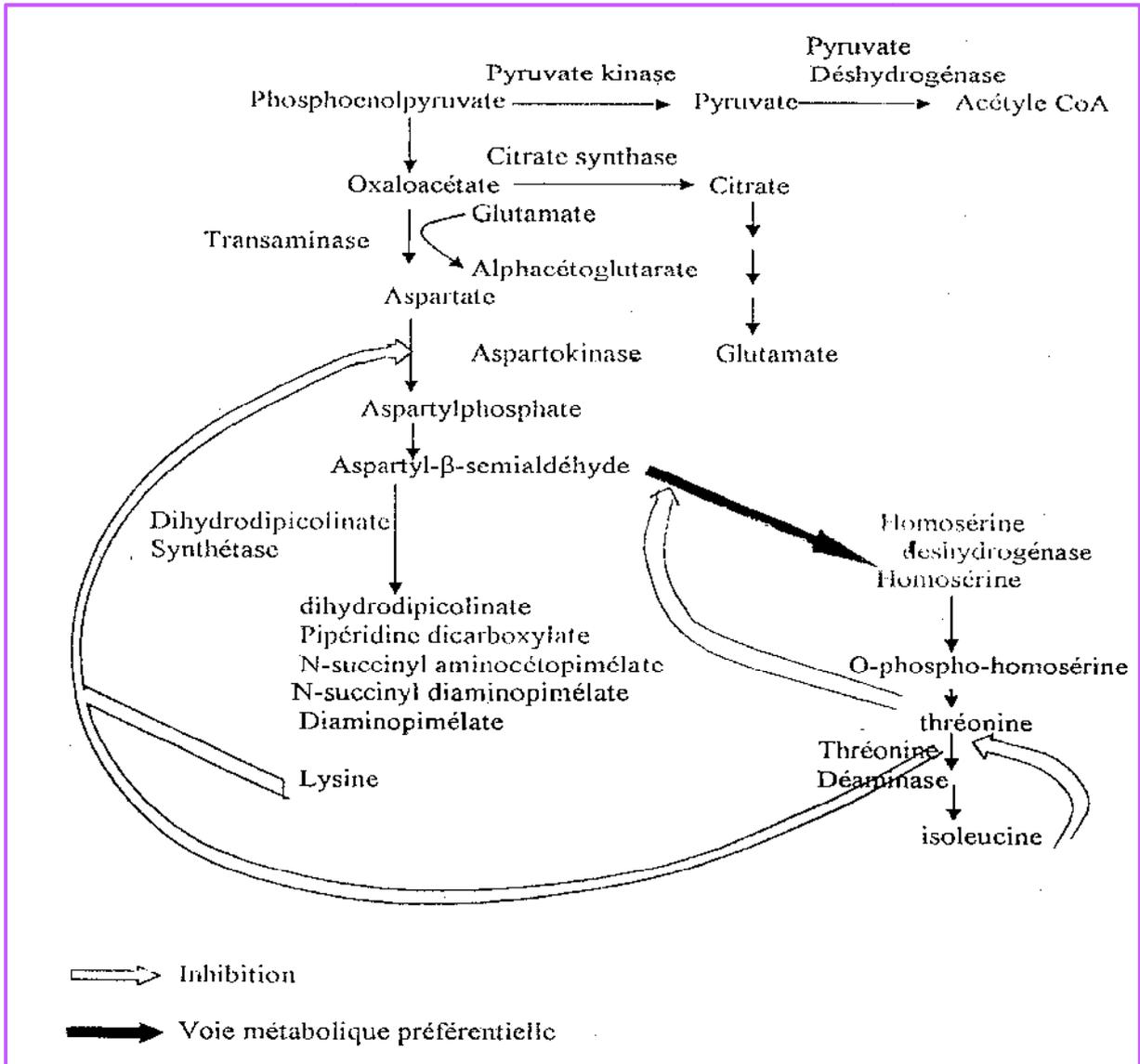


Figure n° 14 : Voies métaboliques et régulation de la biosynthèse des acides aminés de la famille de l'acide aspartique (Pons *et al.*, 1993)

VII.5.1.2. Les mutants de régulation

Une autre technique de surproduction des acides aminés est d'utiliser des mutants de régulations.

Le principe de cette méthode est l'obtention des mutants insensibles à la rétro-inhibition et la répression (Tosaka et Takinami, 1986).

Les mutants de régulation sont sélectionnés à partir de mutant résistants à des analogues d'acides aminés qui sont des composés ayant une structure analogue aux acides aminés et inhibant la croissance des organismes sensibles (Rivière, 1975 ; Plachy, 1984).

Ces analogues d'acides aminés sont non susceptibles de remplacer le métabolite au cours du métabolisme de la souche mais capables seulement d'occuper le site régulateur lors de la rétro-inhibition (Rivière, 1975).

Ils jouent le rôle d'une fausse inhibition de l'effecteur et inhibent la croissance du microorganisme (Kikuchi, 1980).

Des mutants peuvent être isolés en raison de leur résistance à un composé comme S-(β -aminoéthyl) L-cystéine (AEC) qui ressemble à la lysine au point d'imiter son action régulatrice et d'inhiber totalement l'aspartokinase.

En présence de l'AEC, les souches sauvages meurent car elles ne peuvent pas synthétiser la lysine, tandis que les souches mutantes résistantes survivent (Sasson, 1985).

A titre d'exemple, un mutant de *Brevibacterium flavum* résistant à l'AEC et en présence de thréonine produit de large quantité de lysine (Plachy, 1984 ; Kinoshita, 1985).

La résistance à l'AEC est provoquée par désensibilisation de l'aspartokinase due à l'élimination de la rétro-inhibition concertée (Tosaka et Takinami, 1986).

La conversion de l'aspartate semi-aldéhyde à la thréonine est rétro-inhibée par la thréonine, ainsi la surproduction de l'aspartate semi-aldéhyde est dirigée vers la production de la lysine (Nakayama, 1982).

VII.5.1.3. Les mutants auxotrophes de régulation

Les mutants auxotrophes de régulation sont généralement employés pour la production

des acides aminés par fermentation.

Un mutant de *Corynebacterium glutamicum* a été isolé, résistant à l'AEC et exigeant en homoserine, et produit de grande quantité de lysine (Plachy, 1984).

La combinaison de l'auxotrophie avec la dérégulation génétique est généralement utilisée en vue de l'augmentation des rendements en métabolites primaires (Nakayama, 1979 ; Tosaka, 1986).

L'utilisation des marquages génétiques multiples contribue à la stabilisation de la productivité contre les réversions des mutants durant la fermentation prolongée (Nakayama, 1979).

VII.5.1.4. Autres techniques d'amélioration

Le progrès de la génétique microbienne appliquée à des souches d'intérêt industriel permet de comprendre la grande diversité du métabolisme microbien et de l'orienter dans des directions utiles (Flickinger et Drew, 1999 ; Guillouet et *al.*, 1999).

Actuellement, le développement de nouvelles techniques de la manipulation génétique *in vivo* (comme la transduction, la fusion cellulaire) et *in vitro* (la recombinaison de l'ADN) sont aussi appliquées dans la construction d'un nouveau type de producteurs d'acides aminés.

Les techniques de transduction et de fusion cellulaire sont utilisées pour la recombinaison des caractères génétiques désirés, tandis que les techniques de recombinaison de l'ADN sont utilisées pour l'augmentation du nombre de copies de gène (Enei et Hirose, 1985, Radmacher et *al.*, 2002).

MATERIEL ET METHODES

I. Isolement de souches bactériennes à partir de substrats naturels

I.1. Prélèvement des échantillons

Quatre substrats naturels ont été choisis pour la mise en évidence de la présence de bactéries corynéformes capable de produire naturellement de l'acide glutamique.

Ces substrats sont constitués d'excréments d'oiseaux, prélevés directement de nids de moineaux, d'échantillons de terre prélevés aux abords de lacs de la région de Constantine, du lait cru collecté directement après la traite et enfin des épinards achetés d'un marché local de Constantine.

I.2. Préparation des échantillons

Pour chacun des quatre substrats, 20g de l'échantillon sont mélangés à 100 ml d'eau physiologique qui seront mélangés au vortex afin d'obtenir une distribution homogène des bactéries dans les substrats.

Pour ces suspensions et l'échantillon de lait, des séries de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-5} seront effectuées.

Ces dilutions vont servir à ensemencés des boites de Pétri contenant un milieu spécifique pour l'isolement de ce type de bactérie.

Etant donné que les bactéries corynéformes sont exigeantes, le choix d'un milieu gélosé riche est donc nécessaire.

Le milieu TSA (Trypticase Soja Agar) semble indiqué et dont la composition est : Peptone trypsique de caséine (15g/l), peptone papainique de soja (5g/l), chlorure de sodium (5g/l), agar (15g/l). Le pH est ajusté à 7,3 avant stérilisation.

I.3. Ensemencement et isolement des souches

Le milieu est additionné d'amphotéricine B (antifongique) à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ et d'acide nalidixique (antibactérien inhibant les bactéries à Gram négative) à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Les milieux de cultures sont ensemencés à raison de 0,1 ml par dilution et par boite de pétri. Les boites sont incubées à 30°C pendant 48h.

I.4. Sélection des souches isolées

La sélection des bactéries isolées, sur le milieu TSA, est basée sur les techniques classiques d'Abe et *al.*, (1967), à savoir les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Le pouvoir de production des acides aminés, en particulier l'acide glutamique, sur différents milieux, leur capacité à se développer sur d'autres milieux de culture et enfin l'exigence, des souches isolées, en biotine est étudiée vu que cette exigence est une caractéristique particulière des corynébactéries.

I.4.1. Caractéristiques morphologiques

Après 48 heures d'incubation à 30°C, on sélectionne les colonies dont les caractéristiques sont proches de celle des corynéformes établies par Abe et *al.*, (1967), à savoir colonies de couleur jaune à jaune pâle, en général rondes, lisses, brillantes et de taille variables.

La coloration de Gram nous permet de choisir les bactéries à Gram positif qui apparaissent isolées, en paires mais aussi en masses irrégulières, généralement de formes sphériques, ellipsoïdales jusqu'à la forme de petits bâtonnets arrondis à l'extrémité (forme de massue), ou de courts bâtonnets avec des extrémités arrondies et plus particulièrement ayant la disposition en « V » (Kinoshita, 1985) qui est l'une des plus importantes caractéristiques de sélection.

I.4.2. Croissance sur divers milieux de culture

Divers milieux de culture ont été utilisés pour estimer l'aptitude des souches isolées à croître sur des milieux autres que le milieu TSA.

I.4.3. Mise en évidence de la production des acides aminés

La capacité des souches isolées à produire des acides aminés, principalement l'acide glutamique, est estimée par l'utilisation de deux milieux de culture semi-synthétiques M₁ et M₂ dont la principale différence réside dans la nature de la source d'azote.

Le milieu M₁ a comme source d'azote le (NH₄)₂SO₄ et de l'urée pour le milieu M₂ car certaines bactéries du groupe des corynéformes ne possèdent pas d'uréase, ne pouvant, par conséquent, pas produire d'acides aminés dans ce dernier milieu. Ce test peut aussi être utilisé dans la recherche de l'activité uréasique.

La fermentation est effectuée dans des erlens, de 250ml contenant chacun 50ml de l'un des deux milieux, à 30°C dans un shaker à 120 rpm et pendant 72h (Su et Yamada, 1960).

Les surnageants, obtenus après fermentation et centrifugation à 5000 tr/mn, vont servir à la mise en évidence de la production des acides aminés par des chromatographies sur couche mince (CCM) en utilisant des acides aminés témoins à raison de 5g/l (Kinoshita, 1985).

Tableau n°11: Composition du milieu semi-synthétique M₁ et M₂ (Su et Yamada, 1960)

	M ₁	M ₂
Glucose	50,0	50,0
(NH₄)₂SO₄	20,0	/
Urée	/	8,0
Peptone	2,0	2,0
Extrait de viande	2,0	2,0
K₂HPO₄	1,0	1,0
MgSO₄, 7H₂O	0,5	0,5
CaCO₃	30,0	/
pH	7,2	7,2

I.4.4. Mise en évidence de l'exigence en biotine

Les corynébactéries exigent de la biotine pour leur croissance (Abe et al., 1967 ; Plachy, 1984). L'étude de cette exigence est effectuée sur trois milieux de culture dont la principale différence est que le milieu M₁ contient de l'extrait de levure, M₂ de la biotine et un troisième ne contenant ni extrait de levure ni biotine. Le taux de biomasse est déterminé par gravimétrie.

I.4.5. Tests d'identification physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées ont été estimées par l'étude de divers tests, à savoir :

A. Effet de la température

L'effet de la température sur la croissance de la souche a été estimé par l'utilisation de températures d'incubation, comprise, entre 20C° et 40C°.

B. Type respiratoire

Pour déterminer le caractère aérobie, anaérobie ou aéro-anaérobie de la souche, on a utilisé une gélose profonde de type VF (Viande foie) (contenant du glucose mais pas de nitrate), conditionnée dans des tubes étroits (tube de PREVOT) dont le diamètre est deux fois plus petit que les tubes à essai usuels (Guiraud, 1998).

Les bactéries en se développant, auront réalisé une culture revêtant un des quatre caractères principaux : aérobie strict, anaérobie strict, aéro-anaérobie et microaérophile.

C. Tests de sporulation

La présence des spores bactériennes a été mise en évidence par essai de culture sur le milieu TSA à partir d'une suspension bactérienne ayant subi une pasteurisation de 10 mn à 70°-80C°. La croissance, après ce traitement, confirme la présence de spores et vice versa (Guiraud et Galzy, 1980).

D. Test de mobilité

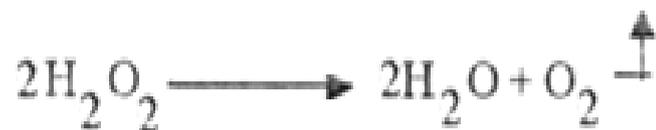
Ce test consiste à examiner la souche vivante entre lame et lamelle, pour apprécier leur mobilité. De plus l'appréciation de la mobilité peut être confirmée par le test du mannitol-mobilité (Guiraud et Galzy, 1980).

E. Recherche des enzymes respiratoires

Pour la mise en évidence des enzymes respiratoires, deux tests ont été effectués, et qui sont :

➤ **Test de catalase**

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit.



La recherche de cette enzyme est effectuée par mise en contact de la souche microbienne avec de l'eau oxygénée à 10 volumes. La présence de bulles d'oxygène est une preuve de la présence de catalase (Guiraud, 1998).

➤ **Test d'oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne d'oxydoréduction pour catalyser la fixation de l'hydrogène et de l'électron sur l'oxygène. Sa recherche est basée sur l'oxydation du N, N-diméthyl-1,4-phénylènediaminedichlorure, rouge virant rapidement au violet sous forme oxydée et incolore sous forme réduite. Ce test s'effectue par dépôt d'un petit fragment de colonie d'une culture jeune à la surface des disques «0x » (oxydase) (Guiraud, 1998).

F. Caractérisation de divers types fermentaires

Deux tests permettent de caractériser les types fermentaires de la souche et qui sont :

➤ **Réaction au rouge de méthyle « RM »**

Cette réaction permet de différencier la fermentation acide mixte de la fermentation butylène glycolique, chez les entérobactéries, mais son utilisation est plus générale.

Elle consiste en une culture sur un milieu glucosé « CLARK et LUBS » puis en la détermination colorimétrique de l'acidité par la réaction au rouge de méthyle (RM). Lorsque le pH est inférieur à 4,2 le réactif reste rouge, ce qui traduit une production d'acide (RM⁺) mais il vire au jaune lorsque le pH est supérieur à 6,3 (RM⁻) (Guiraud, 1998).

➤ **Réaction de Voges - Proskauer (VP)**

Cette réaction permet la mise en évidence de l'acétyl méthyl carbinol (AMC) ou de l'acétoïne, elle est réalisée à partir du milieu de CLARK et LUBS.

Si la souche produit de l'acétyl méthyl carbinol (ou acétoïne), la présence de ce métabolite se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge en surface, pouvant diffuser dans le milieu (souche VP⁺) (Guiraud, 1998).

G. Dégradation des glucides

Pour savoir si la souche est capable d'utiliser les différents glucides comme source de carbone avec la production de gaz ou non, divers milieux ont été ensemencés.

➤ **Milieu TSI (Tree Sugar Iron agar)**

Ce milieu contient trois sucres (lactose, glucose et saccharose) plus le fer.

La dégradation des sucres avec formation d'acides est révélée par le virage du rouge orangé au jaune de l'indicateur rouge de phénol ; une alcalinisation se traduit par une coloration rouge foncé.

Le thiosulfate est réduit par certains germes en hydrogène sulfuré qui réagit avec des sels ferriques en donnant du sulfure de fer noir.

Si le germe est gazogène, il y a formation de bulles d'air dans la masse ou contre les parois (Merck, 1986).

➤ **Milieu mannitol-mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose, c'est pourquoi nous décrivons son utilisation avec celle des glucides.

Cette dégradation conduit à la formation de fructose, dont l'attaque aboutit à des acides à chaînes très courtes (acide acétique, acide formique).

Le milieu mannitol - mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité du germe.

La fermentation du mannitol entraîne le virage au jaune du milieu.

Les germes mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu.

Les germes immobiles croissent uniquement le long de la piqûre d'ensemencement. (Marchal *et al.*, 1982).

H. Etude des intermédiaires de métabolisme :

Il s'agit de déterminer si la souche examinée est capable ou non de dégrader un composé organique intervenant dans le métabolisme des glucides.

➤ **Culture sur citrate de Simmons**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone, le citrate, qui est le premier composé intervenant dans le cycle de Krebs (Adrian *et al.*, 1995 ; Guiraud, 1998). Seules les bactéries possédant un citrate - perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

On classe une bactérie « citrate - positive » lorsqu'elle utilise le citrate en provoquant une alcalinisation du milieu car toute multiplication cellulaire implique l'utilisation de citrate, de plus cette croissance s'accompagne fréquemment d'une alcalinisation qui se traduit par le virage au bleu de l'indicateur (Marchal *et al.*, 1982).

➤ **Hydrolyse du Tween 80**

Cette hydrolyse est testée sur milieu solide supplémenté de 1 % (v/v) de Tween 80 au milieu autoclavé. L'ensemencement se fait par touche et l'existence d'une lipase se traduit par un halo opaque autour des colonies dû à la précipitation des acides gras (Gutiérrez et González, 1972).

➤ **Hydrolyse de l'amidon**

Cette hydrolyse est effectuée sur milieu solide supplémenté de 0.1% (p/v) d'amidon soluble. L'ensemencement est fait par touche. Après incubation pendant 48h à 37°C, l'hydrolyse de l'amidon est déterminée par pulvérisation d'une solution de lugol. L'apparition de zones claires traduit une hydrolyse de l'amidon (Guiraud, 1998).

➤ **Recherche de l'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG)**

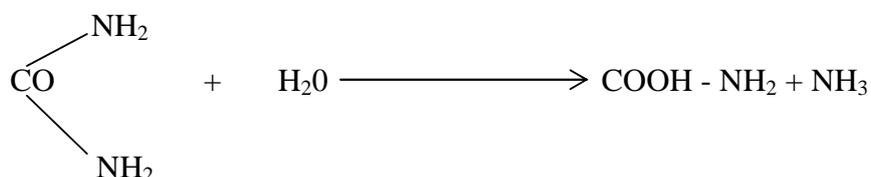
L'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside est un analogue structural du lactose. Il s'hydrolyse en galactose et en orthonitrophénol (composé soluble jaune) en présence de deux enzymes ; la β-galactosidase-membranaire, permettant la pénétration du lactose dans la cellule et la β-galactosidase catalysant l'hydrolyse de ce dernier en galactose et glucose. Un disque imprégné d'ONPG est ajouté à la suspension. Après incubation à 37° C pendant 48h, la présence de la β-galactosidase se traduit par l'apparition d'une couleur jaune (Delarras, 1998).

I. Etude du métabolisme azoté

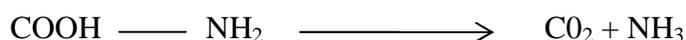
Elle consiste en l'étude de la dégradation des substances azotées telle que l'urée ainsi que les divers acides aminés par les souches isolées.

➤ Dégradation de l'urée

Toutes les bactéries hydrolysent l'urée (Marchal *et al.*, 1982) :



Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



CO₂ et NH₃ se combinent donnant du carbonate d'ammonium :



Le carbonate d'ammonium formé alcalinise les milieux contenant de l'urée.

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de l'uréase est le milieu Urée - indole.

Si l'urée est dégradée (uréase - positive), ce milieu prend une teinte rouge violacée ou rose - rouge due à l'alcalinisation.

Si l'urée n'est plus dégradée (uréase - négative), aucun changement de coloration de ce milieu ou bien il prend une teinte jaune citron (Marchal *et al.*, 1982).

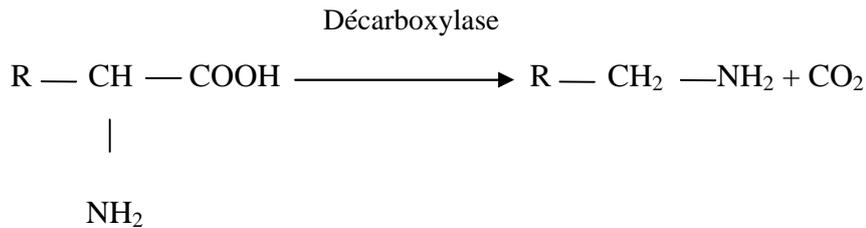
➤ Dégradation des acides aminés

• Recherche de l'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase. Le milieu utilisé est de l'eau peptonée exempte d'indole et l'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs. La présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge vermillon en surface, par contre s'il y a apparition d'un anneau brunâtre, ou bien avec une teinte originelle du réactif, la réaction indole est négative (Marchal *et al.*, 1982).

• Recherche des décarboxylases : LDC, ODC et ADH

Les décarboxylases scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂ suivant la réaction (Marchal *et al.*, 1982 ; Merck, 1986):



- La lysine — décarboxylase ou LDC { lysine $\xrightarrow{\text{LDC}}$ cadavérine }
- L'ornithine — décarboxylase ou ODC { ornithine $\xrightarrow{\text{ODC}}$ putrescine }
- L'arginine — dihydrolase ou ADH { Arginine $\xrightarrow{\text{ADH}}$ ornithine }

Les milieux utilisés pour la mise en évidence de ces activités enzymatiques pour la souche étudiée sont:

Le milieu LDC

Le milieu ODC

Le milieu ADH

Ces milieux d'étude, sans peptones, ne renferment qu'un seul acide aminé (celui dont on veut rechercher la décarboxylation), du glucose, de l'extrait de levure et du bromocrésol pourpre comme indicateur de pH.

La fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'aminé entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet (pH supérieur à 7) après une courte phase de jaunissement.

Ce test ne peut être réalisé qu'avec des micro-organismes métabolisants le glucose.

L'activité enzymatique se manifeste par virage vers l'alcalinité de l'indicateur coloré (violet) .mais si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune (Marchal *et al.*, 1982 ; Merck, 1986).

- **Recherche du tryptophane - désaminase « TDA »**

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide indole pyruvique, cette dernière donne avec le perchlorure de fer (réactif de la TDA) une coloration brune. La recherche est effectuée sur l'eau peptonée contenant le tryptophane.

La présence d'acide indole pyruvique se traduit par une coloration brune - rouge avec présence fréquente d'un précipité après avoir ajouté quelques gouttes du réactif de la TDA donc un TDA positif. Par contre une coloration jaune orangé traduit l'absence de cet acide donc un TDA négatif (Marchal *et al.*, 1982).

- **Réduction et respiration des nitrates**

La réduction des nitrates est étudiée en tube contenant le milieu de culture additionné de 0.5% (p/v) de NaNO_3 et muni de la cloche de Durham. Pour le test de respiration des nitrates, les tubesensemencés sont recouverts d'une couche de vaseline. L'incubation a lieu à 37°C pendant 4 jours. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'utilisation de l'acide sulfalinique et α -naphtylamine. La présence de gaz dans la cloche est le résultat d'une réduction des nitrites en azote (Smibert et Krieg, 1981).

I.4.6. Test spécifique de *Brevibactérium*

Pour l'identification de *Brevibactérium*, un test pigmentaire est nécessaire. Il consiste à faire placer une goutte de KOH 5M sur une lame ou de préférence sur une plaque de céramique blanche. Après 2mn, la coloration devient rose-rouge si la colonie est *Brevibactérium*.

II. Mutation et sélection des mutants

II.1. Incubation des mutants par un agent mutagène chimique (Ethyl Methane Sulfonate - EMS)

II.1.1. Préparation de la suspension

Ensemencement d'un milieu complexe liquide avec la souche isolée et sélectionnée (on ensemence trois (03) erlens contenant chacun le milieu complexe liquide plus la souche proposée).

On incube dans un shaker (bain Marie avec agitation) à 30°C pendant 24 heures (voir figure n°15).



Figure n°15: Incubation sur Shaker

On prend 20 ml de chaque erlen qu'on centrifuge à 2500 tr/mn pendant 10 mn, les sédiments sont lavés avec du tampon phosphate à pH 7,2 puis on centrifuge une 2^{ème} fois à 2500 tr/mn pendant 10 mn.

Après ajout du milieu stérile, on incube pendant 2 heures.

La composition du tampon phosphate est la suivante (GASSER, 1966 ; BOURGEOIS et *al.*, 1996).

NaCl	8, 5g.
Na₂HPO₄	1, 28g.
NaHPO₄, H₂O	0, 14g.
Eau distillée	100 ml.

pH = 7, 2

II.1.2. Induction proprement dite (Mise en contact avec l'agent mutagène : EMS)

Après incubation, la suspension est mise en contact avec l'agent mutagène (EMS à 0,05 M), agitée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant une minute puis incubée à 30°C pendant 18 heures.

Une fois l'incubation terminée, on centrifuge à 2500 tr/mn pendant 10 mn, on lave les sédiments 2 fois avec 10 ml d'eau physiologique et à chaque fois on centrifuge à 2500 tr/mn pendant 10 mn.

Par la suite, on fait une resuspension du sédiment dans 5ml d'eau physiologique stérile. Le nombre de bactéries contenus après culture et mutation est grand, il est donc préférable de procéder à des dilutions jusqu'à 10^{-5} comme schématiser dans la figure ci-dessous.

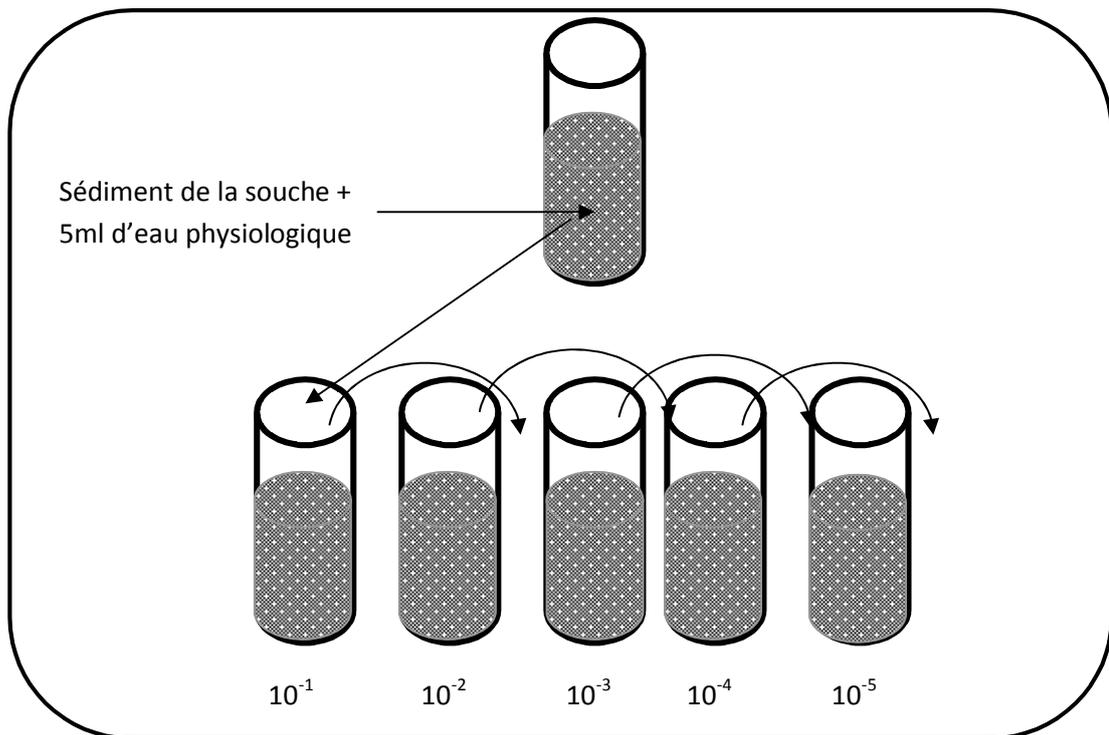


Figure n°16: Schéma de la dilution

II.1.3. Stabilisation des mutants

Le milieu complexe liquide a été solidifié à raison de 3% d'agar. Ce dernier est coulé dans des boîtes de Pétri qui serontensemencées par les dilutions puis incubées à 28°C pendant 72 heures pour la stabilisation des mutants.

Il faut trois (03) boîtes àensemencer pour chaque dilution.

II.2. Criblage et sélection des mutants

Après apparition des colonies (supposées être des mutants), on procède à la méthode de répliquat selon LEDERBER et LEDERBERG (1952) pour sélectionner les mutants.

Le déroulement des étapes se fait comme suit :

Les trois (03) boîtes ensemencées par les dilutions de la souche vont servir à ensemencer une boîte contenant le milieu solide, c'est la méthode des matrices.

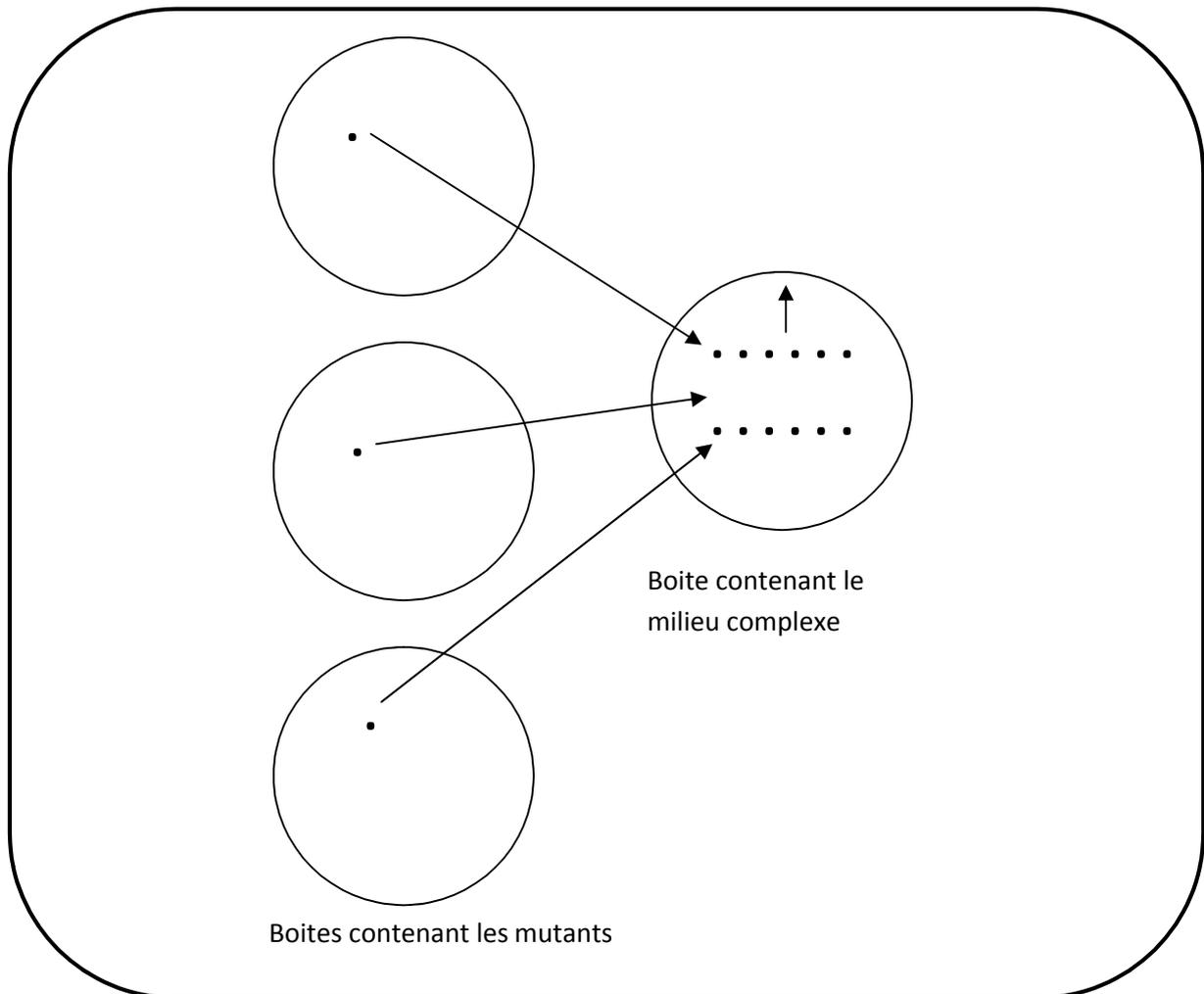


Figure n°17: Schéma explicatif de la méthode des matrices

Après incubation commence alors la méthode de répliquat proprement dite. Celle-ci consiste à presser délicatement un disque de velours stérile sur la surface d'un milieu complexe (boîte mère) portant les colonies des prototrophes et des auxotrophes. Des cellules de chacune des colonies adhèrent au velours qui est alors pressé légèrement sur la surface d'une boîte stérile du milieu minimum (Guiraud, 1993 ; Singleton, 1999).

La composition des milieux complexe (Sano et Shiio, 1967) et minimum (Plachy, 1970 ; Kinoshita, 1985) est représentée dans le tableau n°12.

Tableau n°12: Composition en g/l des milieux solides complexe et minimum utilisés pour l'isolement des colonies

	Milieu minimum	Milieu complexe
Glucose	1,0	100,0
(NH₄)₂SO₄	1,0	40,0
Extrait de levure		1,0
K₂HPO₄	7,0	3,0
KH₂PO₄	2,0	1,0
MgSO₄,7H₂O	0,1	0,4
FeSO₄	5,0	5,0
MnSO₄	5,0	5,0
CaCO₃		50,0
Citrate de sodium	0,4	
Thiamine		2.10 ⁻⁴
Biotine		3.10 ⁻⁴
Agar	25	20
pH	7,5	7,5

Le milieu minimum est réparti en trente (30) flacons dont vingt-neuf (29) sont additionnés des acides aminés à raison de 100 µg/ml d'eau distillée (soit 1, 2, 3, 4 ou 5 acides aminés).

➤ **1 seul acide aminé**

Valine, Histidine, Alanine, Méthionine, Isoleucine, Thréonine, Glutamine, Arginine et on a fait les combinaisons suivantes :

➤ **2 acides aminés**

- Isoleucine + Valine ;
- Isoleucine + Thréonine ;
- Isoleucine + Méthionine ;

- Isoleucine + Alanine ;
- Thréonine + Alanine ;
- Thréonine + Méthionine ;
- Thréonine + Valine ;
- Méthionine + Alanine ;
- Méthionine + Valine ;
- Valine + Alanine.

➤ **3 acides aminés**

- Thréonine + Méthionine + Alanine ;
- Thréonine + Méthionine + Valine ;
- Thréonine + Méthionine + Isoleucine ;
- Méthionine + Valine + Alanine ;
- Méthionine + Valine + Isoleucine ;
- Valine + Isoleucine + Alanine.

➤ **4 acides aminés**

- Thréonine + Méthionine + Valine + Isoleucine ;
- Thréonine + Méthionine + Alanine + Valine ;
- Méthionine + Valine + Isoleucine + Alanine.

➤ **5 acides aminés**

- Thréonine + Méthionine + Valine + Isoleucine + Alanine.

Le dernier flacon reste libre des acides aminés. On autoclave les milieux à 121°C pendant 1 heure.

A l'aide d'un cercle en fer plein (dont la base ayant le même diamètre que la boîte de Pétri) remplis de sable et recouvert de velours stérilisé, on a fait des empreintes sur les boîtes contenant les différents milieux à partir de la boîte pour laquelle on a effectué la méthode des matrices, puis on a incubé à 28°C pendant 24 heures.

La réplication sur boîtes est particulièrement utilisée pour l'isolement et la sélection des mutants auxotrophes (Davids et *al.*, 1990 ; Guiraud, 1993 ; Birge, 1994 ; Nicklin et *al.*, 2000).

Quand une colonie de la boîte mère ne se trouve pas sur la boîte répliquée, on suppose qu'elle dérive d'un auxotrophe (Birge, 1994 ; Singleton, 1999).

La comparaison des boîtes initiales avec celles des différents milieux permet de repérer sur les boîtes de départ, les colonies auxotrophes qui apparaissent soit sur le milieu complexe soit sur le milieu minimum additionné d'un, de deux, de trois, de quatre ou de cinq acides aminés.

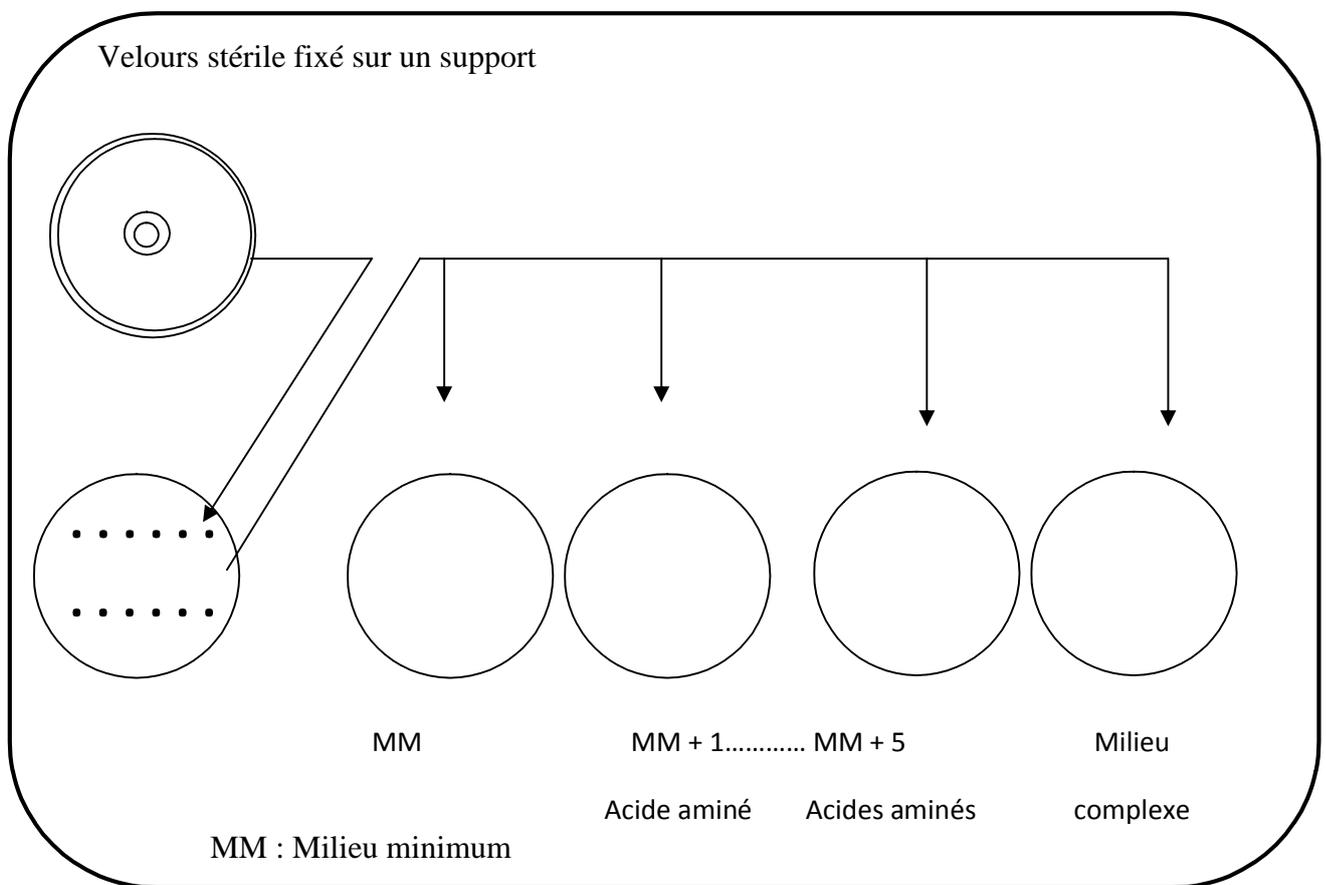


Figure n°18: Schéma de la méthode de répliquat (NICKIN et *al.*, 2000)

Les colonies supposées être des mutants vont être ensemencées sur gélose inclinée (TSA) et incubée à 28°C pendant 24 heures pour les stabiliser.

Le schéma suivant explique la stabilisation des mutants sur gélose inclinée.

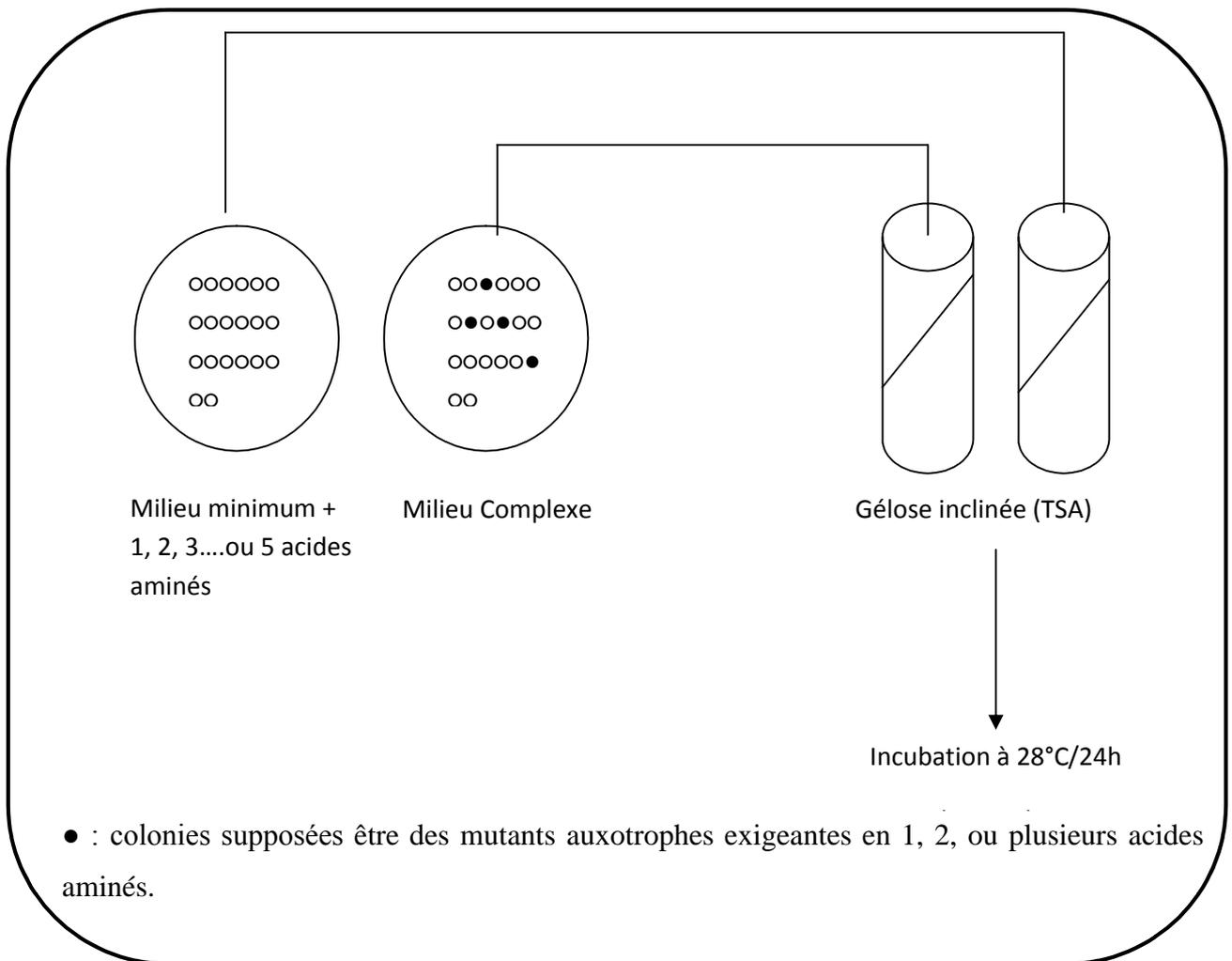


Figure n°19: Schéma explicatif de la stabilisation des mutants

III. Mise en évidence de la production des acides aminés par les mutants obtenus

De nouvelles cultures sont préparées avec les mutants obtenus en utilisant des milieux de fermentation appropriés en prenant en considération l'auxotrophie ou les auxotrophies des mutants sélectionnés.

Les milieux de fermentation sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau n°13: Composition des milieux de fermentation + 1 seul acide aminé

		Milieu de fermentation plus :			
Acides aminés		Valine	Alanine	Thréonine	Méthionine
Mutants					
Valine⁽⁻⁾		400 mg/l			
Alanine⁽⁻⁾			400 mg/l		
Thréonine⁽⁻⁾				400 mg/l	
Méthionine⁽⁻⁾					400 mg/l

Tableau n°14: Composition des milieux de fermentation + 2 acides aminés

		Milieu de fermentation plus :							
Acides aminés		Isoleucine	Isoleucine	Isoleucine	Thréonine	Thréonine	Thréonine	Méthionine	Valine
Mutants		+	+	+	+	+	+	+	+
		Thréonine	Alanine	Valine	Alanine	Méthionine	Valine	Alanine	Thréonine
Isoleucine⁽⁻⁾		400 mg/l							
Thréonine⁽⁻⁾		400 mg/l							
Isoleucine⁽⁻⁾			400 mg/l						
Alanine⁽⁻⁾			400 mg/l						
Isoleucine⁽⁻⁾				400 mg/l					
Valine⁽⁻⁾				400 mg/l					
Thréonine⁽⁻⁾					400 mg/l				
Alanine⁽⁻⁾					400 mg/l				
Thréonine⁽⁻⁾						400 mg/l			
Méthionine⁽⁻⁾						400 mg/l			
Thréonine⁽⁻⁾							400 mg/l		
Valine⁽⁻⁾							400 mg/l		
Méthionine⁽⁻⁾								400 mg/l	
Alanine⁽⁻⁾								400 mg/l	
Valine⁽⁻⁾									400 mg/l
Thréonine⁽⁻⁾									400 mg/l

Tableau n°15: Composition des milieux de fermentation + 3, 4, 5 acides aminés

		Milieu de fermentation plus :				
Acides aminés	Thréonine + Méthionine+ Alanine	Thréonine + Méthionine+ Valine	Méthionine+ Valine + Isoleucine	Thréonine + Méthionine + Valine + Isoleucine	Thréonine + Valine + Isoleucine + Alanine	Thréonine + Méthionine + Valine + Isoleucine + Alanine
Mutants						
Thréonine⁽⁻⁾	400 mg/l					
Méthionin⁽⁻⁾	400 mg/l					
et Alanine⁽⁻⁾	400 mg/l					
Thréonine⁽⁻⁾		400 mg/l				
Méthionine⁽⁻⁾		400 mg/l				
et Valine⁽⁻⁾		400 mg/l				
Méthionine⁽⁻⁾			400 mg/l			
Valine⁽⁻⁾			400 mg/l			
et Isoleucine⁽⁻⁾			400 mg/l			
Thréonine⁽⁻⁾				400 mg/l		
Méthionine⁽⁻⁾				400 mg/l		
Valine⁽⁻⁾				400 mg/l		
et Isoleucine⁽⁻⁾				400 mg/l		
Thréonine⁽⁻⁾					400 mg/l	
Valine⁽⁻⁾					400 mg/l	
Isoleucine⁽⁻⁾					400 mg/l	
et Alanine⁽⁻⁾					400 mg/l	
Thréonine⁽⁻⁾						400 mg/l
Méthionine⁽⁻⁾						400 mg/l
Valine⁽⁻⁾						400 mg/l
Isoleucine⁽⁻⁾						400 mg/l
et Alanine⁽⁻⁾						400 mg/l

La composition du milieu de fermentation est la suivante (Nakayama, 1982)

Glucose	10 %	
(NH₄)₂SO₄	02 %	
L-Thréonine	400 mg/l	
Biotine	30 µg/l	pH 7,5
K₂HPO₄	0,1 %	
MgSO₄ 7H₂O	0,03 %	
CaCO₃	2 %	

La L-Thréonine est remplacée à chaque fois par le ou les acides aminés pour lesquels on veut vérifier l'auxotrophie.

Après incubation sur shaker à 30°C pendant 96 heures, on centrifuge à 6000 tr/mn pendant 15 mn.

Les surnageants vont servir à la mise en évidence de la production des acides aminés par les auxotrophes obtenus, par les tests de la chromatographie sur couche mince (CCM) (Kinoshita, 1959 ; Su et Yamada, 1960) en utilisant les acides aminés témoins suivants :

Valine, Méthionine, Thréonine, Lysine, Alanine, Histidine, Arginine, Glutamine, Leucine et Isoleucine à une concentration de 5g/l (Sano et Shiio, 1967 ; Kinoshita, 1985).

La phase mobile est constituée de : (Su et Yamada, 1960) :

n butanol	8 volumes
Acide Acétique	2 volumes
Eau distillée	2 volumes

La phase stationnaire est constituée de gel de silice fixé sur une plaque de verre. La révélation des spots est effectuée par pulvérisation d'un réactif à la ninhydrine (Audigié et *al.*, 1978 ; Othmer, 1984).

La solution de révélation est constituée de :

Ninhydrine 0,3% dans du n butanol acide acétique

Acide acétique 3%

La révélation se fait à 30°C après pulvérisation de la ninhydrine (Su et Yamada, 1960).

IV. Calcul des taux de croissance des souches mutées et sauvages

L'estimation des taux de croissance des souches mutées et sauvages nous donne une idée sur l'influence de la mutation sur la croissance des deux souches ainsi que sur la consommation du glucose lors de la production de métabolites (lysine).

Pour pouvoir aboutir à ces résultats, nous avons effectué des fermentations en utilisant la souche mutée et la souche sauvage, et nous avons procédé aux dosages suivants :

- Dosage du glucose ;
- Dosage de lysine ;
- Détermination de la biomasse par turbidimétrie et par la méthode du poids sec.

Les différents dosages seront effectués au cours de culture des souches mutées et sauvages qui serontensemencées sur un milieu liquide de fermentation.

La composition du milieu à pH=7,3 est la suivante :

KH₂PO₄	0, 50%
MgSO₄, 7H₂O	0, 04%
FeSO₄	0, 03%
MnSO₄	0, 01%
NH₄Cl	0, 80%
Citrate	0, 40 %
Biotine	20 mg/l
Thiamine	2 mg/l
CaCl₂	50 mg/l
Glucose	500 mmole
Thréonine+Méthionine	500 mg/l

Ce milieu est autoclavé à 121°C pendant une heure.

Un fragment de chaque colonie est introduit dans 100 ml du milieu de fermentation puis incubé à 30°C pendant une heure.

Ces inoculas vont servir à ensemencer un erlen de 300 ml, la culture est effectuée sur shaker à 30°C à 220 trs/min pendant 72 heures.

Des prélèvements de 12 ml sont effectués chaque 2 heures 30 min afin de réaliser le dosage de glucose et de la lysine ainsi que la détermination de la concentration en biomasse par la mesure du poids sec et par la turbidimétrie.

IV.1. Détermination de la concentration en biomasse

La concentration en biomasse est obtenue par mesure de la densité optique à 650 nm (turbidimétrie) et par la méthode des poids secs (Delaunay *et al.*, 2001).

IV.1.1. Par la détermination du poids

Pour déterminer le poids sec en cellule, un prélèvement de 10 ml de chaque souche (sauvage et mutée) est centrifugé à 7000 trs/min pendant 5 minutes, le culot est alors lavé deux fois à l'eau distillée et centrifugé dans les mêmes conditions.

L'obtention du poids sec est effectuée par passage du culot dans une étuve à 105°C pendant 4 heures et la détermination du poids sec se fait par pesée.

Le pourcentage de matière sèche est estimé comme suit :

Soit: X_1 = le poids de la tare

X_2 = le poids de la tare + les sédiments après centrifugation à 7000 trs/min pendant 5 min.

X_3 = le poids de la tare + les sédiments séchés à 105°C pendant 4 heures.

Le pourcentage de la matière sèche est donné par la formule suivante :

$$\text{Matière sèche (\%)} = 100 - [(X_2 - X_3 / X_2 - X_1) \cdot 100]$$

IV.1.2. Par turbidimétrie

La densité optique est lue à 650 nm après une dilution au 1/100 dans l'eau distillée. A l'aide des valeurs de densité optique obtenues, on effectue la courbe de croissance de la bactérie.

Un étalonnage préalable du spectrophotomètre permet d'établir une corrélation entre la densité optique et la densité microbienne exprimé en g/l. Les échantillons sont dilués de façon

à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé (Boulkour, 2009), afin d'obtenir cette corrélation nous avons le protocole ci-après :

- 1- Faire une suspension de bactérie dans le même milieu que celui utilisé dans la fermentation (89 g/l) ;
- 2- Faire une série de dilutions (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}) dans des tubes à essai ;
- 3- Mesure de l'absorbance de chacune des dilutions avec un spectrophotomètre à 650 nm.

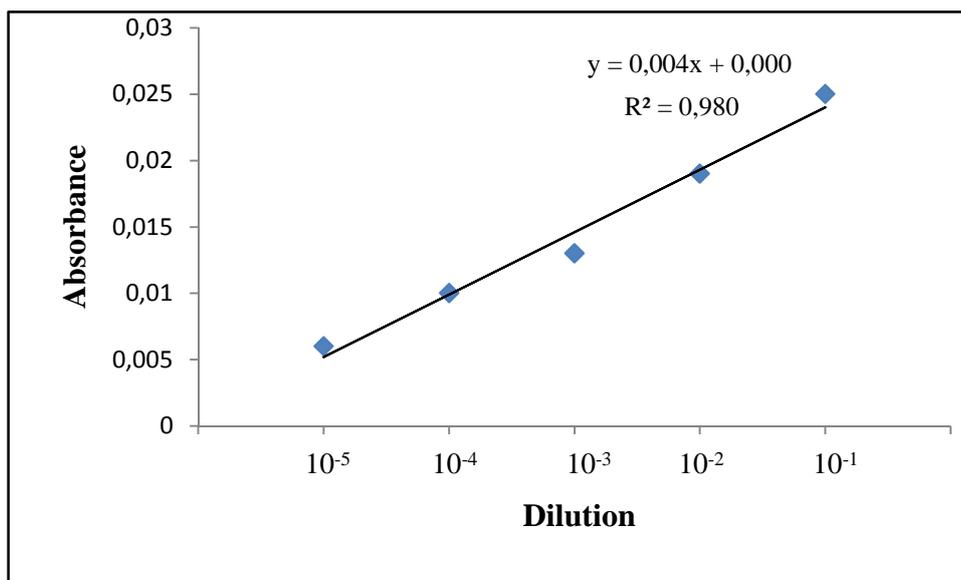


Figure n°20: Courbe d'étalonnage de turbidimétrie

IV.2. Dosage du glucose consommé au cours de la fermentation

La méthode « phénol-sulfuric acid » permet de déterminer la quantité de glucose restante dans le milieu (Dubois *et al.*, 1956).

Les oses sont dégradés, en présence d'acide sulfurique concentré, en composés de la famille des dérivés furfuriques. Les produits se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune orange.

Le protocole de dosage se fait comme suit :

Un volume de 1 ml de phénol à 5% (dans l'eau distillée) et 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 1 ml d'échantillon. Laisser reposer pendant 10 minutes à la température ambiante puis chauffer à 30°C pendant 20 minutes.

L'apparition de complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre 4054 UV/visible à 448 nm par rapport à une gamme

d'étalonnage établie avec une solution mère de glucose pour le dosage des sucres totaux dont le protocole est décrit comme suit :

- 1- Prendre cinq (5) erlenmeyers de 25ml dont un d'entre eux contient uniquement de l'eau distillée ;
- 2- Ajouter 1, 2, 3, 4g de glucose pour chaque erlenmeyer correspondant à la prescription ;
- 3- Ajuster le volume avec de l'eau distillée ;
- 4- Mesurer l'absorbance de chacune des solutions avec un spectrophotomètre à 448 nm.

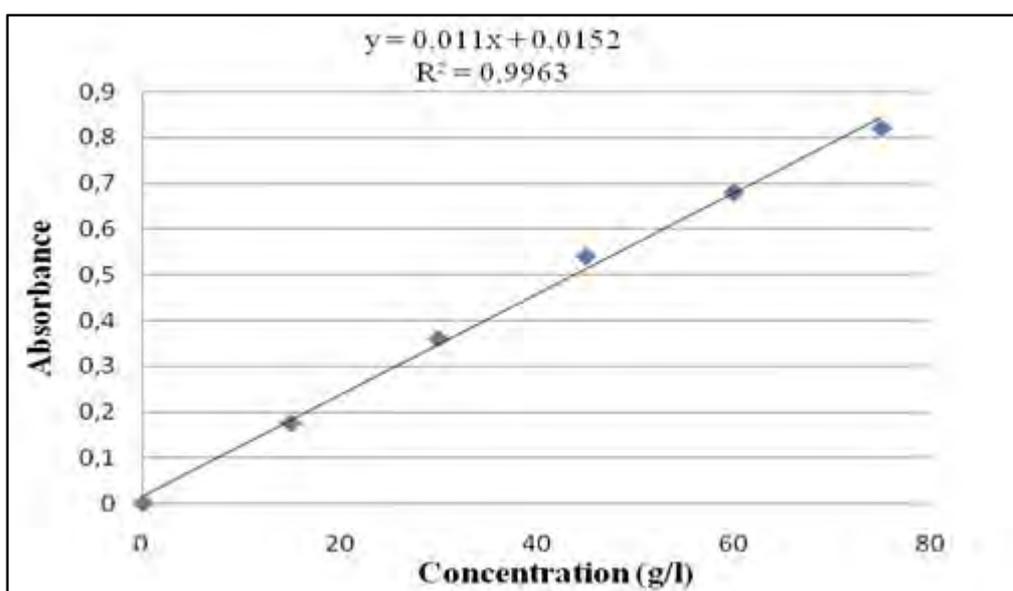


Figure n°21: Courbe d'étalonnage de glucose

IV.3. Dosage de la lysine produite par la souche mutée

La lysine est dosée par une méthode colorimétrique à la ninhydrine selon la méthode de Chinard (1952) dont le principe est le suivant :

Les acides aminés peuvent réagir avec la ninhydrine dans des conditions de $\text{pH} \geq 5$ pour donner un composé de couleur pourpre caractéristique, ayant une absorbance maximale à 470 nm (Lopez Del Castillo – Lozano, 2007).

IV.3.1. Préparation des solutions

A. Solution réactif

Chaque millilitre de la solution réactif contient :

- 0,4 ml d' H_3PO_4 6M ;
- 0,6 ml d'acide acétique ;
- 25 mg de ninhydrine sont ajoutés à chaque ml du mélange d'acide.

Le mélange d'acides plus ninhydrine est chauffé à 70°C pendant quelques minutes.

B. Préparation des solutions de blanc

➤ Solution de blanc 1

- 1 ml d'acide acétique ;
- 1 ml du mélange d'acides sans ninhydrine ;
- 1ml de la solution à analyser.

➤ Solution de blanc 2

- 1ml d'acide acétique ;
- 1ml du mélange d'acide plus ninhydrine ;
- 1ml d'eau distillée.

Les tubes sont agités puis chauffés à 100°C pendant une heure.

Chaque tube reçoit 1ml d'acide acétique avant qu'il ne soit refroidi en chambre froide.
Les volumes sont ajustés à 5,0 ml avec l'acide acétique.

C. Préparation de la solution à analyser

Le milieu de culture est centrifugé à 6000 trs/min pendant 10 min puis le surnageant est dilué, on prend ensuite les quantités suivantes ;

- 1ml de surnageant ;
- 1ml d'acide acétique ;
- 1ml du mélange d'acide plus ninhydrine.

Le mélange est chauffé à 100°C pendant une heure.

1 ml d'acide acétique est ajouté puis, le tout est, refroidi en chambre froide.

Après refroidissement le volume est ajusté à 5 ml avec l'acide acétique.

L'intensité de couleur formée est mesurée à 479 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

IV.3.2. Préparation de la courbe d'étalonnage

Une quantité de 250 mg de lysine sont dissous dans 25 ml d'eau distillée, puis 1; 2; 3; 4; et 5 ml de la solution de lysine sont mis dans des erlenmeyers de 250 ml, le volume est ajusté avec l'eau distillée.

A partir de chaque erlen meyer, on prend 1,0 ml que l'on place dans un erlen de 5.0 ml au quel on ajoute 1,0 ml d'acide acétique, 1,0 ml de solution réactif.

Après chauffage et addition d'acide acétique, refroidissement et addition d'acide acétique, on commence alors la mesure de l'absorbance à 479 nm et l'établissement de la courbe d'étalonnage.

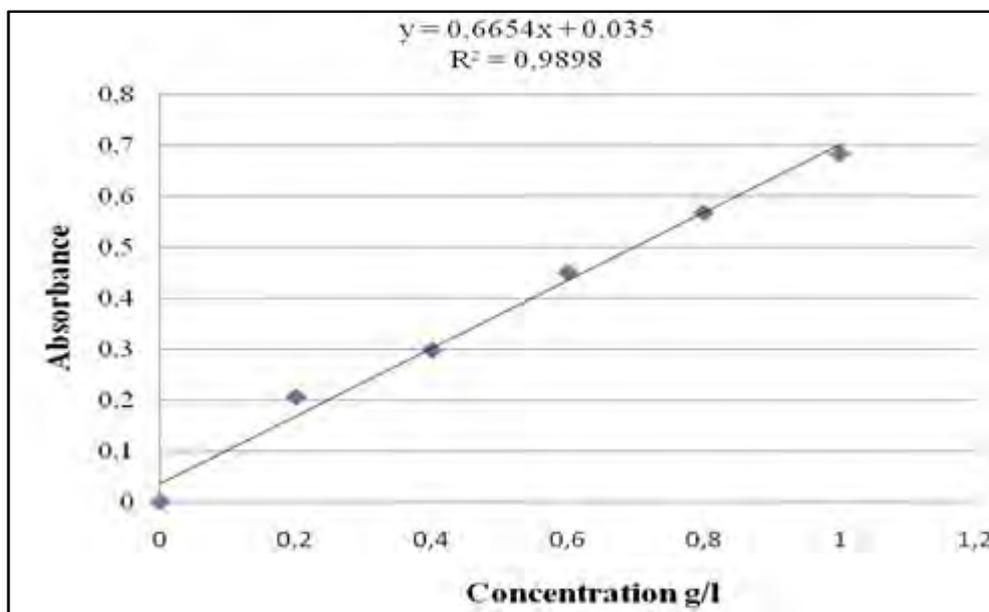


Figure n°22: Courbe d'étalonnage de la lysine

V. Etude de l'effet de la source de carbone sur la productivité en lysine et la croissance de la souche mutée

Afin d'évaluer l'effet des sources de carbone (Glucose, Saccharose) sur la croissance de la bactérie et la production de lysine, nous avons utilisé 2 milieux de culture dont composition de base est la suivante :

KH₂PO₄	0,50%
MgSO₄, 7H₂O	0,04%
FeSO₄	0,03%
MnSO₄	0,01%
NH₄Cl	0,80%
Citrate	0,40 %
Biotine	20 mg/l
Thiamine	2 mg/l
CaCl₂	50 mg/l
Thréonine + Méthionine	500 mg/l

Le milieu de fermentation va être additionné de deux sources de carbone à savoir, du glucose et du saccharose à raison de 30 g/l pour chacun des deux milieux.

Après ajustement du pH à 7,3, les milieux de fermentation vont être stérilisés à 121°C pendant 1h.

Des erlens de 200ml contenant les deux milieux de fermentation l'un avec le glucose et le second, avec le saccharose, vont êtreensemencé avec les inoculas puis incubés sur shaker à 30°C et 200rpm pendant 24 heures.

Des prélèvements de 12 ml sont effectués chaque 2h30 de fermentation pour le dosage de :

- La biomasse par la turbidimétrie ;
- La lysine par la méthode de CHINARD ;
- Le glucose – saccharose par la méthode de DUBOIS ;
- Le pH par le papier pH.

VI. Etude de l'influence de l'acétate sur la productivité en lysine ainsi que la croissance de la souche

VI.1. Préparation des milieux de culture

Afin d'évaluer l'effet de l'acide acétique sur la croissance de la bactérie et la production de la lysine, nous avons utilisé 4 milieux de culture dont la composition de base est la même que celle utilisée précédemment.

Les milieux de culture sont préparés comme suit :

❖ *Le 1^{er} milieu* {
-30 g/l Glucose ;
- (NH₄)₂SO₄ au moins de 10g/l.

❖ *Le 2^{ème} milieu* {
- 30g/l Glucose ;
- 7g/l Acétate d'ammonium ;
- (NH₄)₂SO₄ (de façon à avoir la même quantité d' NH₄).

❖ *Le 3^{ème} milieu* $\left\{ \begin{array}{l} -7\text{g/l Acétate d'ammonium ;} \\ - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (de façon à avoir la même quantité d' NH}_4\text{).} \end{array} \right.$

❖ *Le 4^{ème} milieu* : Avoir un milieu de culture avec plus d'acétate mais avec la même concentration d' NH_4 (mélange d'acétate d'ammonium avec d'autre sel d'acétate pour avoir une concentration d'ammonium comme dans les autres milieux).

Pour tamponner le pH à 7.3, nous prenons 6 à 7 g de PO_4 mais avec un mélange de $\text{KH}_2\text{PO}_4/ \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/3).

Autoclaver chaque milieu à 121°C pendant 20 minutes.

VI.2. Suivi de fermentation

Des prélèvements sont effectués à intervalle régulier (chaque 2 heures et demi), afin de suivre :

- L'évolution de la biomasse par turbidimétrie
- L'épuisement du glucose par la méthode de Dubois
- Le suivi de la production de lysine par la méthode de Chinard
- Le contrôle de la quantité d'acétate restant dans le milieu est dosé par méthode de titration à l'aide d'une solution d' NaOH à 0,1 molaire.

VII. Etude de l'influence de la pression osmotique sur la productivité en lysine et la viabilité des deux souches mutée et sauvage

L'objectif de notre travail est la contribution à l'étude de l'effet de la pression osmotique sur la croissance des deux souches, tout en réalisant une comparaison sur la consommation du glucose et la production de biomasse ainsi que de métabolites (lysine).

Nous avons utilisés 4 milieux de culture dont la composition du milieu de base est la même que celle utilisée précédemment.

Dans le **1^{er}** milieu, on ajoute :

- 30 g/l de glucose
- 0,5 g/l de NaCl

Pour les deux souches (sauvage et muté)

Dans le **2^{ème}** milieu, on ajoute :

- 30g/l de glucose
- 1g /l de NaCl

Pour les deux souches (sauvage et muté)

Dans le **3^{ème}** milieu, on ajoute :

- 30g/l de glucose
- 1,5g/l de NaCl

Pour les deux souches (sauvage et muté)

Dans le **4^{ème}** milieu, on ajoute :

- 30g/l de glucose
- 2g/l de NaCl

Pour les deux souches (sauvage et muté)

Ces milieux sont autoclavés à 121°C pendant une heure.

Un inoculum de chaque souche (sauvage et mutée) sert à ensemercer 100 ml du milieu de fermentation, la culture est effectuée sur Shaker à 30°C à 220 trs/min pendant 72 heures.

Des prélèvements de 12 ml sont effectués chaque 2 heures 30 min afin de réaliser le dosage de glucose et de la lysine ainsi que la détermination de la concentration en biomasse par la turbidimétrie.

VIII. Effets des quantités de thréonine et de méthionine sur la production de lysine et la croissance de la souche

VIII.1. Préparation des milieux de culture

Afin d'évaluer l'effet de thréonine et de méthionine sur la croissance de la bactérie et la production de la lysine, nous avons utilisé 5 milieux de culture dont la composition de base est la suivante :

Glucose	5,00%
KH₂PO₄	0,50%
MgSO₄, 7H₂O	0,04%
FeSO₄	0,03%
MnSO₄	0,01%
NH₄Cl	0,80%
Citrate	0,40 %
Biotine	20 mg/l
Thiamine	2 mg/l
CaCl₂	50mg/l

Les milieux de culture sont préparés comme suit :

❖ *Le 1^{er} milieu* { - 300 mg/l thréonine ;
- 200 mg/l méthionine.

❖ *Le 2^{ème} milieu* { - 150 mg/l thréonine ;
- 200 mg/l méthionine.

❖ *Le 3^{ème} milieu* { - 200 mg/l thréonine ;
- 75 mg/l méthionine.

❖ *Le 4^{ème} milieu* { - 200 mg/l thréonine ;
- 25 mg/l méthionine.

$$\text{❖ Le 5}^{\text{ème}} \text{ milieu} \left\{ \begin{array}{l} - 200 \text{ mg/l thréonine ;} \\ - 10 \text{ mg/l méthionine.} \end{array} \right.$$

Les milieux sont ajustés avant la stérilisation à **pH = 7** et autoclavés à 121°C pendant 1 heure.

VIII.2. Ensemencement du milieu et suivi de fermentation

Un fragment de colonie est introduit dans 50 ml du milieu de fermentation puis incubé à 30°C pendant une heure.

Cet inoculum va servir à ensemer 5 erlens de 200 ml, puis la culture est effectuée sur Shaker à 30°C à 220 trs/min pendant 72 heures.

Des prélèvements de 12 ml sont effectués à intervalle de 2^h 30 de fermentation pour le dosage de :

- La biomasse par la turbidimétrie et la méthode du poids sec ;
- La lysine par méthode de CHINARD ;
- Le glucose par la méthode de DUBOIS ;
- Le pH par le papier pH.

IX. Influences de l'ajout de lysine sur la productivité de la souche

Le but étant d'étudier l'effet inhibiteur de l'addition de lysine sur la productivité, c'est-à-dire l'étude du maximum de production de lysine par la souche auxotrophe ou la limite de production de la souche.

IX.1. Milieu de fermentation

Une série de milieu de culture a été préparé en prenant comme milieu de base celui utilisé précédemment. Ce milieu sera additionné de lysine à des concentrations différentes à savoir 0, 10, 20, 30, 40,50 g/l.

Ces milieux sont autoclavés à 121°C pendant une heure après ajustement du pH à 7,3.

100 ml du milieu auquel un fragment de la colonie est introduit puis incubé à 30°C pendant une heure.

Cet inoculum va servir à ensemer un erlen de 300ml, la culture est effectuée sur Shaker à 30°C à 220 rpm pendant 72 heures.

IX.2. Suivi de la fermentation

Tout au long de la fermentation, la consommation de glucose ainsi que l'estimation de la quantité de lysine présente dans le milieu sont suivis par des prélèvements de 12 ml effectués chaque 2heures 30 min.

Le glucose est dosé par la méthode de Dubois, alors que la quantité de lysine est estimée par la méthode de Chinard.

X. Calcul des flux métaboliques

Le calcul des flux métaboliques nécessitent la connaissance :

- de toutes les voies métaboliques (catabolique et anabolique) et de leur stoechiométries ;
- de la composition élémentaire d'une cellule ;
- des données cinétiques μ , q_s et v_p .

La représentation schématique du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum* fait apparaitre les flux de précurseurs destinés à la synthèse de biomasse et ceux destinés à la production de métabolites.

Les flux de précurseurs nécessaires à l'anabolisme (mmol/g/h) sont obtenus par simple multiplication du taux de croissance μ (g/g/h) par la quantité en précurseurs (mmol/g).

Les besoins en précurseurs sont calculés à partir de la composition élémentaire d'une cellule de *C. glutamicum*. Cela implique une parfaite connaissance des voies métaboliques de biosynthèse des macromolécules (protéines, RNA, DNA...) et des monomères composants ces macromolécules.

Les flux d'entrée des substrats dans le métabolisme central sont représentés par les vitesses spécifiques de consommation de substrat q_s (mmol/g/h). Les flux destinés à la production des métabolites excrétés sont représentés par les vitesses spécifiques de production v_p expérimentales (mmol/g/h). Les flux dans toutes les étapes entre les entrées et les sorties

peuvent être déterminés selon le principe de non accumulation. Tous les flux entrant au niveau d'un intermédiaire métabolique sont égaux aux flux sortant.

L'intérêt de ce type de calcul est double, d'un côté il permet d'établir un bilan énergétique entre l'énergie produite par le métabolisme et celle nécessaire à la biosynthèse cellulaire, de l'autre, il permet de suivre l'évolution du flux carboné au niveau d'une étape enzymatique en fonction des différentes conditions de fermentation. Il est donc possible de positionner les rendements de production des métabolites en fonction des valeurs théoriques possibles en respectant la structuration métabolique des souches utilisées et donc leur performance.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Sélection des souches isolées

La sélection des bactéries corynéformes peut-être réalisé par l'étude des caractéristiques morphologiques à savoir forme et disposition des bactéries, leur pouvoir à produire des acides aminés, principalement, l'acide glutamique dans des conditions d'aérobiose, de leur exigence en biotine, de leur pouvoir à se développer sur d'autres milieux de culture en plus du milieu TSA et des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Abe et *al.*,1967).

I.1. Caractéristiques morphologiques

En se basant sur les caractères morphologiques des colonies de corynéformes, établies par Abe et *al.* (1967), dont la couleur vire, généralement, du jaune au jaune pâle, rondes, lisses, brillantes et de tailles variables, on a pu sélectionner 289 colonies qui ont subi des tests de coloration de Gram.

Une seconde sélection basée sur la disposition des bactéries, sachant qu'elles apparaissent isolées, en paires mais aussi en masses irrégulières, généralement en forme de sphères ellipsoïdales ainsi que sous forme de petits bâtonnets arrondies à l'extrémité, en forme de massue, ou de courts bâtonnets avec des extrémités arrondies (Abe et *al.*, 1967;Kinoshita, 1985 et Eggeling et Bott 2005), en outre elles ont tendance à se disposer en "V" et a formé des lettres chinoises (Kinoshita, 1985), a permis d'isoler 20 souches dont la distribution est représentée dans le tableau suivant :

Tableau n°16 : Distribution des souches isolées dans les substrats utilisés

Source des échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre de colonies totales	Nombre de colonies de la première sélection	Nombre de colonies isolées
Excréments d'oiseaux (E)	1	344	92	4
Terre (T)	1	261	65	7
Lait (L)	1	154	87	6
Epinard (P)	1	128	45	3

Les 289 colonies sélectionnées ont donné un Gram positif, ce qui démontre l'effet de l'acide nalidixique utilisé comme inhibiteur de la croissance des bactéries Gram négatif.

Les 20 souches isolées ont donné sur le milieu TSA des colonies circulaires, lisses, brillantes et une odeur caractéristique, de plus elles ont tendance à se disposer en forme « V » et à former des lettres chinoises.

Par contre des différences, entre ces 20 souches, se situent au niveau de la couleur, de l'aspect des colonies ainsi que dans la morphologie cellulaire.

Les souches S_{1T}, S_{5T} et S_{7T} sont de couleur jaune foncé, par contre les souches S_{2T}, S_{3T}, S_{6T}, S_{1E}, S_{2E} et S_{2P} ont une couleur jaune pâle.

Les souches S_{5L}, S_{6L} et S_{3P} sont de couleur jaune-orangé foncé, alors que les souches S_{2L}, S_{3E}, et S_{4E} sont d'un blanc crémeux.

Les souches S_{4T}, S_{3L}, S_{4L} et S_{1P} sont de couleur beige claire par contre la souche S_{1L} a une couleur rose claire.

Ceci est conforme aux travaux d'Abe et *al.* (1967) qui ont pu isoler des colonies ayant des couleurs jaune à jaune pâle, quelques fois blanc crémeux ou rose et jaune profond, ainsi que les travaux de certains chercheurs qui ont pu isoler des colonies de corynébactéries présentant une pigmentation jaune orangée de type caroténoïdique (Pons et *al.*, 1993).

En outre, les souches S_{1L}, S_{4L} et S_{5L} ont un aspect visqueux alors que les autres souches isolées ne le sont pas. Ceci est conforme avec les travaux de Nagahama et *al.*, (1977) qui ont pu isoler des colonies de corynéformes ayant un aspect visqueux.

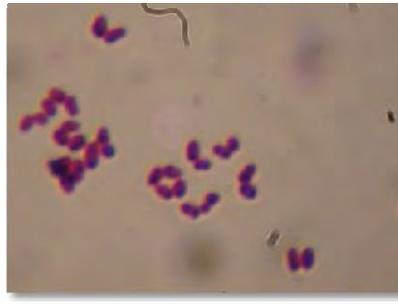


Figure n°23 : Coloration de Gram d'une des souches isolées

En ce qui concerne la morphologie cellulaire, il existe des différences entre les souches isolées. Les souches S_{1T}, S_{2E}, S_{1L}, S_{5L}, S_{6L} et S_{3P} sont de très petits bâtonnets à extrémité arrondie par contre les souches S_{7T}, S_{3E}, S_{4E} et S_{4L} sont de gros bâtonnets à extrémité arrondies et elles apparaissent vides au centre. Les souches S_{2L}, S_{3L}, S_{1P} et S_{2P} sont de petits bâtonnets avec des extrémités arrondies alors que les souches S_{2T}, S_{5T} et S_{1E} sont de petits ellipso-sphériques. Enfin, les souches S_{3T}, S_{4T} et S_{6T} sont de gros ellipso-sphériques.

I.2. Croissance sur divers milieux de culture

La culture des 20 souches sur les différents milieux a abouti aux résultats suivants :

Sur gélose nutritive et le milieu de Müller-Hinton où tous les microorganismes peuvent se développer, la croissance est modérée, les colonies sont petites, circulaires, jaune pâle, mates à légèrement brillantes tandis que sur la gélose au tellurite, il y a formation de colonies grises à noires due à la concentration de tellurite de potassium de 0,035% qui rend le milieu spécifique aux corynéformes (Pons et *al.*, 1993). Ce qui nous amène à dire que les bactéries corynéformes exigent des milieux de culture riche en nutriments.

Sur le milieu BCP lactosé, il y a formation de colonies bleues violacées. Cette couleur est spécifique aux bactéries lactose⁻, caractère particulier des corynébactéries (Su et Yamada, 1960 ; Abe et *al.*, 1967).

Par contre sur les milieux de Mc Conkey, de Rothe et BLBVB contenant la flore Gram +, il y a absence de croissance de toutes les souches isolées à l'exception de deux souches S_{1T} et S_{2T} qui se sont développées sur Mc Conkey, donc elles sont Gram- et sont à éliminer.

Sur le milieu de Sabouraud, la croissance est négative puisque ce milieu est spécifique aux levures, moisissures et champignons de la peau, de plus son pH est 6,3 (Merck, 1986) alors que les corynéformes exigent des pH neutres pour leur croissance (Pons et *al.*, 1993).

I.3. Mise en évidence de la production des acides aminés

Après purification des souches isolées par repiquage successifs sur le milieu TSA et culture sur milieu liquide selon Su et Yamada (1960), des chromatographies sur couche mince ont été effectuées afin d'estimer le pouvoir des souches isolées à produire des acides aminés dans les milieux de culture.

Les acides aminés produits par les souches isolées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau n°17 : Acides aminés produits par les souches sélectionnées dans les milieux

M₁ et M₂.

Milieux	Milieu M ₁	Milieu M ₂
S _{1T}	Acide glutamique	Pas de production
S _{2T}	Acide glutamique	Pas de production
S _{3T}	Acide glutamique	Pas de production
S _{4T}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{5T}	Acide glutamique Valine	Acide glutamique
S _{6T}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{7T}	Acide glutamique Valine	Acide glutamique
S _{1E}	Acide glutamique	Pas de production
S _{2E}	Acide glutamique	Pas de production
S _{3E}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{4E}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{1L}	Acide glutamique	Pas de production
S _{2L}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{3L}	Acide glutamique Valine	Pas de production
S _{4L}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{5L}	Acide glutamique	Acide glutamique
S _{6L}	Acide glutamique Valine	Pas de production
S _{1P}	Acide glutamique Valine	Acide glutamique
S _{2P}	Acide glutamique Valine	Acide glutamique
S _{3P}	Acide glutamique	Acide glutamique

Il s'en sort du tableau n°17, que toutes les souches, sélectionnées et cultivées sur le milieu M₁, ont développé une tache ayant le rapport frontal que l'acide glutamique pris comme témoin. De plus, les souches S_{5T}, S_{7T}, S_{3L}, S_{6L}, S_{1P} et S_{2P} ont développé une tache ayant le même rapport frontal que la valine.

L'acide glutamique est le donneur, par transamination, de groupements aminés dans la biosynthèse des autres acides aminés (Demain et Birnbaum, 1968 ; Lehninger, 1989), nous pouvons, donc, avancé que les souches isolées sont productrices d'acides aminés.

Dans le milieu M₂, ayant comme unique source d'azote l'urée, les souches, S_{1T}, S_{2T}, S_{3T}, S_{1E}, S_{2E}, S_{1L}, S_{3L} et S_{6L}, n'ont pas produit d'acides aminés dans leur surnageant car ces souches ne possèdent pas d'uréase étant

donné que la différence entre les milieux M₁ et M₂ réside dans le fait que le second milieu contient de l'urée et pas le premier.

I.4. Mise en évidence de l'exigence des bactéries corynéformes pour la biotine

L'exigence des bactéries isolées pour la biotine a été testée par l'utilisation de trois milieux de culture, l'un contenant, en plus, de l'extrait de levure, le second de la biotine, tandis que le troisième milieu ne contenant ni extrait de levure ni biotine.

Les résultats obtenus, après culture et centrifugation, montrent qu'il y a une très bonne croissance dans le milieu contenant de l'extrait de levure ainsi que dans le milieu contenant de la biotine mais une très faible croissance dans le milieu sans biotine ni extrait de levure (par comparaison des matières sèches des différents milieux).

Etant donné que l'extrait de levure est riche en biotine, en thiamine ainsi qu'en certains acides aminés, il est donc évident qu'il y a une bonne croissance des bactéries. Ceci nous amène à dire que les bactéries isolées exigent de la biotine pour leur croissance ce qui conforme avec les travaux d'Abe et *al.* (1967) et Plachy (1984).

I.5. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées

Les différents tests, physiologiques et biochimiques, appliqués sur les 18 souches isolées ont abouti aux résultats résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°18 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées

Test															Utilisation des sucres				Production de gaz à partir des hydrates de carbones	Indole	ADH.	LDC.	ODC.	TDA							
	Souches I solées	Culture à 20°C	Culture à 40 °C	Culture à pH = 4	Culture à pH = 10	Respiration	Mobilité	Sporulation	V.P	Rouge de méthyle	Uréase	H2S	Catalase	Oxydase	Citrate de Simmons	Glucose	Saccharose	Lactose							Mannitol						
S _{3T}	F	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	-	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
S _{4T}	F	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{5T}	Ab	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{6T}	Ab	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{7T}	F	Ab	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{1E}	Ab	Ab	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	-	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{2E}	Ab	F	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	-	+	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{3E}	Ab	F	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{4E}	Ab	Ab	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{1L}	Ab	F	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	-	-	-	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S _{2L}	Ab	F	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	-	+	-	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
S _{3L}	F	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	-	-	-	+	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
S _{4L}	Ab	F	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
S _{5L}	Ab	F	Ab	F	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S _{6L}	Ab	F	Ab	F	A.AF	-	-	-	-	-	+	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
S _{1P}	Ab	F	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S _{2P}	Ab	Ab	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
S _{3P}	Ab	F	Ab	Ab	A.AF	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F : Faible croissance.

A.AF : Aéro-anaérobie facultatif.

Ab : Absence de croissance.

± = Faible positif.

L'analyse des résultats des différents tests fait ressortir que toutes les souches isolées se développent, faiblement, aux températures de 20°C et 40°C, ainsi que dans des milieux acides (pH 4) et basique (pH 10). Ce qui confirme que les souches isolées sont mésophiles et exigent des milieux neutres ou légèrement alcalins pour leur croissance optimale.

De plus, elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives, immobiles et asporulées. Ces résultats sont analogues à ceux établis par Su et Yamada (1960).

Les souches S_{4T}, S_{5T}, S_{6T}, S_{7T}, S_{3E}, S_{4E}, S_{4L}, S_{5L}, S_{1P}, S_{2P} et S_{3P} ont eu le test de rouge de méthyle positif et celui de la mise en évidence de l'acétoïne (VP) négatif, de plus elles ont une uréase positive. Résultats identiques aux caractéristiques de la plus part des souches isolées par Abe et *al.* (1967). Contrairement aux souches S_{3T}, S_{1E} et S_{2E} qui ont, aussi, un rouge de méthyle positif et un VP négatif mais ne possèdent pas d'uréase, identiques à la souche *Corynebacterium callunae* NRRL B2244 isolée par Abe et *al.* (1967) ainsi qu'à la souche C-8 mise à jour par Nagahama et *al.* (1977).

Par contre, les souches S_{1L}, S_{3L}, S_{6L} et S_{2L} ont un rouge de méthyle négatif ainsi qu'un VP négatif, de plus les trois premières souches ont une uréase négative, caractéristiques identiques à celles de *Brevibacterium alanicum* établies par Abe et *al.* (1967), contrairement à la dernière souche qui a une uréase positive semblable à la souche n° 1627 isolée par Su et Yamada en 1960.

L'activité uréasique est une caractéristique très importante en relation avec la source d'azote ainsi que le contrôle du pH dans le cas de la production d'acide glutamique et elle a été utilisée comme principal critère dans la classification des souches isolées en différents types (Abe et *al.*, 1967).

Les souches S_{4T}, S_{5T}, S_{6T}, S_{7T}, S_{3E}, S_{4E}, S_{2L}, S_{4L}, S_{5L}, S_{1P}, S_{2P} et S_{3P} ont une uréase positive contrairement aux souches S_{3T}, S_{1E}, S_{2E}, S_{1L}, S_{3L} et S_{6L} qui possèdent une uréase négative.

Ces dernières souches peuvent être classées soit dans le type 10, soit dans les types 11 ou 12 selon la classification d'Abe et *al.* (1967), car les microorganismes de ces types sont les seuls à avoir une activité uréasique négative.

Toutes les souches isolées n'ont pas produit d'H₂S à l'exception des trois souches S_{2E}, S_{6L} et S_{3P} qui l'ont produit fortement.

Ces trois souches sont analogues aux cinq souches établies par Abe et al. (1967) qui, seules, peuvent produire l'H₂S fortement et qui sont KY9559, KY9563, KY9564, KY9569 et KY9598.

Toutes les souches isolées ont une forte catalase, une des caractéristiques spécifiques du groupe de corynéformes (Guiraud et Galzy, 1980).

On a remarqué aussi une oxydase, faiblement positive, pour toutes les souches à l'exception des souches S_{2P} et S_{3P} qui ont une oxydase négative, caractère analogue à celui de la souche C-8 isolée par Nagahama et al. (1977).

Seules les souches S_{3L}, S_{4L} et S_{3P} ont utilisé le citrate comme seule source de carbone mais sans production de gaz possédant, donc, une citrate perméase alors que les autres souches sont incapables de se développer sur le milieu citrate de Simmons, résultat similaire à celui de la souche C-8.

Les 18 souches isolées utilisent facilement le glucose comme source de carbone, de même que le saccharose mais sans production de gaz sauf pour les souches S_{1L}, S_{2L} et S_{1P} qui n'utilisent ce dernier. Ces trois souches peuvent être classées parmi les souches appartenant aux types 6, 7, 8 ou parfois le 12 suivant la classification d'Abe et al.(1967).

Les souches sélectionnées n'ont pas utilisé le lactose, résultat analogue à celui de la souche n° 1627 isolée par Su et Yamada (1960) et les souches isolées par Abe et al.(1967).

Concernant le mannitol, les souches qui ont pu l'utiliser, sans production de gaz, peuvent être classées parmi les souches appartenant aux types 2, 4, 5 ou parfois le 7, selon la classification établie par Abe et al.(1967), caractéristique semblable à celle de la souche C-8. Par contre, les souches qui sont incapables d'utiliser le mannitol seront classées parmi les souches des autres types d'Abe et al., résultat similaire à celui de la souche n°1627 isolée par Su et Yamada en 1960.

Toutes les souches isolées ont le test de l'indole négatif à l'exception de la souche S_{2P} confirmant le fait qu'en général les corynébactéries ne possèdent pas de tryptophanase et incapables, donc, de dégrader le tryptophane. Résultat analogue à celui établi par Abe et *al.*(1967).

Concernant la souche S_{2P}, nous remarquons qu'elle possède le même caractère que les trois souches isolées par Su et Yamada (1960), *Brevibacterium erythrogenes*, *Brevibacterium flavum* et *Brevibacterium lipolyticum*, qui seules, peuvent produire de l'indole.

Le test TDA est négatif pour les 18 souches isolées, montrant donc que ces souches sont dépourvues du tryptophane désaminase capable de dégrader les acides aminés en produisant des acides et de l'ammoniac.

En outre, parmi les souches, il y en a 14 qui ne possèdent plus les enzymes de décarboxylation capables de dégrader les acides aminés. Ces résultats confirment la théorie de Kinoshita (1985) concernant les bactéries corynéformes qui possèdent, généralement, des activités de dégradation des acides aminés très faibles par rapport aux autres microorganismes. Tandis que les quatre souches restantes sont capables d'effectuer la décarboxylation car la souche S_{2L} possède une arginine dihydrolase en plus de la lysine décarboxylase alors que la souche S_{3L} possède une arginine dihydrolase plus une ornithine décarboxylase, par contre la souche S_{4L} possède, uniquement, une arginine dihydrolase et enfin la souche S_{6L}, seulement, une lysine décarboxylase.

On remarque que ce sont les souches, isolées du lait, qui possèdent des enzymes de décarboxylation pouvant expliquer le fait que ces souches sont capables d'utiliser les acides aminés comme source de carbone au lieu du lactose du lait qu'ils ne peuvent l'utiliser. Ce qui confirme la théorie de Shiio et Nakamori (1989) concernant certaines bactéries corynéformes qui sont capables d'utiliser quelques acides aminés comme source de carbone et/ou d'azote.

En allant plus loin, on peut, à partir de l'activité uréasique et de la production d'acide à partir du glucose, saccharose et mannitol, classer les 18 souches isolées dans les 12 types établies par Abe et *al.*(1967).

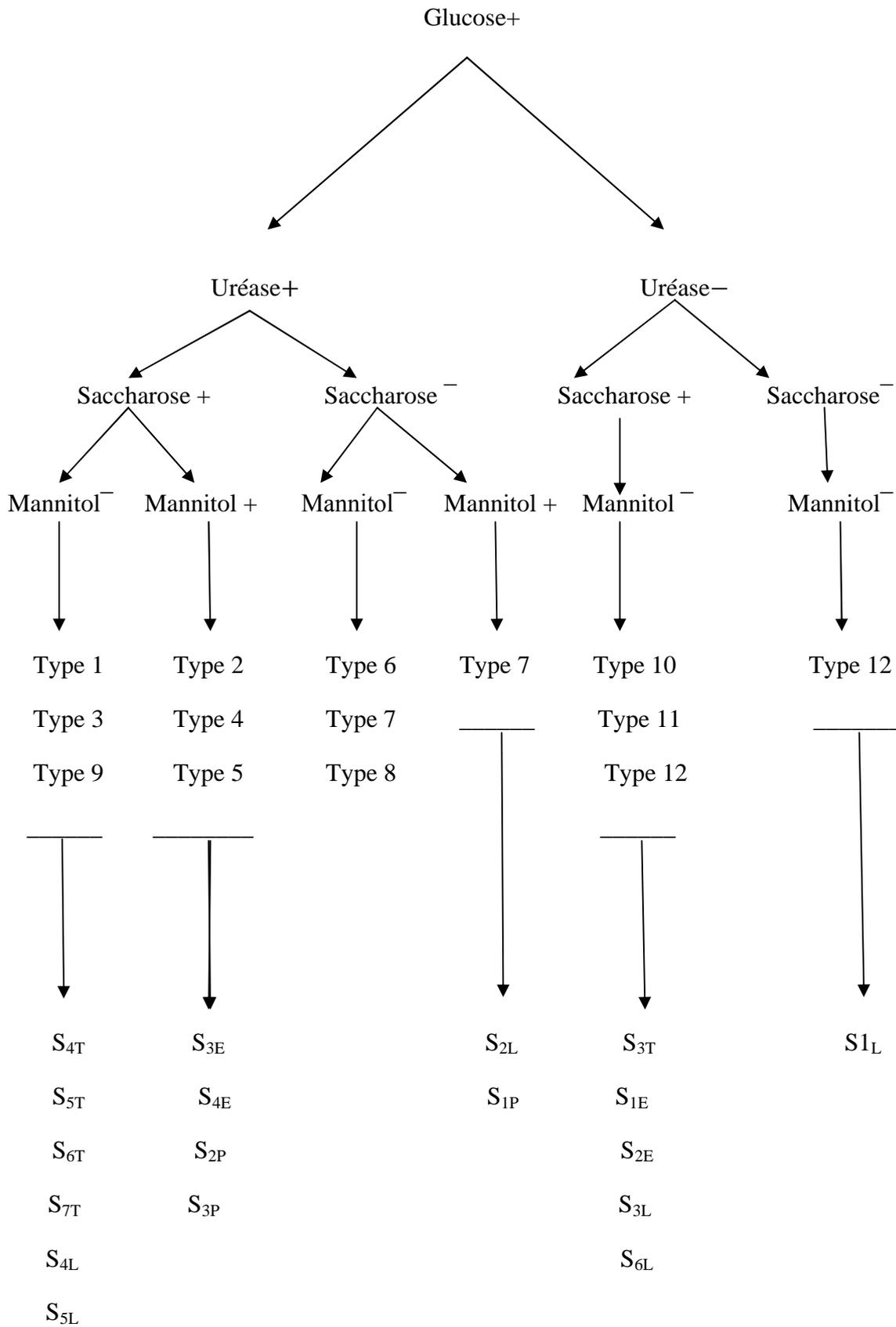


Figure n° 24: Classification des 18 souches isolées suivant Abe et al.(1967)

I.6. Test spécifique de *Brevibacterium*

L'identification rapide de *Brevibacterium* à l'aide de la potasse (Larpent, 1991) n'a donné aucun résultat, c'est-à-dire absence de la coloration rose-rouge, autrement dit les souches isolées ne sont pas du genre *Brevibacterium*.

En se basant sur la capacité de croissance et le profil de production des acides aminés, la souche isolée à partir des excréments d'oiseaux S_{3E} et faisant partie des types 1,3 et 9, selon Abe et *al.*, a été sélectionnée pour les études de mutation et de screening.

II. Mutation et sélection des mutants

Généralement, la production des métabolites par les microorganismes est contrôlée par des mécanismes de rétro-inhibition et de répression qui apparaissent en présence de quelques métabolites, spécialement les produits terminaux (Sano et Shii, 1967), en conséquence, la quantité de métabolites dans la cellule est maintenue à des taux très bas (Kinoshita, 1985 ; Flickinger et Drew, 1999).

Aussi, pour surproduire quelques métabolites, il est essentiel d'établir génétiquement ou physiologiquement des conditions dans lesquelles le contrôle n'est pas opérationnel (Shii et Nakamori, 1985 ; Delaunay et *al.*, 2001).

Le but de l'utilisation des mutants auxotrophes est la négation du mécanisme de rétro-inhibition par limitation de l'accumulation intracellulaire des rétro-inhibiteurs ou répresseurs (Kinoshita, 1985).

II.1. Résultats de la mutation

L'observation des colonies après la culture de la souche mutée sur le milieu solide a montré que les colonies sont de couleur jaune, blanche et parfois rose ce qui confirme que la souche a été mutée. La production des pigments est un indice de mutation (Abe et *al.*, 1967).

Après application de la méthode des matrices, on a eu un développement des mutants comme il est montré dans la figure suivante :

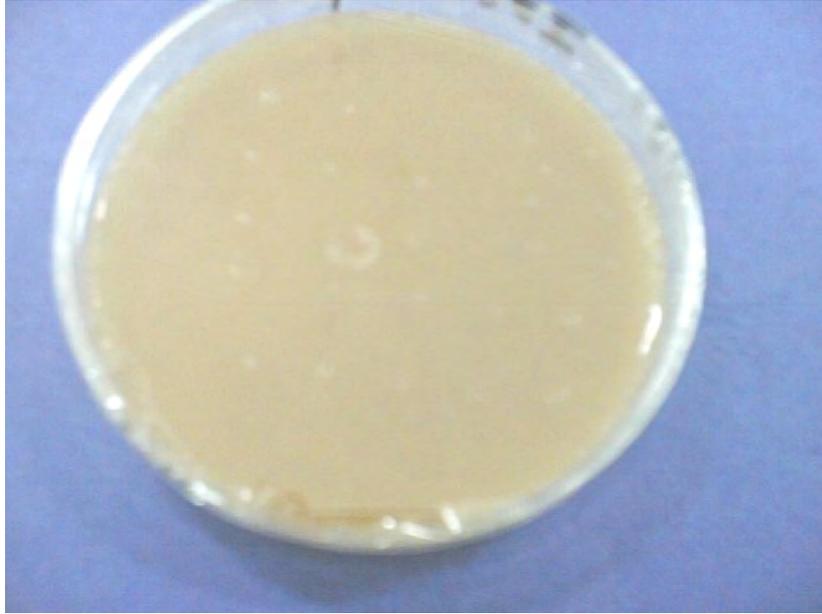


Figure n°25: Colonies des mutants obtenus après application de la méthode des Matrices

II-2- Analyse de la mutation

Le nombre de colonies mutantes pour les dilutions de chaque erlen est représenté dans le tableau n°19.

Tableau n°19 : Nombre de colonies des mutants pour les dilutions des trois erlens

Dilution	Numéro de la boîte	Erlen (1)	Erlen (2)	Erlen (3)
10⁻¹	1	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
	2	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
10⁻²	1	92	Indénombrable	Indénombrable
	2	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
10⁻³	1	126	Indénombrable	48
	2	Indénombrable	Indénombrable	51
10⁻⁴	1	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
	2	57	42	74
10⁻⁵	1	3	94	10
	2	2	116	8

Le nombre globale des colonies des mutants obtenu est de : 110.

II-2-1- Calcul de la fréquence de la totalité des mutants obtenus

La fréquence de mutation est calculée comme suit : (Cunin et *al.*, 1997).

$$\text{Fréquence} = \frac{\text{Nombre des mutants totaux}}{\text{Nombre des sauvages}}$$

Nombre des colonies sauvages = 612 colonies

Nombre des colonies mutantes = 110 colonies

$$\text{Fréquence des mutants totaux} = 110 / 612 = 0,1794$$

Ce nombre élevé de mutant est la conséquence de l'utilisation de l'EMS ; car ce dernier par le biais de l'addition, aux groupes méthyles, en différentes positions de bases provoquant en dehors de la phase de duplication l'apparition d'une grande fréquence de micro-délétions (Khachatourians, 1995).

Cette fréquence est un meilleur indice de l'effet du traitement mutagène (Neidhardt et *al.*, 1994).

II-2-1-2- Calcul de la fréquence des mutants auxotrophes

Sachant que le nombre moyen des mutants auxotrophes obtenu est de « 04 ».

La fréquence de mutants auxotrophes est calculée comme suit : (Cunin et *al.*, 1997).

$$\text{Fréquence des mutants auxotrophes} = \frac{\text{Nombre des mutants auxotrophes}}{\text{Nombre des sauvages}}$$

$$\text{Fréquence des mutants auxotrophes} = 4 / 612 = 0,0065$$

Donc la fréquence des mutants auxotrophes est de 0,0065 ; cela est du à l'action de l'EMS qui donne une grande fréquence de mutation en comparaison avec les autres agents mutagènes, comme le N-méthyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidine qui donne une fréquence de 0,00047. Cette fréquence est moindre quand le nombre de colonies sauvages est élevé. Les rayons donnent aussi une faible fréquence de mutation qui est de 0,0001 (Neidhardt et *al.*, 1994).

II-3- Criblage et sélection des mutants

Après traitement de la suspension bactérienne avec l'éthyl méthane sulfonate (EMS) à 0,05 M qui a pour avantage une fréquence élevée de mutation, une simplicité du traitement, provoquant aussi de nombreuses micro-délétions (Kinoshita, 1985 ; Neidhardt et *al.*, 1994 ; Cunin et *al.*, 1997).

Les colonies qui se sont développées sur milieu minimum plus l'un ou les acides aminés additionnés ainsi que sur milieu complexe, mais pas sur milieu minimum sont considérées comme étant des mutantes exigeantes en acides aminés car ne s'étant pas développées sur le milieu minimum alors qu'il y a croissance sur le milieu complexe (voir figures n°26, 27).

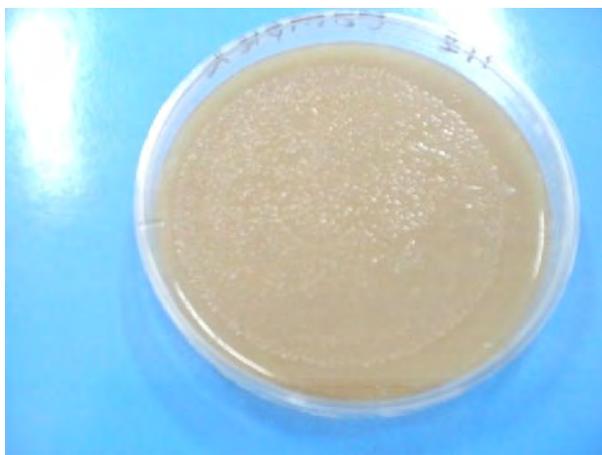


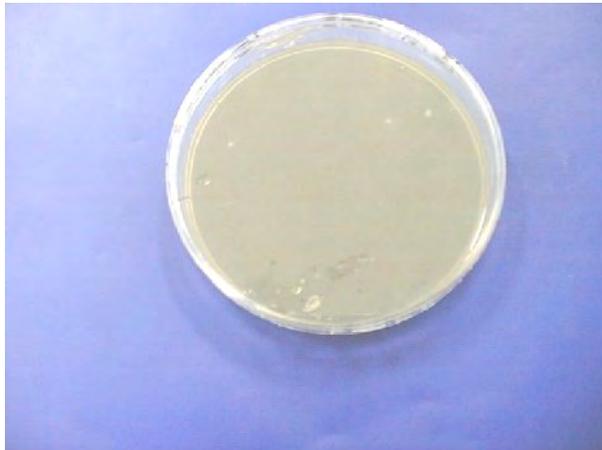
Figure n°26: Développement des mutants de *C.glutamicum* sur milieu complexe



Figure n°27 : Absence de colonies de mutants de *C.glutamicum* sur milieu minimum

Ceci nous amène à conclure que cette bactérie a besoin d'un ou plusieurs facteurs de croissance pour se développer dans le milieu minimum plus un ou plusieurs acides aminés, nous pouvons donc avancer que les mutants obtenus sont auxotrophes vis-à-vis de ces acides aminés.

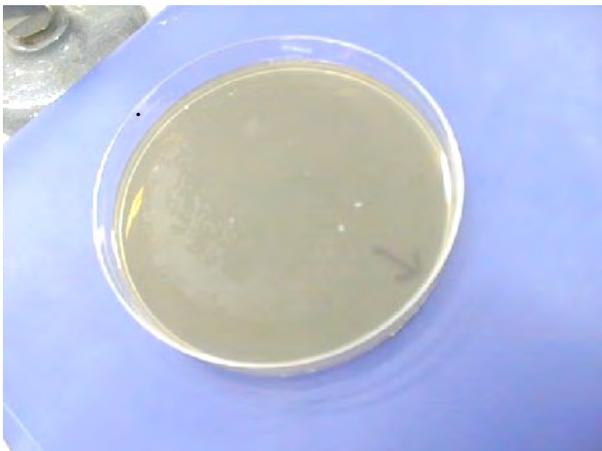
Après application de la méthode de LEDERBERG et LEDERBERG (1952), on a obtenu différents types de mutants auxotrophes, quelques-uns d'entre eux sont représentés dans la figure ci-dessus.



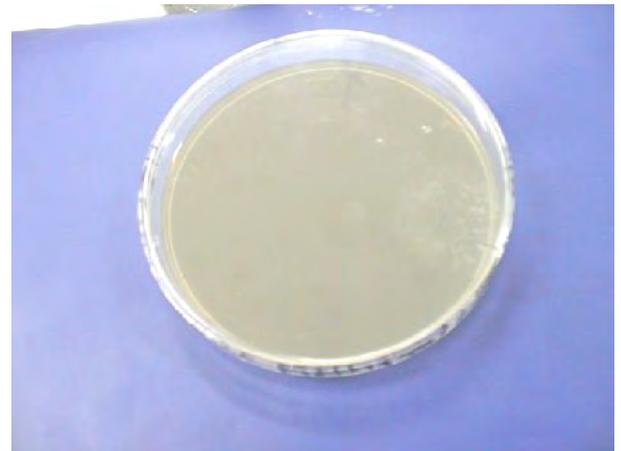
Milieu minimum+ thréonine+méthionine



Milieu minimum +méthionine



Milieu minimum +méthionine +alanine



**Milieu minimum + thréonine +
méthionine+valine +
isoleucine+alanine**

Figure n°28: Quelques types de mutants auxotrophes obtenus après induction par l'Ethyl Méthane Sulfonate (EMS)

Les différents mutants auxotrophes obtenus sont représentés dans le tableau n°20.

Tableau n° 20 : Résultats de la mutation et de la sélection

Milieu de culture		Croissance de la souche
Milieu complexe		+
Milieu minimum		-
Milieu minimum plus	Valine	(+)
	Histidine	-
	Alanine	(+)
	Méthionine	(+)
	Isoleucine	-
	Thréonine	(+)
	Glutamine	-
	Arginine	-
	Thréonine+ Alanine	(+)
	Thréonine+ Méthionine	(+)
	Thréonine+ Valine	(+)
	Isoleucine+ Thréonine	(+)
	Isoleucine+ Méthionine	-
	Isoleucine+ Alanine	(+)
	Isoleucine+ Valine	(+)
	Méthionine+ Alanine	(+)
	Méthionine+ Valine	-
	Valine+ Alanine	(+)
	Thréonine+ Méthionine+ Alanine	(+)

Thréonine+ Méthionine+ Valine	(+)
Thréonine+ Méthionine+ Isoleucine	-
Méthionine+ Valine+ Alanine	-
Méthionine+ Valine+ Isoleucine	(+)
Valine+ Isoleucine+ Alanine	-
Thréonine+ Méthionine+ Valine+ Isoleucine	(+)
Thréonine+ Méthionine+ Alanine+ Valine	-
Thréonine+ Valine+ Isoleucine+ Valine	(+)
Méthionine+ Valine+ Isoleucine+ Alanine	-
Thréonine+ Méthionine +Valine+Isoleucine + Alanine	(+)

+ : croissance, (+) : croissance des mutants, - : pas de croissance.

Les mutants auxotrophes obtenus à partir de la souche étudiée sont les suivantes :

- **Auxotrophes à un seul acide aminé**

- 1- Valine
- 2- Alanine
- 3- Méthionine
- 4- Thréonine

- **Auxotrophes à 2 acides aminés (Double auxotrophie)**

- 1- Thréonine + Alanine
- 2- Thréonine + Méthionine
- 3- Thréonine + Valine
- 4- Isoleucine + Thréonine
- 5- Isoleucine + Alanine
- 6- Isoleucine + Valine
- 7- Méthionine + Alanine
- 8- Valine + Alanine

- **Auxotrophes à 3 acides aminés (Triple auxotrophie)**

- 1- Thréonine + Méthionine+ Alanine
- 2- Thréonine + Méthionine + Valine
- 3- Méthionine + Valine+ Isoleucine

- **Auxotrophes à 4 acides aminés (Quatriple auxotrophie)**

- 1- Thréonine + Méthionine+ Valine+Isoleucine
- 2- Thréonine + Valine + Isoleucine + Alanine

- **Auxotrophes à 5 acides aminés**

- 1- Thréonine + Méthionine+ Valine+Isoleucine+Alanine

En comparant ces résultats avec ceux obtenus par Sano et Shiio (1967) en utilisant les rayons X (agent mutagène physique) aboutissant à l'obtention d'uniquement une seule colonie mutée sur 33.100 colonies testées et seulement deux (02) mutants homoserine⁽⁻⁾ sur 19.800 colonies testées, ceci est dû à la faible pénétration du rayonnement UV ce qui exige un volume limité de la suspension microbienne, exposé sous une faible épaisseur (pas plus de 1cm) et légèrement agitée (Guiraud, 1993).

Par contre nous avons trouvé dix-huit (18) mutants. Ce résultat est dû à l'action de l'EMS, qui crée à la fois des transitions, des transversions et surtout de nombreuses micro-délétions ce qui en fait un agent mutagène très intéressant pour les travaux à objectif industriel (Scriban, 1993).

La conséquence évidente d'une délétion est la perte d'une partie d'ADN. Comme cet ADN peut être récupéré par une mutation supplémentaire, les délétions sont des mutations qui, de façon caractéristique, ne peuvent reverser ni spontanément ni à la suite d'un traitement mutagène (Scriban, 1988 ; Neidhardt et *al.*, 1994). Les microdélétions intragéniques ne doivent pas être confondues avec les délétions ponctuelles car elles sont plus étendues donc plus difficilement réversibles (Guiraud, 1993).

Le résultat négatif sur boîte contenant le milieu minimum nous a confirmé la mutation. Il apparaît, en plus, que l'emplacement des mutants sur le milieu complexe et les milieux minimums plus les acides aminés est le même.

On peut conclure que les mutants qui se sont développés sur les deux milieux sont les mêmes. De plus, nous pouvons dire que si certaines des auxotrophies pouvaient avoir des origines communes, d'autres, par contre, impliqueraient plusieurs sites de mutation.

Le nombre de mutants obtenus par chaque type d'auxotrophe par rapport à un nombre de colonies de départ de 612 colonies est représenté dans le tableau suivant :

Tableau n°21 : Nombre de mutants obtenus pour chaque type d'auxotrophe

Auxotrophe à la :	Nombre de mutants (colonies mutantes)
Valine	5
Alanine	4
Méthionine	5
Thréonine	3
Thréonine, Alanine	6
Thréonine, Méthionine	4
Thréonine, Valine	4
Isoleucine, Thréonine	4
Isoleucine, Alanine	3
Isoleucine, Valine	4
Méthionine, Alanine	6
Valine, Alanine	5
Thréonine, Méthionine et Alanine	2
Thréonine, Méthionine et Valine	4
Méthionine, Valine et Isoleucine	2
Thréonine, Méthionine, Valine et Isoleucine	4
Thréonine, Méthionine, Isoleucine et Alanine	3
Thréonine, Méthionine, Valine, Isoleucine et Alanine	2

Ce qui montre que l'EMS donne une grande fréquence de mutation en comparaison avec les études de Sano et Shiio (1967) qui en utilisant duméthyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidine et sur un nombre de colonies évalué à 2.100, un seul mutant homosérine⁽⁻⁾ obtenu sur 15.000 colonies ; aucun mutant homosérine⁽⁻⁾ ; et en utilisant des rayons X, ils ont obtenu une seule colonie mutée sur 33.100 colonies testées et seulement deux (02) mutants homosérine⁽⁻⁾ sur 19.800 colonies testées.

Les mutants obtenus seront stabilisés sur gélose inclinée et nous procéderons ensuite à la mise en évidence des acides aminés incriminés dans la voie de biosynthèse.

III- Vérification des auxotrophies (Résultats des CCM)

III-1- Acide aminé produit par les mutants exigeants en valine

Un tel mutant a subi une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de la dihydroxyacide reductoisomerase responsable de la conversion de l' α -Aceto-lactate en α,β -dihydroxy-isovalerate qui sera converti en α -cetoisovalerate puis en valine (Hirose et *al.*, 1985 ; Sing et Shaner, 1995 ; Guillouet et *al.*, 1999).

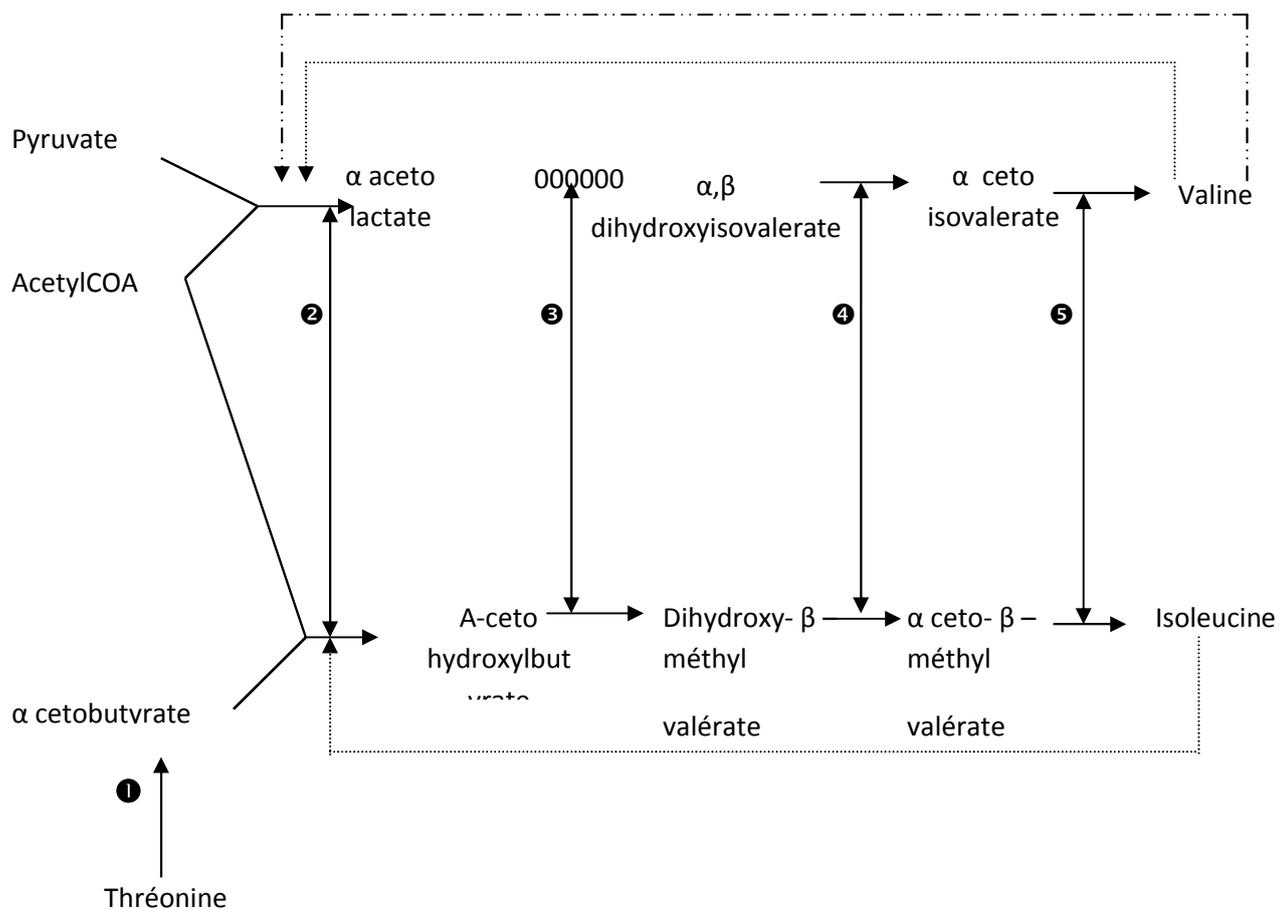
La levée de la rétro-inhibition et la repression exercées sur l'acétohydroxyacide synthetase par l'absence de la synthèse de la valine (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Sing et Shaner, 1995 ; Guillouet et *al.*, 1999), peut expliquer production de l'isoleucine.

Etant en présence d'une rétro-inhibition simple chaîne (valine), la présence de l'isoleucine seule n'exerce pas cette rétro-inhibition et tend à s'accumuler dans le milieu (Shimura, 1989).

L'addition de la valine au milieu n'exerce pas de régulation sur l'acétohydroxyacide synthetase car sa quantité est sub optimale, elle n'est nécessaire que pour assurer la croissance des bactéries (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Delaunay et *al.*, 2001). Un tel mutant de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en valine tend à produire l'isoleucine comme étant un produit final d'une voie préférentielle.

Les mutants valine⁽⁻⁾ ont provoqué l'apparition des spots ayant le même rapport frontal que l'Isoleucine.

Ceci est en analogie avec les résultats trouvés par Kinoshita (1985).



- ① : Thréonine déshydratase ; ② : Acétohydroxyacide synthétase
- ③ : Dihydroxyacide réductoisomérase ; ④ : Dihydroxyacide déshydratase
- ⑤ : Aminoacide transaminase.

.....▶ : Répression - - - - -▶ : Rétro-inhibition, OOO : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°29 : Régulation de la voie de biosynthèse de l'isoleucine chez un mutant exigeant en valine de *Corynebacterium glutamicum*

(Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999)

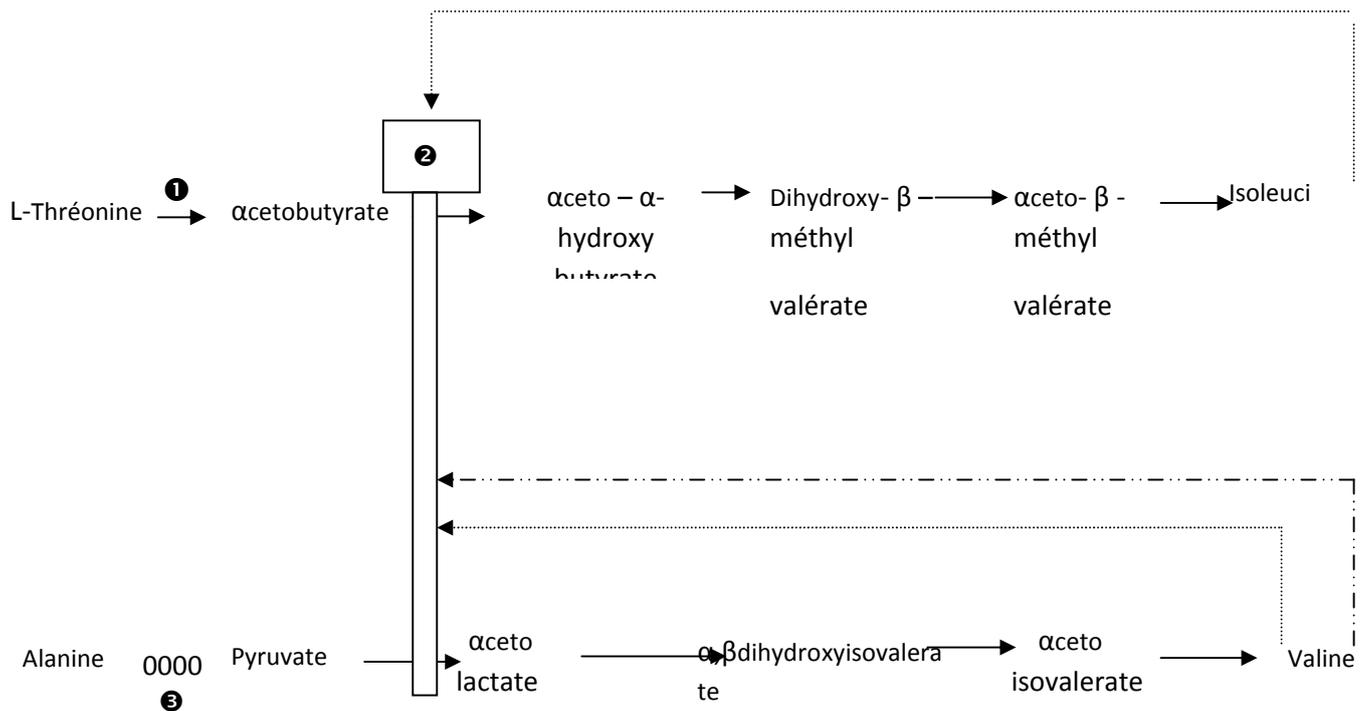
III-2- Acides aminés produits par les mutants exigeants en alanine

La mutation a eu lieu au niveau de la chaîne de biosynthèse et cela par une coupure au niveau de l'aminotransférase (l'alanine valine aminotransférase ou transaminase c) responsable de la conversion du pyruvate en alanine (Hermann et Somerville, 1983 ; Shimura, 1989) ; ce qui entraîne une inhibition de la production de la valine.

La levée de la rétro-inhibition et la répression exercées sur l'acétohydroxyacide synthétase et par l'absence de la synthèse de l'alanine (Sing et Shaner, 1995 ; Delaunay et *al.*, 2001), peut expliquer la surproduction de l'isoleucine.

Un tel mutant de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en alanine est un mutant capable de surproduire l'isoleucine.

Les mutants alanine⁽⁻⁾ ont provoqué l'apparition des spots ayant le même rapport frontal que l'isoleucine. Ces résultats se rapprochent de ceux de Nakayama (1982).



❶ : Thréonine déshydratase (Desaminase) ; ❷ : Acétohydroxyacide synthétase

❸ : Aminotransférase (Alanine-valine-aminotransférase ou Transaminase c).

.....▶ : Répression - - - - -▶ : Rétro-inhibition, 0000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°30: Régulation de la voie de biosynthèse de l'isoleucine chez un mutant exigeant en alanine de *Corynebacterium glutamicum*

(Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Delaunay et al., 2001)

III-3- Acides aminés produits par les mutants exigeants en méthionine

La mutation a provoqué une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de l'homoserine-O-dehydrogenase qui est responsable de la conversion de l'aspartate semi-aldéhyde en homoserine qui sera convertit en homocystéine par l'acetyl-homoserine sulfhydrase. L'homocystéine est par la suite convertit en méthionine par l'homocystéine méthylase complex (Hirose et *al.* 1985 ; Kinoshita, 1985, Glanemann et *al.*, 2003).

La levée de la rétro-inhibition exercée sur l'homoserine O-acetyl transferase et la répression exercée sur l'homoserine dehydrogenase par l'absence de la synthèse de la méthionine peuvent expliquer la production de la lysine (Flickinger et Drew, 1999; Guillouet et *al.*, 1999 ; Lynch, 2003). Et cela du fait de l'accumulation de l'aspartate.

La thréonine et la lysine exercent leur action sur l'aspartokinase première enzyme de la voie métabolique, l'activité de celle-ci est inhibée lorsque les deux acides aminés ont tendance à s'accumuler dans la cellule (Sasson, 1985).

Etant en présence d'une rétro-inhibition concentrée (lysine+thréonine), la présence de la lysine seule n'exerce pas cette rétro-inhibition et tend à s'accumuler dans le milieu.

Donc, un tel mutant de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en méthionine tend à surproduire la lysine dans le milieu de fermentation (Nakayama, 1982).

Les mutants méthionine⁽⁻⁾ donnent des spots ayant le même rapport frontal que celui de la lysine.

III-4- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine

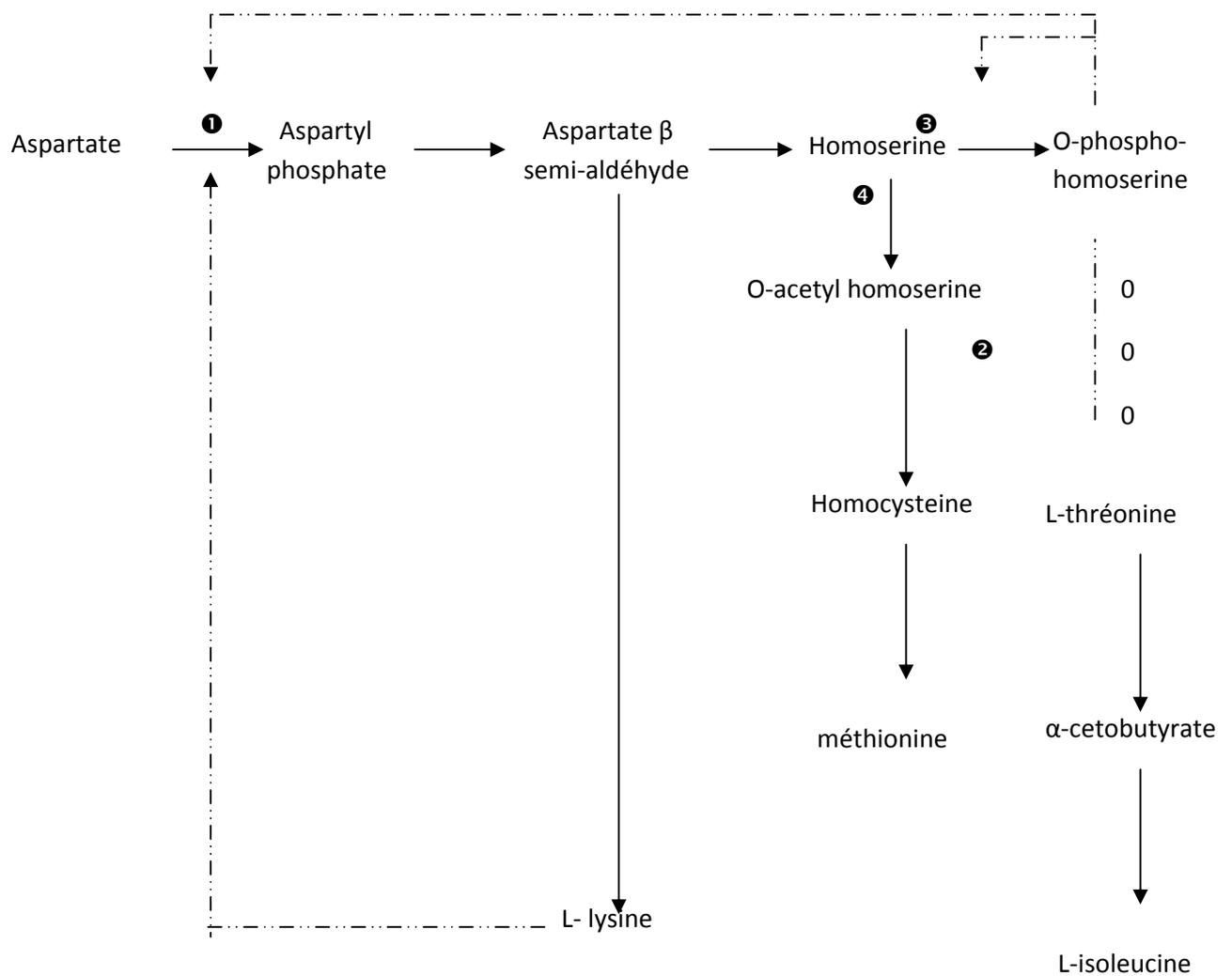
Un tel mutant a subi une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de la thréonine synthetase responsable de la conversion de l'O-phospho-homoserine en thréonine. (Demain, 1971 ; Kikuchi, 1980 ; Hirose et *al.* 1985 ; Glanemann et *al.*, 2003).

La levée d'une part de la rétro-inhibition exercée sur l'aspartokinase et d'autre part de celle de l'homoserine deshydrogenase par l'absence de la synthèse de la thréonine (Shiio, 1982 ; Delaunay et *al.*, 2001), peut expliquer la production de la lysine et la méthionine (Nakayama, 1982 ; Shimura, 1989). Celle-ci favorisée par l'accumulation de l'aspartate.

Etant en présence d'une rétro-inhibition concentrée (lysine + thréonine), la présence de la lysine seule n'exerce pas cette rétro-inhibition et tend à s'accumuler dans le milieu. La thréonine ajoutée au milieu n'exerce pas de régulation sur les deux enzymes car sa quantité est sub-optimale, elle n'est nécessaire que pour assurer la croissance des bactéries (Kikuchi, 1980 ; Lessard et Sinsky, 2003).

Un tel mutant de *Corynebacterium glutamicum* exigeant en thréonine tend à produire la lysine et la méthionine comme produits finaux d'une voie préférentielle. Ceci se rapproche aux résultats trouvés par Nakayama (1982) et Kinoshita (1985).

Les mutants thréonine⁽⁻⁾ ont provoqué l'apparition de spots ayant les mêmes rapports frontaux que ceux de la lysine et la méthionine.



❶ : Aspartokinase

❷ :Thréonine synthetase

❸ : Homoserine dehydrogenase.

❹ : Homoserine O-acetyl transferase

-----▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°32 : Régulation de la voie de biosynthèse de l'homoserine et la lysine chez un mutant exigeant en thréonine de *Corynebacterium glutamicum*

(Nakayama, 1972 ; 1982 ; Plachy, 1984 ; Lessad et Sinsky, 2003)

III-5- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾

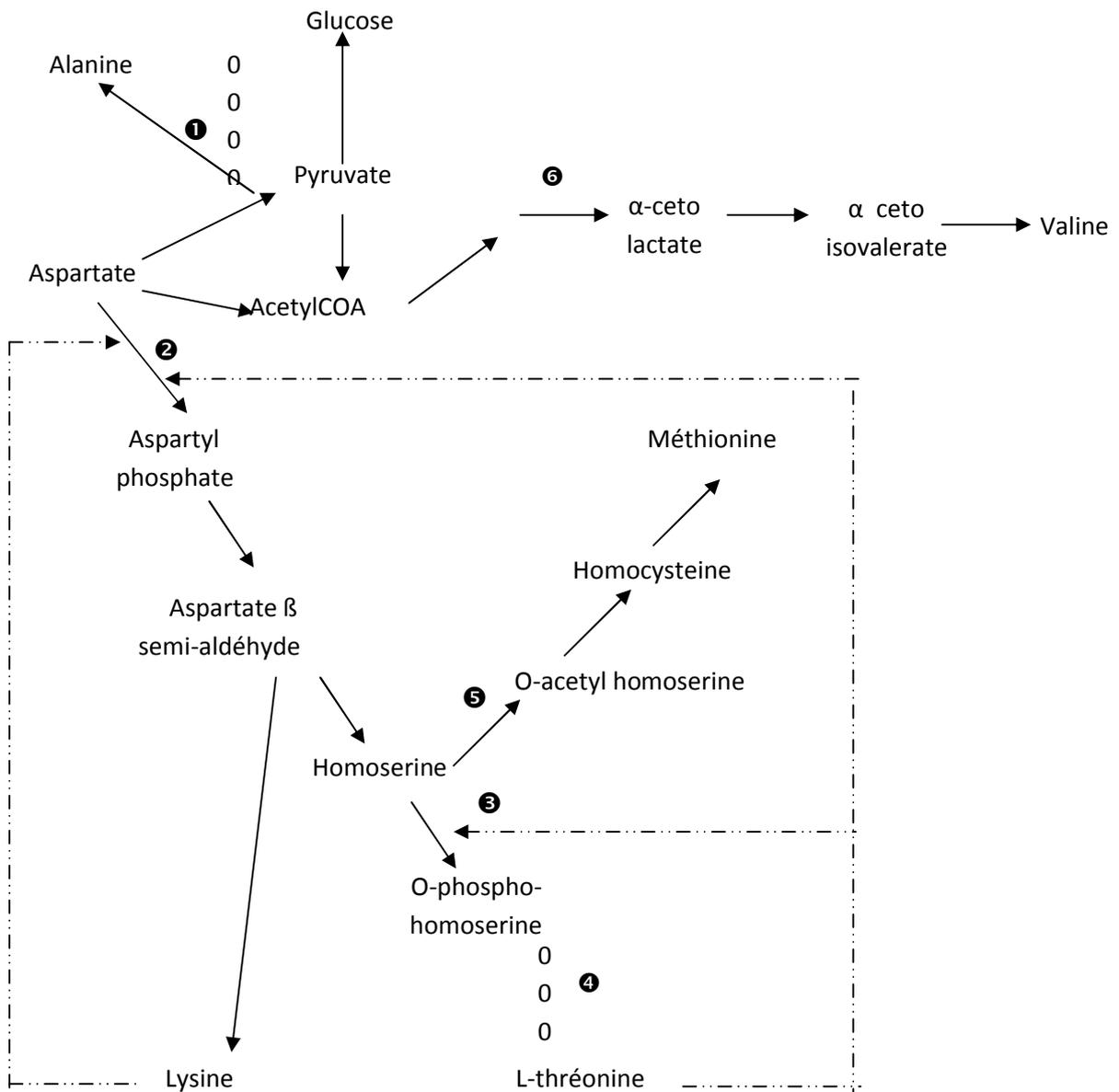
Un mutant double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ est un mutant qui a subi une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de la thréonine synthetase qui convertit l'O-phospho homoserine en L-thréonine et une 2^{ème} coupure au niveau de l'aminotransferase (Aspartate aminotransferase) responsable de la conversion du pyruvate en alanine (Shimura, 1989 ; Glanemann et *al.*, 2003 ; Lynch, 2003).

L'accumulation de la valine dans le surnageant est expliquée par la levée de la rétro-inhibition et la répression de l'acetoxyacide synthetase ou l'acetolactate synthetase (ALS) catalysant la réaction menant à cet acide aminé dérivant du pyruvate et cela par l'absence de la synthèse de l'alanine (Kikuchi, 1980 ; Nakayama, 1982 ; Sing et Shaner, 1995). Car l'activité de l'aminotransferase qui plus intense dans la conversion du pyruvate en alanine que celle de l'aspartokinase est dans ce cas inhibée.

Tandis que l'accumulation de la méthionine et la lysine est expliquée par la levée de la rétro-inhibition exercée sur l'homoserine O-acetyl transferase et l'aspartokinase ainsi que par l'absence de la synthèse de la thréonine.

Etant en présence d'une rétro-inhibition concentrée (lysine + thréonine), la présence de la lysine seule n'exerce pas cette rétro-inhibition et tend à s'accumuler dans le milieu, la thréonine ajoutée au milieu n'exerce pas de régulation sur les deux enzymes car sa quantité est subn-optimale, elle n'est nécessaire que pour assurer la croissance des bactéries (Nakayama et *al.*, 1961 ; Plachy, 1984 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Lessard et Sinsky, 2003).

On suppose qu'un mutant double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ tend à surproduire la valine, la méthionine et la lysine et sur la plaque de verre, on observe des spots ayant les mêmes rapports frontaux que ceux de la valine, méthionine et de la lysine.



① : Aspartate aminotransferase

② :Aspartokinase ;

③ : Homoserine dehydrogenase ;

④ : Threonine synthetase ;

⑤ : Homoserine O-acetyl transferase ;

⑥ : Acetohydroxyacide synthetase.

-----> Rétro-inhibition,

000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°33 : Régulation de la voie de biosynthèse de la valine, de la méthionine et de la lysine chez un mutant thréonine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ de *Corynebacterium glutamicum* (Nakayama, 1982 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Kinoshita, 1985 ; Lessard et Sinsky, 2003)

III-6- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe

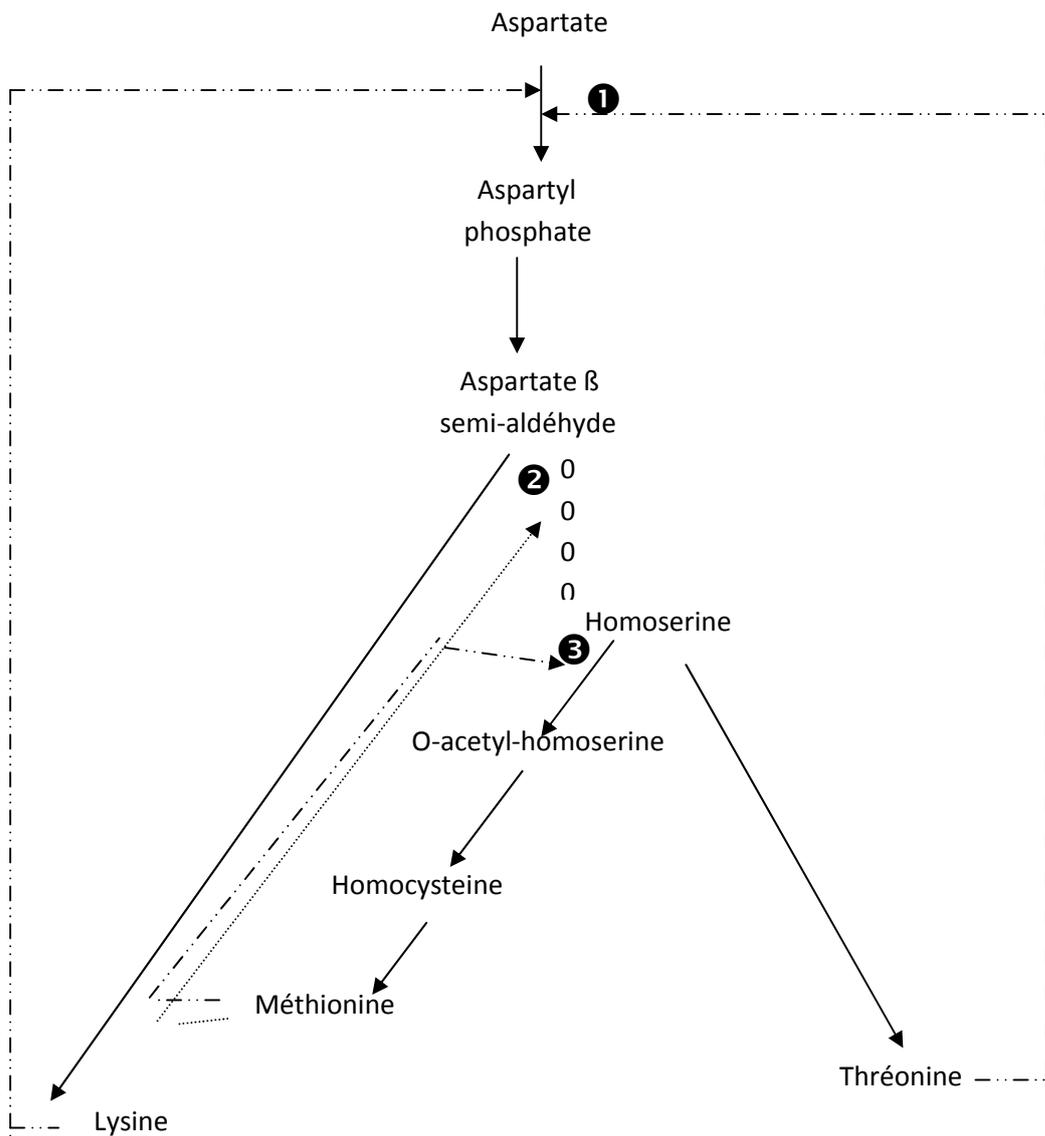
thréonine⁽⁻⁾, méthionine⁽⁻⁾

La coupure de la chaîne a eu lieu au niveau de l'homoserine dehydrogenase qui catalyse la réaction de transformation de l'aspartate semi-aldehyde en homoserine qui sera transformée en thréonine et en méthionine.

L'absence de la thréonine lève la rétro-inhibition exercée sur l'aspartokinase de même l'absence de la méthionine lève la rétro-inhibition sur l'homoserine O-acetyl transferase et la répression sur l'homoserine dehydrogenase, par conséquent la voie de biosynthèse s'oriente vers la production de la lysine comme produit fini de la voie préférentielle par rapport à l'homoserine (Demain, 1971 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Kinoshita, 1985 ; Flickinger et Drew, 1999 ; Lessard et Sinsky, 2003), car la totalité de l'aspartate sera alors transformée en lysine. Les qualités sub-optimales de la thréonine et de la méthionine ajoutées au milieu de fermentation font que le système de régulation ne soit pas opérationnel (Nakayama, 1982 ; Guiraud, 1993).

Ce mutant double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, méthionine⁽⁻⁾, tend à surproduire la lysine (Nakayama, 1982).

On a observé des tâches qui ont le même rapport frontal que de la lysine.



① : Aspartokinase

② : Homoserine dehydrogenase

③ : Homoserine-O-acetyl transferase

.....▶ : Répression - - - - -▶ : Rétro-inhibition, OOO : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°34: Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant double auxotrophe à la thréonine et la méthionine de *Corynebacterium glutamicum* (Demain, 1971 ; Kinoshita, 1985 ; Tosaka et Takinami, 1986 ; Glanemann et al., 2003)

III-7- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾

Un tel mutant a subi deux coupures au niveau de la chaîne de biosynthèse l'une au niveau de la thréonine synthetase responsable de la conversion de l'O-phospho-homoserine en L-thréonine. (Nakayama, 1972, 1982 ; Plachy, 1984 ; Hirose *et al.*, 1985).

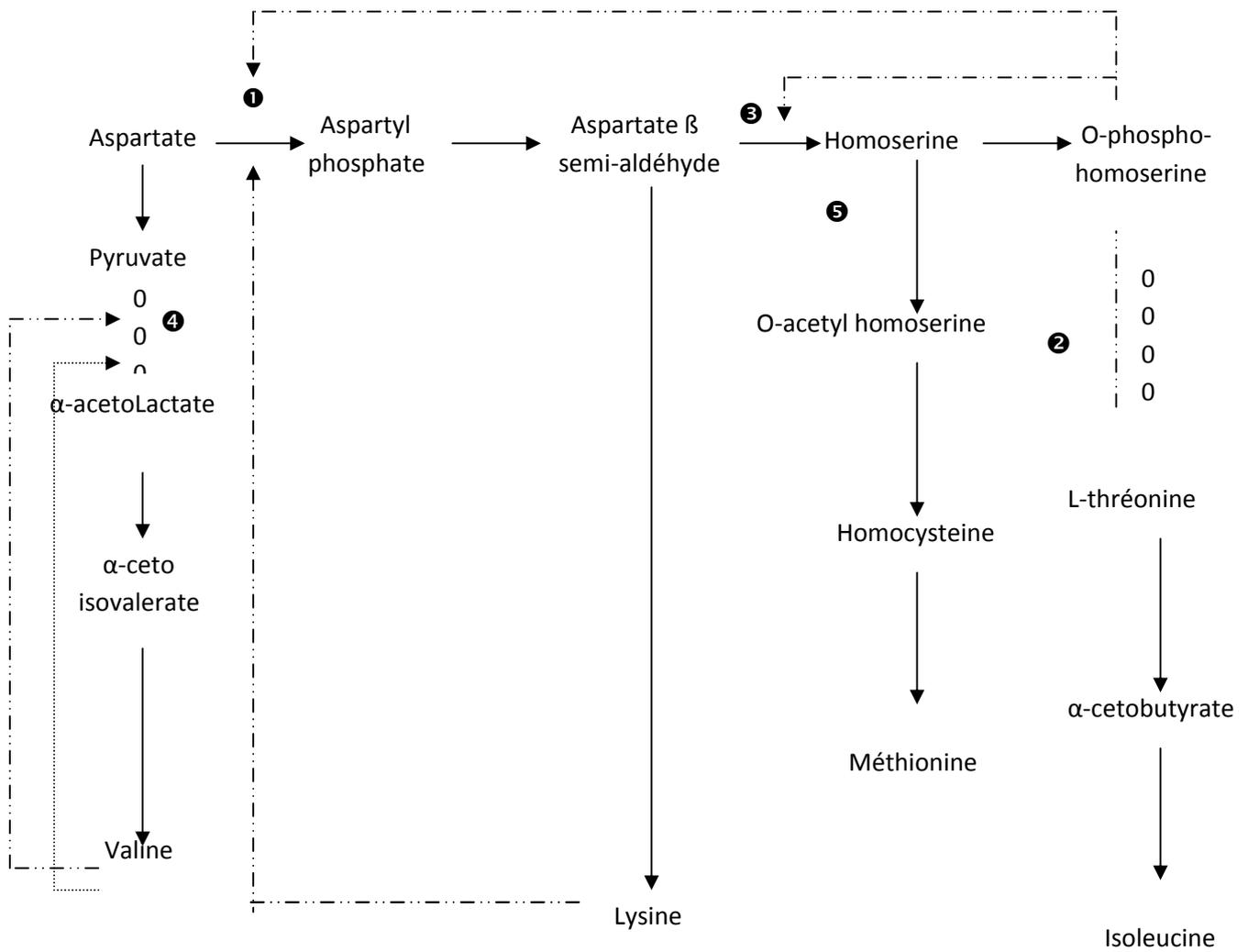
Et l'autre au niveau de l'acéthydroxyacide synthetase qui transforme le pyruvate en α -acétolactate puis en valine (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985, Sing et Shaner, 1995 ; Delaunay *et al.*, 2001).

D'une part la levée de la rétro-inhibition exercée sur l'aspartokinase et d'autre part la levée de la répression et la rétro-inhibition exercées sur l'acéthydroxyacide synthetase par l'absence de la synthèse de la thréonine et la valine (Kikuchi, 1980 ; Shio, 1982 ; Kinoshita, 1985) peut expliquer la production de la lysine et de la méthionine.

Comme la rétro-inhibition concentrée (lysine + thréonine) n'aura pas lieu du fait que la lysine seule n'exerce pas cette rétro-inhibition et tend à s'accumuler dans le milieu. La thréonine ajoutée au milieu est juste nécessaire pour assurer la croissance des bactéries, par conséquent il n'y a pas de régulation sur les deux enzymes dans ce cas (Kinoshita, 1985 ; Flickinger et Drew, 1999 ; Lessard et Sinsky, 2003).

On suppose qu'un mutant double auxotrophe thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ tend à produire la lysine et la méthionine.

Les mutants thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ ont provoqué l'apparition de spots ayant les mêmes rapports frontaux que ceux de la méthionine et la lysine.



❶ : Aspartokinase ;

❷ :Thréonine synthetase

❸ : Homoserine dehydrogenase.

❹ : Acetohydroxyacide synthetase

❺ : Homoserine O-acetyl transferase.

.....> Répression - - - -> Rétro-inhibition, OOO : Coupure de la chaîne de biosynthèse.

Figure n°35 : Régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et la lysine chez

un mutant exigeant en thréonine et valine de *Corynebacterium glutamicum*

(Nakayama, 1972 ; 1982 ; Plachy, 1984 ; Glanemann et *al.*, 2003)

III-8- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾ et thréonine⁽⁻⁾

Les coupures de la chaîne ont eu lieu au niveau de l'acéthydroxyacide synthetase qui catalyse la réaction de transformation de l' α -cétobutyrate en α -ceto α hydroxybutyrate qui mène à l'isoleucine et au niveau de la thréonine synthetase inhibant la synthèse de la thréonine à partir de l'O-phosphohomoserine.

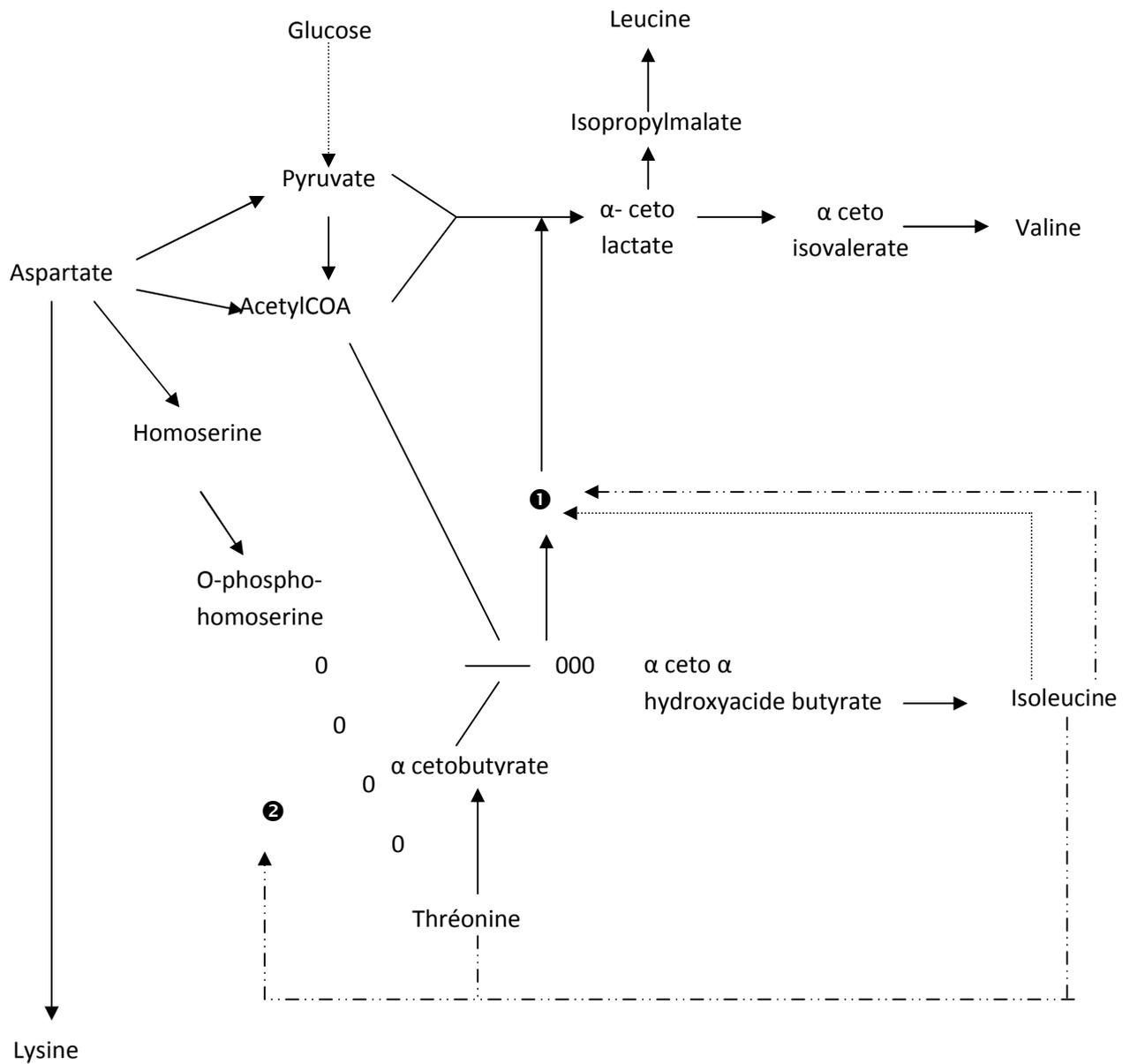
L'absence de l'isoleucine lève la rétro-inhibition et la répression de l'acéthydroxyacide synthetase permettant la synthèse préférentielle de la valine et la leucine (Kinoshita, 1985 ; Lynch, 2003).

De même, l'absence de la thréonine fait que la voie de biosynthèse s'oriente vers la production de la lysine comme produit de voie préférentielle par rapport à l'homoserine (Kinoshita, 1985 ; Flikinger et Drew, 1999).

Les quantités sub-optimales de la thréonine et de l'isoleucine ajoutées au milieu de fermentation font que le système de régulation ne soit pas opérationnel (Nakayama, 1982 ; Guiraud, 1993).

On suppose qu'un mutant double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾ et thréonine⁽⁻⁾ tend à produire la lysine, la leucine et la valine.

On a observé des tâches qui ont les mêmes rapports frontaux que ceux de la lysine, de la leucine et de la valine.



① : Acetohydroxyacide synthetase ; ② :Thréonine synthetase

.....▶ : Répression - - - -▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n° 36: Régulation de la voie de biosynthèse de la leucine, la valine, et de la lysine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et la thréonine de *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita, 1985 ; Tosaka et Takinami, 1986 ; Flickinger et Drew, 1999)

III-9- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾

Un mutant double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ est un mutant qui a subi une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de l'acétohydroxyacide synthetase responsable de la transformation de l' α cétobutyrate en α ceto hydroxyacidebutyrate qui mène à la synthèse de l'isoleucine (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Lynch, 2003) et une autre coupure au niveau de l'aspartate aminotransferase qui convertit le pyruvate en alanine (Shimura, 1989 ; Delaunay et *al.*, 2001). Ce qui fait que le pyruvate sera transformé en aspartate (Herman et Somerville, 1983).

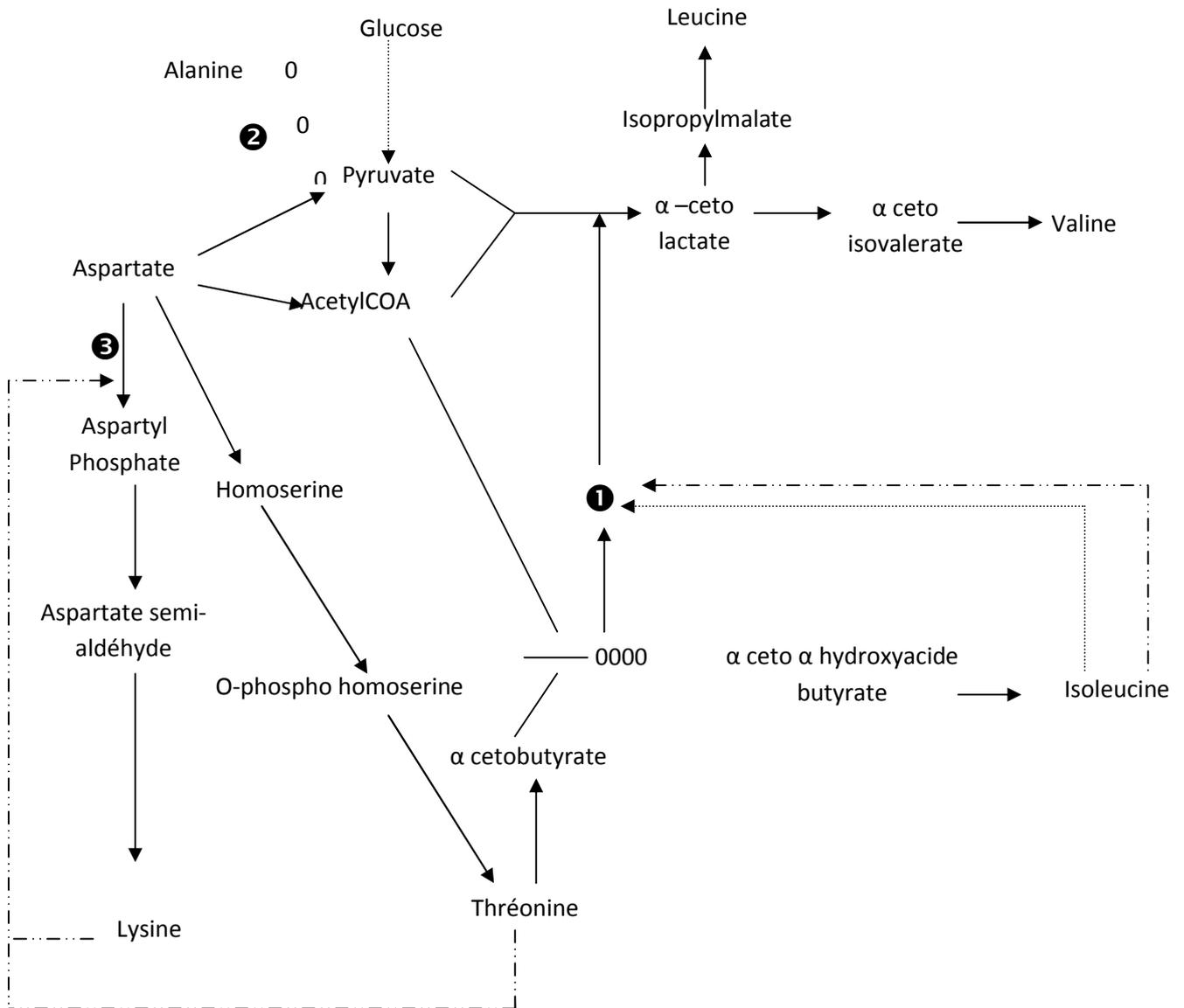
L'absence de l'isoleucine lève la rétro-inhibition et la répression de l'acétohydroxyacide synthetase permettant la synthèse préférentielle de la valine et la leucine (Kinoshita, 1985) ; de même l'absence de l'alanine fait que la voie de biosynthèse s'oriente préférentiellement vers la production de la thréonine (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Lynch, 2003).

La synthèse préférentielle de la thréonine est prédominante probablement à cause de l'activité de l'homoserine dehydrogenase qui est 15 fois plus grande du côté de la thréonine que celle de dihydropicolinate synthetase du côté de la lysine, au point d'embranchement biosynthétique (Plachy, 1984).

La lysine et la thréonine exercent leur action sur l'aspartokinase, l'activité de celle-ci est inhibée lorsque ces deux dernières ont tendance à s'accumuler (Sasson, 1985).

On peut avancer qu'un mutant double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ tend à produire la valine, la leucine et la thréonine.

Sur la plaque de verre, on a observé des spots ayant les mêmes rapports frontaux que ceux de la valine, la leucine et la thréonine.



① : Acetohydroxyacide synthetase ; ② : Aspartate aminotransferase

③ : Aspartokinase.

.....▶ Répression -.-.-.-▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°37 : Régulation de la voie de biosynthèse de la valine, la leucine et de la thréonine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et à l'alanine de *Corynebacterium glutamicum* (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Delaunay et al., 2001; Lynch, 2003)

III-10- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾

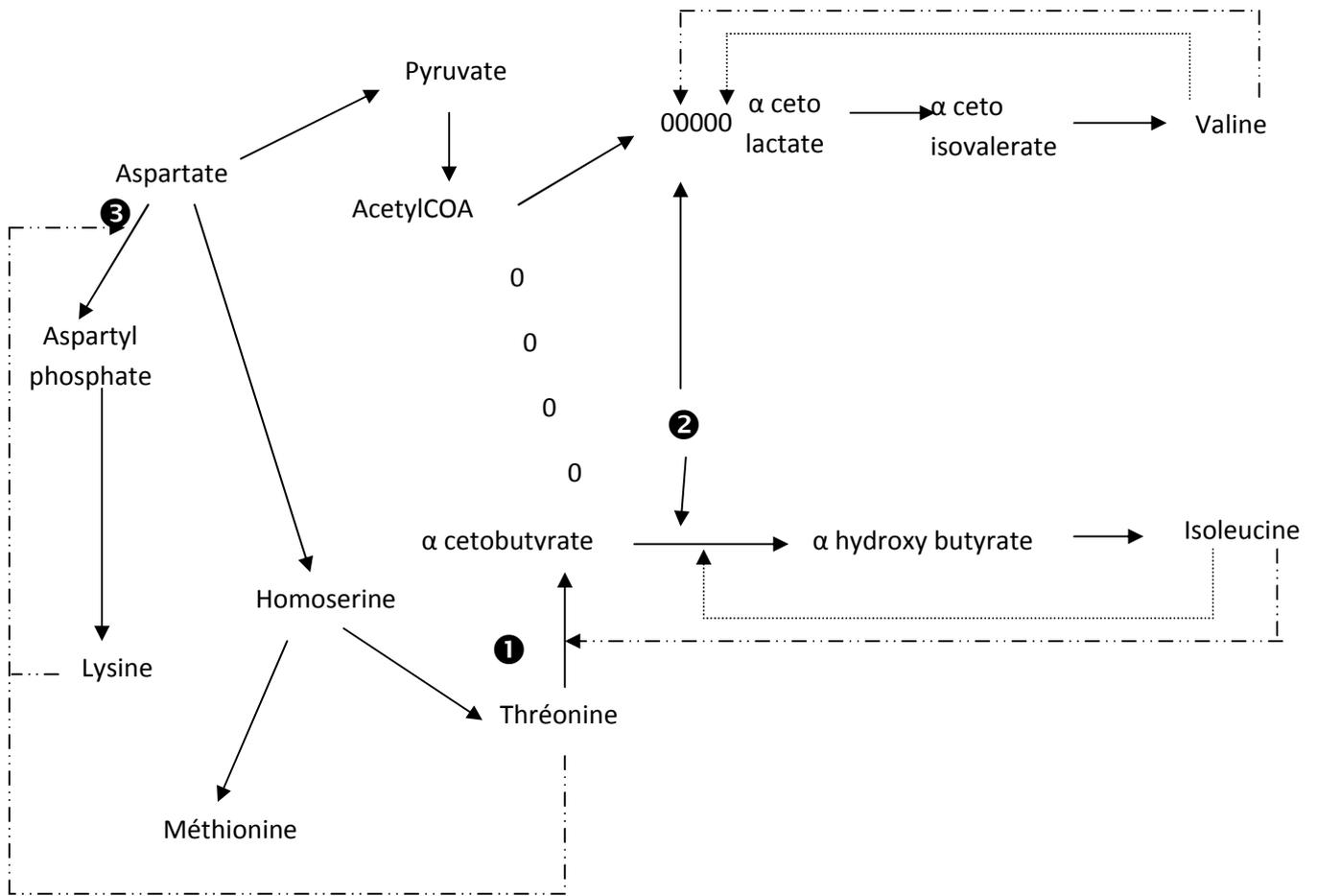
Un mutant isoleucine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ est un mutant qui a subi une coupure de la chaîne de biosynthèse au niveau de l'acétohydroxyacide synthetase qui transforme le pyruvate en α -acétolactate qui mène à la valine, L'acétohydroxyacide synthetase est également responsable de la conversion de l' α -cétobutyrate en α -cétohydroxybutyrate qui donne l'isoleucine (Nakayama, 1982 ; Sing et Shaner, 1995 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001).

La levée de la répression et la rétro-inhibition exercée sur l'acétohydroxyacide synthetase par l'absence de la synthèse de la valine et la levée de la rétro-inhibition de la thréonine deshydrogenase par l'absence de la synthèse de l'isoleucine peut expliquer la production de la méthionine et la thréonine.

La présence d'une rétro-inhibition concentrée (lysine, thréonine) exercée sur l'aspartokinase fait que la voie de biosynthèse s'oriente vers la synthèse de la thréonine et un blocage de la synthèse de la lysine (Sasson, 1985).

Donc, un tel mutant double auxotrophe isoleucine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ tend à surproduire la thréonine et la méthionine, cela se rapproche aux résultats de Nakayama (1982) et Kinoshita (1985).

Sur la plaque de CCM, on a observé des spots ayant les mêmes rapports frontaux que ceux de la méthionine et la thréonine.



- ❶ : Thréonine déshydratase ; ❷ : Acétohydroxyacide synthétase
- ❸ : Aspartokinase.

.....▶ : Répression - - - - -▶ : Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°38: Régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et la thréonine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et la valine de *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita, 1985 ; Guillouet et al., 1999; Delaunay et al., 2003)

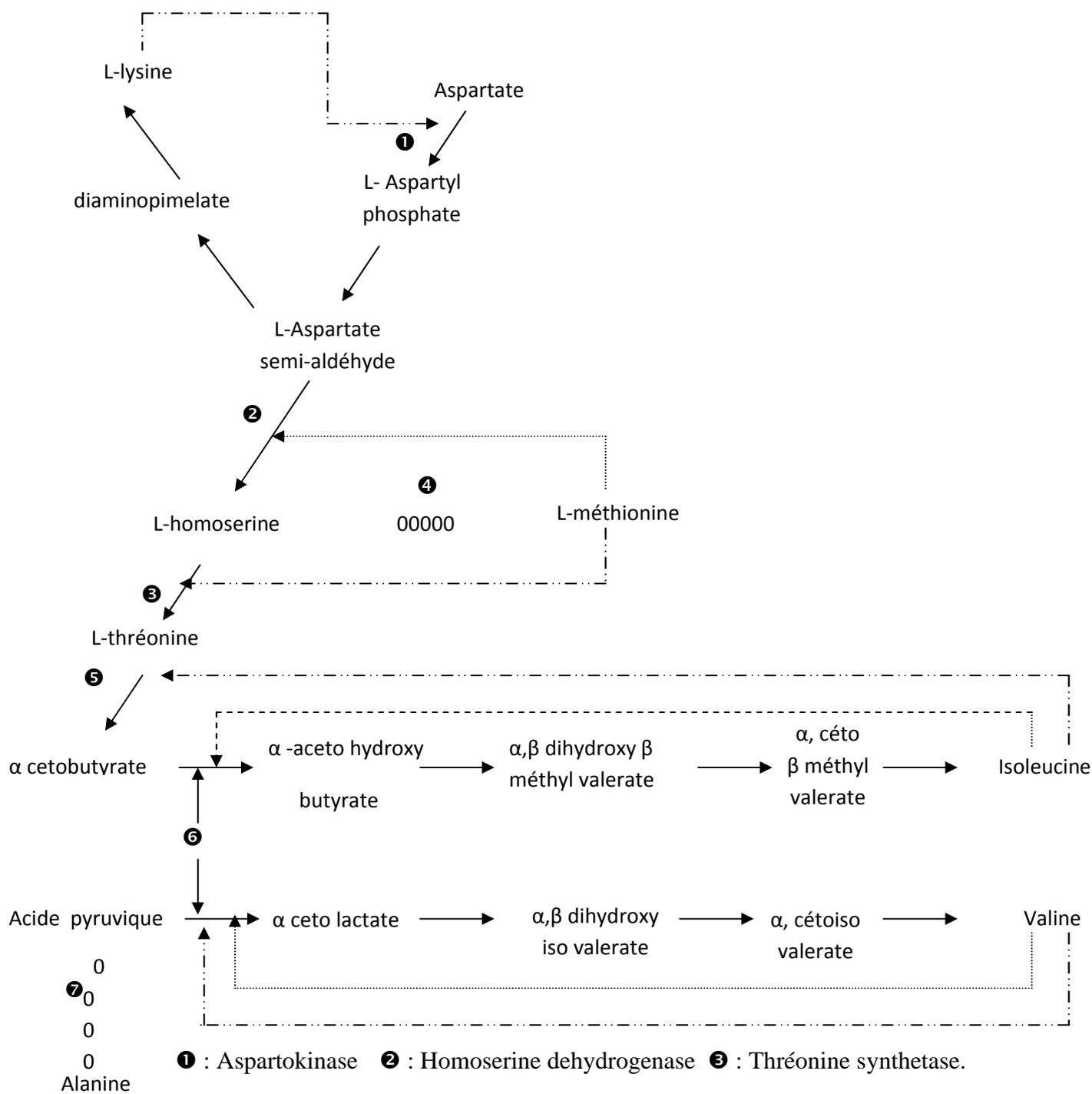
III-11- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe méthionine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾

Les coupures de la chaîne de biosynthèse auront lieu au niveau de l'homoserine-O-acetyl transferase qui catalyse la réaction de transformation de l'homoserine en méthionine et au niveau de l'aminotransferase responsable de la conversion du pyruvate en alanine (Nakayama, 1972 ; Kikuchi, 1980 ; Hirose et *al.*, 1985).

D'une part, la levée de la rétro-inhibition exercée sur la thréonine synthetase et la répression exercée sur l'homoserine dehydrogenase par l'absence de synthèse de la méthionine (Demain, 1971 ; Shio, 1982 ; Plachy, 1984 ; Guillouet et *al.*, 1999) et d'autre part l'existence d'une rétro-inhibition exercée sur la thréonine dehydrogenase et une répression exercée sur l'acetoxyacide synthetase, par l'absence de la synthèse de l'alanine peuvent expliquer l'accumulation de la lysine dans le milieu.

On suppose qu'un mutant double auxotrophe méthionine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ est un mutant producteur de la lysine.

Les tâches observées sur la plaque de CCM ont le même rapport frontal que celui de la lysine.



.....▶ : Répression - - - - -▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°39 : Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant exigeant en méthionine et en l'alanine de *Corynebacterium glutamicum* (Nakayama, 1982 ; Guillouet et al., 1999 ; Delaunay et al., 2001)

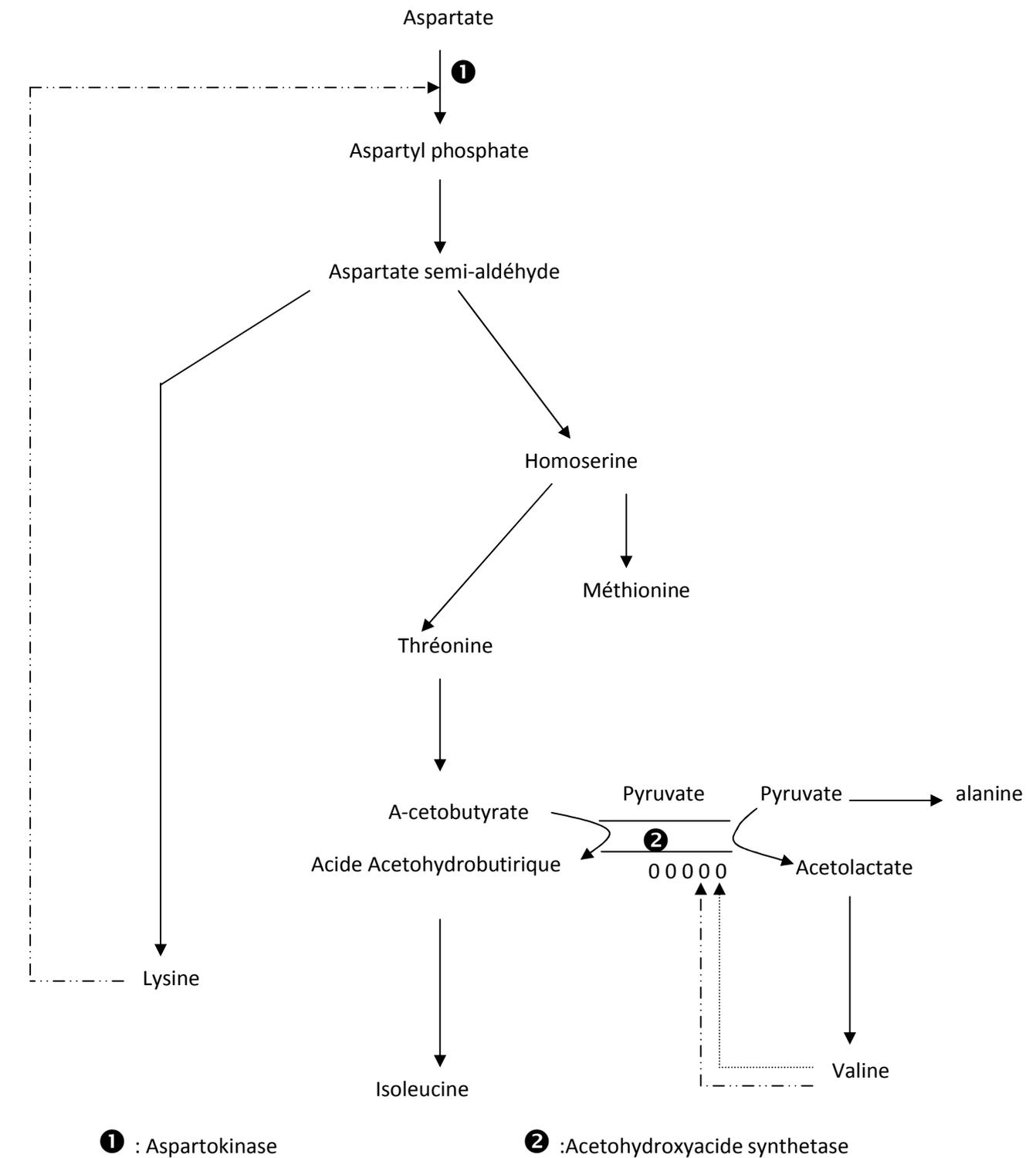
III-12- Acides aminés produits par les mutants double auxotrophe valine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾

Un tel mutant présenterait une coupure de la chaîne a eu lieu au niveau de l'acétohydroxyacide synthetase qui transforme le pyruvate en α -acétolactate qui donnera après une série de transformation la valine et l'alanine, comme produit fini de la voie de biosynthèse (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Sing et Shaner, 1995 ; Guillouet et *al.*, 1999).

L'absence de la valine et l'alanine lève la rétro-inhibition et la répression de l'acétohydroxyacide synthetase permettant la synthèse préférentielle de la lysine et la méthionine (Nakayama, 1982, Kinoshita, 1985 ; Shimura, 1989 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001).

Les quantités sub-optimales de la valine et de l'alanine ajoutées aux milieux de fermentation font que le système de régulation ne soit pas opérationnel (Nakayama, 1982, Guiraud, 1993 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001).

On peut dire de ce fait qu'un mutant double auxotrophe valine⁽⁻⁾, alanine⁽⁻⁾ tend à surproduire la lysine et la méthionine et les spots observés sur la plaque de CCM ont les mêmes rapports frontaux que de la lysine et la méthionine.



-----> Répression,> Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°40 : Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine et la méthionine chez un mutant double auxotrophe à la valine et à l'alanine de *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001)

III-13- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine et alanine

Les coupures de la chaîne de biosynthèse, d'un tel mutant, auront lieu au niveau de l'homoserine dehydrogenase qui transforme l'aspartate semi-aldéhyde en homoserine qui mène à la synthèse de la méthionine et la thréonine.

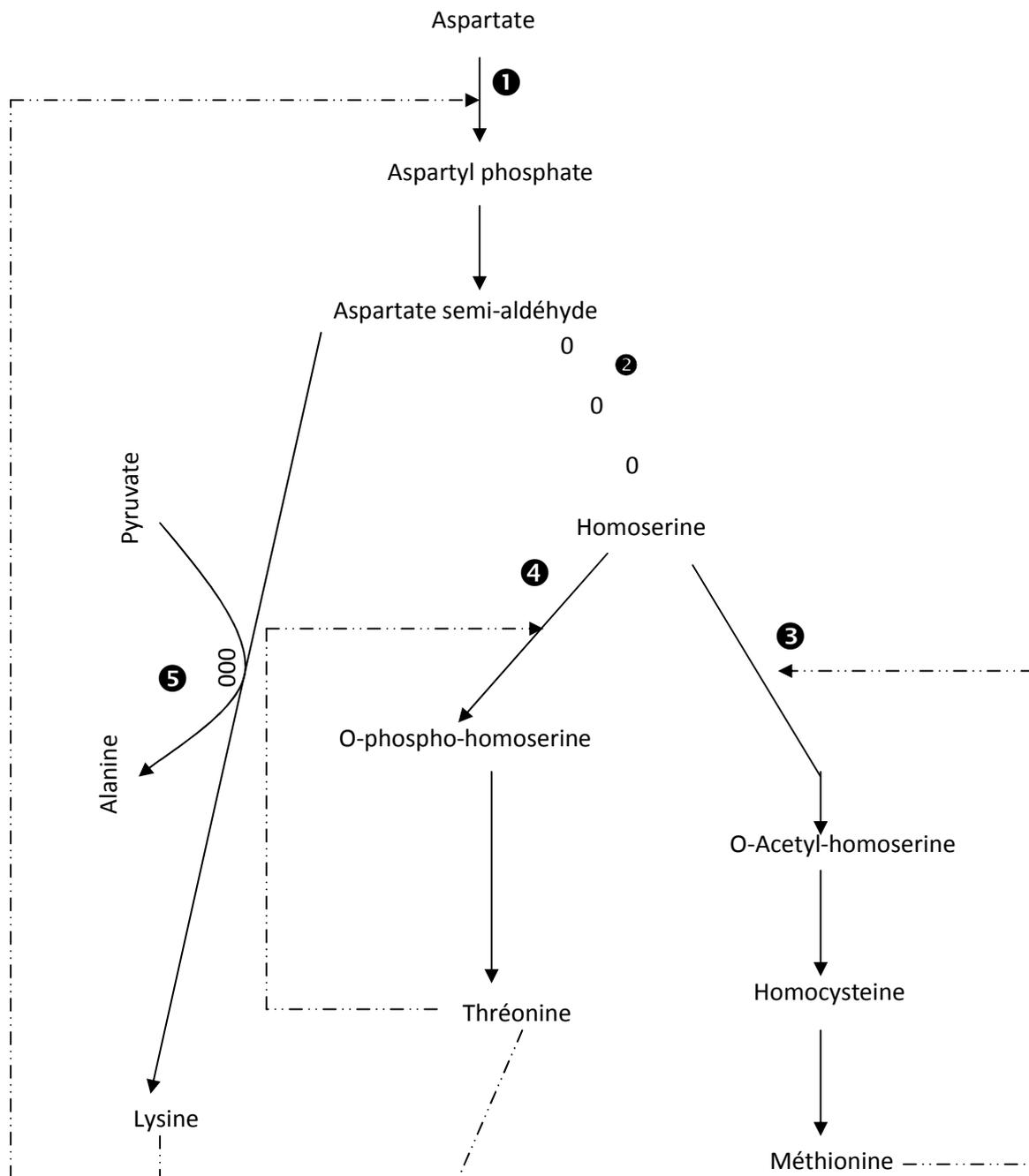
Et au niveau de l'aspartate aminotransferase qui convertit le pyruvate en alanine (Shiio, 1982 ; Nakayama, 1982 ; Hirose et *al.*, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999).

L'absence de la thréonine et de la méthionine ainsi que celle de l'alanine lève la rétro-inhibition sur l'homoserine O-acétyltransferase (Kikuchi, 1980 ; Guillouet et *al.*, 1999), permettant donc la synthèse préférentielle de lysine.

Les quantités sub-optimales de la thréonine, méthionine, alanine ajoutées aux milieux de fermentation font que le système de régulation est inhibée (Nakayama, 1982 ; Plachy, 1984 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001).

On considère qu'un mutant exigeant en thréonine, méthionine et alanine tend à produire la lysine.

On a observé des tâches qui ont le même rapport frontal que celui de la lysine.



❶ : Aspartokinase ; ❷ : Homoserine dehydrogenase. ❸ : Homoserine-O-acetyltransferase

❹ : Homoserine kinase ; ❺ : Aspartate aminotransferase.

-----> Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°41 : Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine et alanine de *Corynebacterium glutamicum*

(Demain, 1971 ; Kikuchi, 1980 ; Kinoshita, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999)

III-14- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine et valine

Un mutant thréonine⁽⁻⁾, méthionine⁽⁻⁾ et valine⁽⁻⁾ est un mutant dont la voie de biosynthèse a été coupée à deux niveaux.

En premier lieu au niveau de l'homoserine dehydrogenase bloquant ainsi la transformation de l'aspartate semi aldéhyde en homoserine.

En deuxième lieu au niveau de l'acetoxyacide synthetase responsable de la conversion du pyruvate en α -acétolactate donnant par la suite la valine (Sing et Shaner, 1995, Guillouet et *al.*, 1999 ; Lessard et Sinsky, 2003 ; Lynch, 2003).

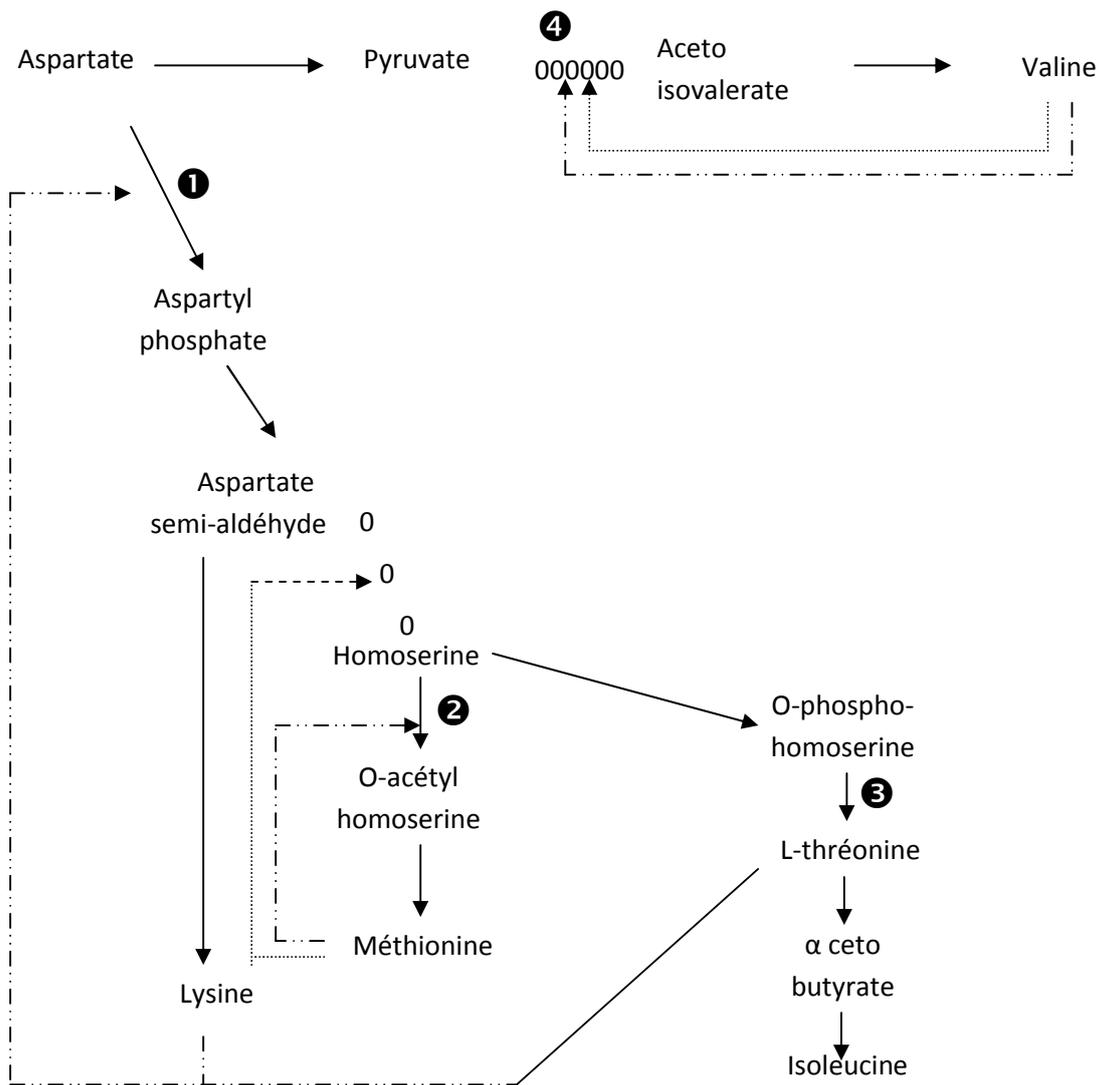
L'absence de la méthionine, thréonine lève la rétro-inhibition et la répression de l'homoserine O-acetyltransferase et de l'aspartokinase respectivement permettant la synthèse de la lysine (Demain, 1971 ; Kikuchi, 1980 ; Glanemann et *al.*, 2003).

De même, l'absence de la valine fait que la voie de biosynthèse donne uniquement la lysine (Hirose et *al.*, 1985 ; Kinoshita, 1985 ; Delauney et *al.*, 2001 ; Glanemann et *al.*, 2003).

L'accumulation de la lysine est due à l'orientation de la transformation de l'aspartate en valine et Isoleucine vers la production de la lysine.

On présume qu'un tel mutant exigeant en thréonine, méthionine et valine est un mutant surproducteur de lysine.

Sur la plaque de verre, on a observé des spots ayant le même rapport frontal que celui de la lysine.



① : Aspartokinase

② : Homoserine O-acetyl transferase

③ : Thréonine synthetase.

④ : Acetohydroxyacide synthetase.

.....▶ : Répression - - - - -▶ : Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°42 : Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine, chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine et valine de *Corynebacterium glutamicum*

(Demain, 1971 ; Kikuchi, 1980 ; Kinoshita, 1985 ; Glanemann et al., 2003)

III-15- Acides aminés produits par les mutants exigeants en méthionine, valine et isoleucine

Un mutant méthionine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ et isoleucine⁽⁻⁾ pourrait subir trois coupures au niveau de la voie de biosynthèse.

La première au niveau de l'homoserine O-acetyl transferase responsable de la conversion de l'homoserine en O-acetyl homoserine qui donnera ensuite la méthionine (Demain, 1971 ; Nakayama, 1982 ; Delaunay et *al.*, 2001).

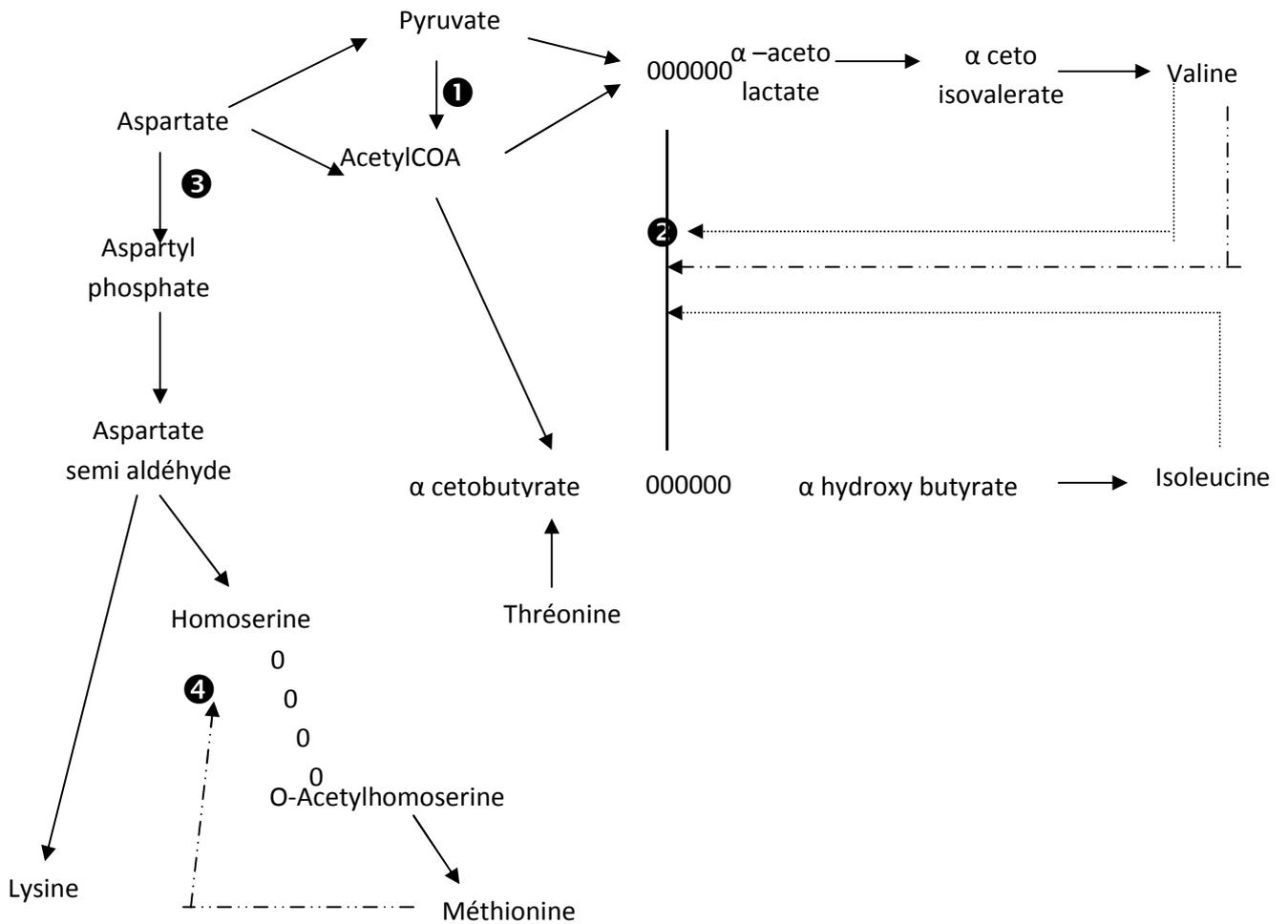
La deuxième coupure est au niveau de l'acetoxyacide synthetase transforme le pyruvate en α -acétolactate bloquant ainsi la voie de biosynthèse à ce niveau et il n'y a pas par conséquent une production de la valine (Sing et Shaner, 1995).

La coupure au niveau de l'acetoxyacide synthetase ne permettant pas également la transformation de l' α -cetobutyrate en α -cetoxybutyrate donc il n'y a pas de synthèse de l'isoleucine (Kikuchi, 1980 ; Kinoshita, 1985 ; Lessard et Sinsky, 2003).

La levée de la rétro-inhibition et la répression exercée sur l'acetoxyacide synthetase par l'absence de la valine et l'isoleucine ainsi que la levée de la rétro-inhibition et la répression exercée sur l'homoserine O-acetyltransferase par l'absence de la synthèse de la méthionine peuvent expliquer la production de la lysine (Lynch, 2003) par un mutant triple auxotrophe : méthionine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾ et isoleucine⁽⁻⁾.

On suppose qu'un tel mutant exigeant en méthionine, valine et isoleucine tend à surproduire la lysine.

On a observé dans la plaque CCM des tâches qui ont le même rapport frontal que celui de la lysine.



① : pyruvate deshydrogenase ; ② :Acetohydroxyacide synthetase

③ : Aspartokinase ; ④ :Homoserine O-acetyl transferase

.....▶ : Répression - - - - -▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse

Figure n°43: Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant exigeant en méthionine, valine et isoleucine de *Corynebacterium glutamicum*

(Plachy, 1984 ; Hirose et al., 1985; Flickinger et Drew, 1999)

III-16- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine, valine et isoleucine

De tels mutants peuvent comporter des coupures au niveau de la chaîne de biosynthèse et qui sont les suivantes :

Premièrement au niveau de la thréonine synthetase responsable de la transformation de l'O-phosphohomoserine en thréonine (Nakayama, 1982), cela entraîne une inhibition de la synthèse de l'isoleucine (Nakayama, 1982 ; Kinoshita, 1985 ; Sing et Shaner, 1995).

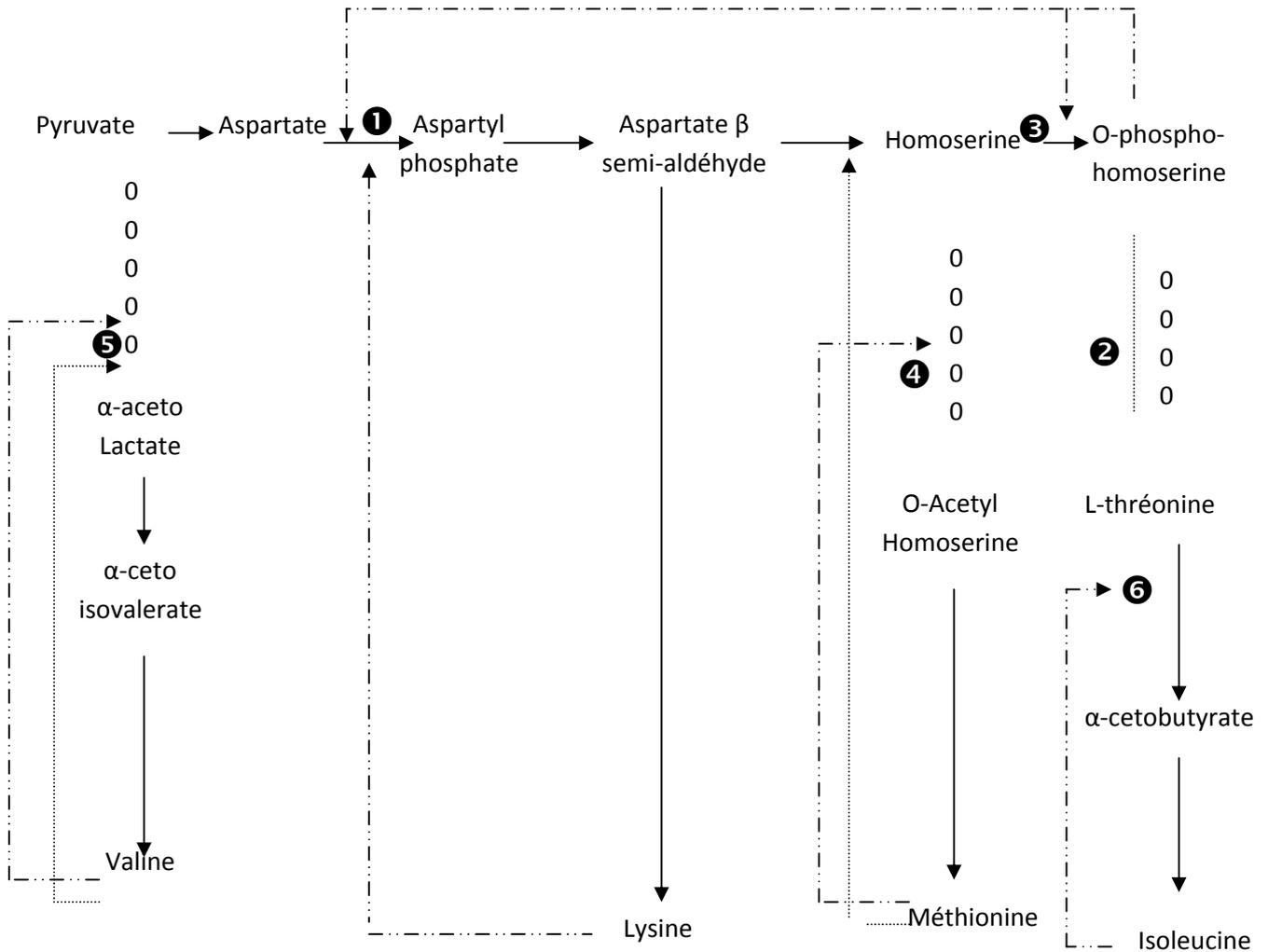
Deuxièmement au niveau de l'homoserine O-acetyl transferase qui aboutit à la synthèse de la méthionine à partir de l'homoserine (Demain, 1971 ; Kinoshita, 1985).

Troisièmement au niveau de l'acétohydroxyacide synthetase qui donne la valine comme dernier produit de la chaîne de biosynthèse (Sing et Shaner, 1995 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Lynch, 2003).

La levée de la rétro-inhibition et la répression exercées sur la thréonine déshydratase, thréonine synthetase, l'homoserine déshydrogenase, l'homoserine O-acetyl transferase, l'aspartokinase, l'acétohydroxyacide synthetase par l'absence de la synthèse de la thréonine, méthionine, valine et l'isoleucine entraîne la surproduction de la lysine (Sing et Shaner, 1995, Guillouet et *al.*, 1999 ; Lessard et Sinsky, 2003) expliquée par la diminution de la quantité du pyruvate et l'augmentation de l'aspartate qui mène à la lysine.

Un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine et isoleucine est considéré ou supposé comme un mutant producteur de la lysine.

Ceci est confirmé par les spots observés sur la plaque CCM ont le même rapport frontal que celui de la lysine.



❶ : Aspartokinase

❷ : Thréonine synthetase

❸ : Homoserine dehydrogenase.

❹ : Homoserine O-Acetyl transferase

❺ : Acetohydroxyacide synthetase

❻ : Thréonine hydratase.

.....▶ Répression - - - - -▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse.

Figure n°44 : Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine et l'isoleucine de *Corynebacterium glutamicum* (Nakayama, 1982 ; Lessard et Sinsky, 2003 ; Lynch, 2003).

III-17- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, valine, Isoleucine et alanine

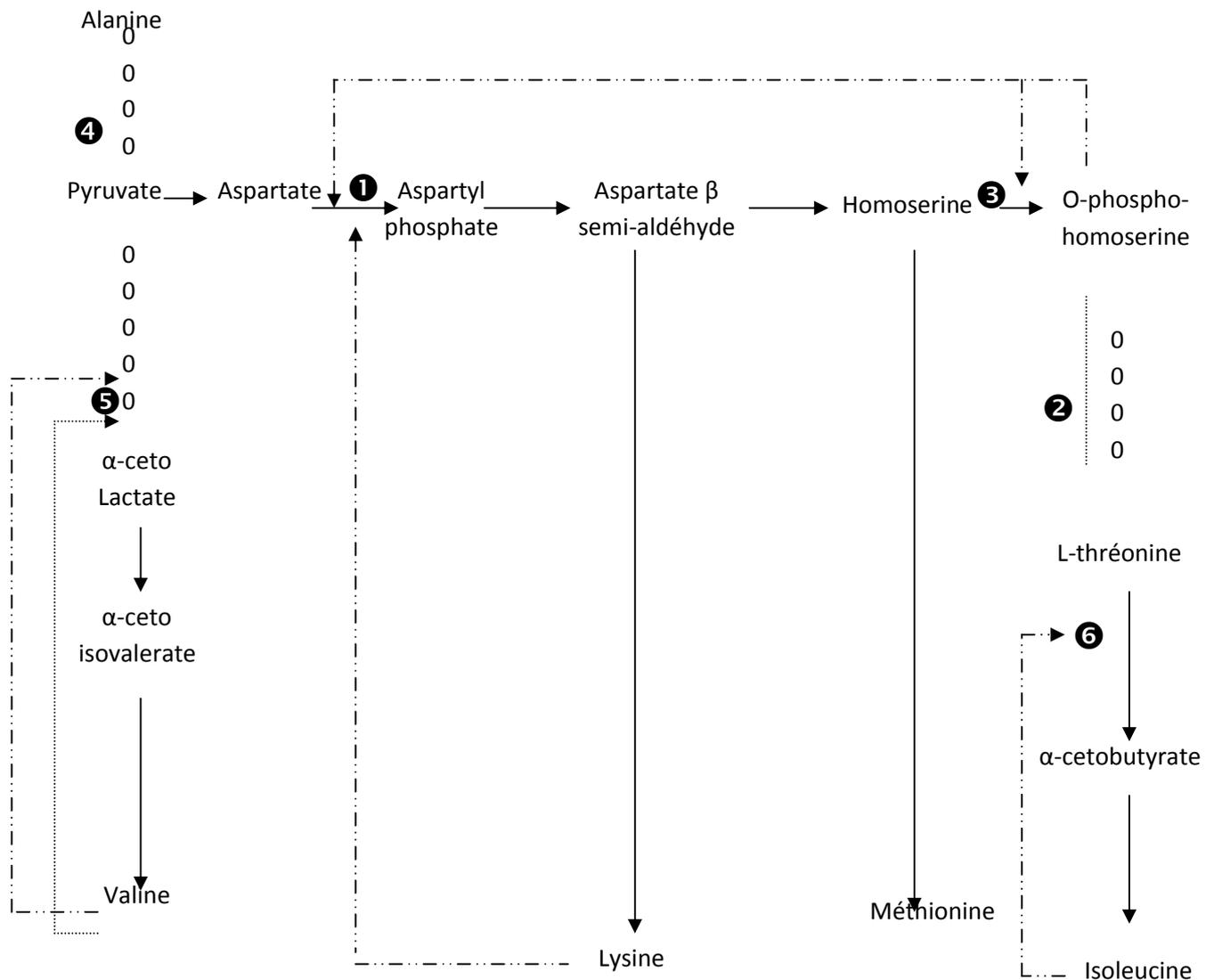
Les coupures ont eu lieu au niveau de la thréonine synthetase, l'acetoxyacide synthetase et l'aspartate aminotransferase aboutissant normalement à la synthèse de la thréonine, l'isoleucine, la valine et l'alanine respectivement (Hirose et *al.*, 1985 ; Sing et Shaner, 1995 ; Flickinger et *al.*, 1999 ; Lynch, 2003).

L'absence de l'isoleucine et la thréonine lève la rétro-inhibition et la répression de la thréonine deshydratase permettant la synthèse préférentielle de la lysine et la méthionine (Kinoshita, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001 ; Lessard et Sinsky, 2003) permettant la synthèse préférentielle de la lysine et la méthionine.

Ainsi que, l'absence de l'alanine oriente la voie également vers la production de la lysine et la méthionine (Lessard et Sinsky, 2003), de même la levée de la rétro-inhibition et la répression exercée par l'absence de la valine sur l'acetoxyacide synthétase conduit au même résultat (Lessard et Sinsky, 2003).

Donc on conclue que un mutant thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾, isoleucine⁽⁻⁾ et alanine⁽⁻⁾ tend à surproduire la lysine dans le milieu de fermentation.

Les mutants thréonine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾, isoleucine⁽⁻⁾, Alanine⁽⁻⁾ ont provoqué, donc, l'apparition des spots ayant les mêmes rapports frontaux que la lysine et la méthionine ;



① : Aspartokinase

② : Thréonine synthetase

③ : Homoserine dehydrogenase.

④ : Aspartate aminotransferase

⑤ : Acetohydroxyacide synthetase

⑥ : Thréonine déshydratase

..... → Répression - - - - - → Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse.

Figure n°45: Régulation de la voie de biosynthèse de lysine et de la méthionine chez un mutant exigeant en thréonine, valine, isoleucine et alanine de *Corynebacterium glutamicum*

(Nakayama, 1982 ; Lessard et Sinsky, 2003 ; Lynch, 2003).

III-18- Acides aminés produits par les mutants exigeants en thréonine, méthionine, valine, isoleucine et alanine.

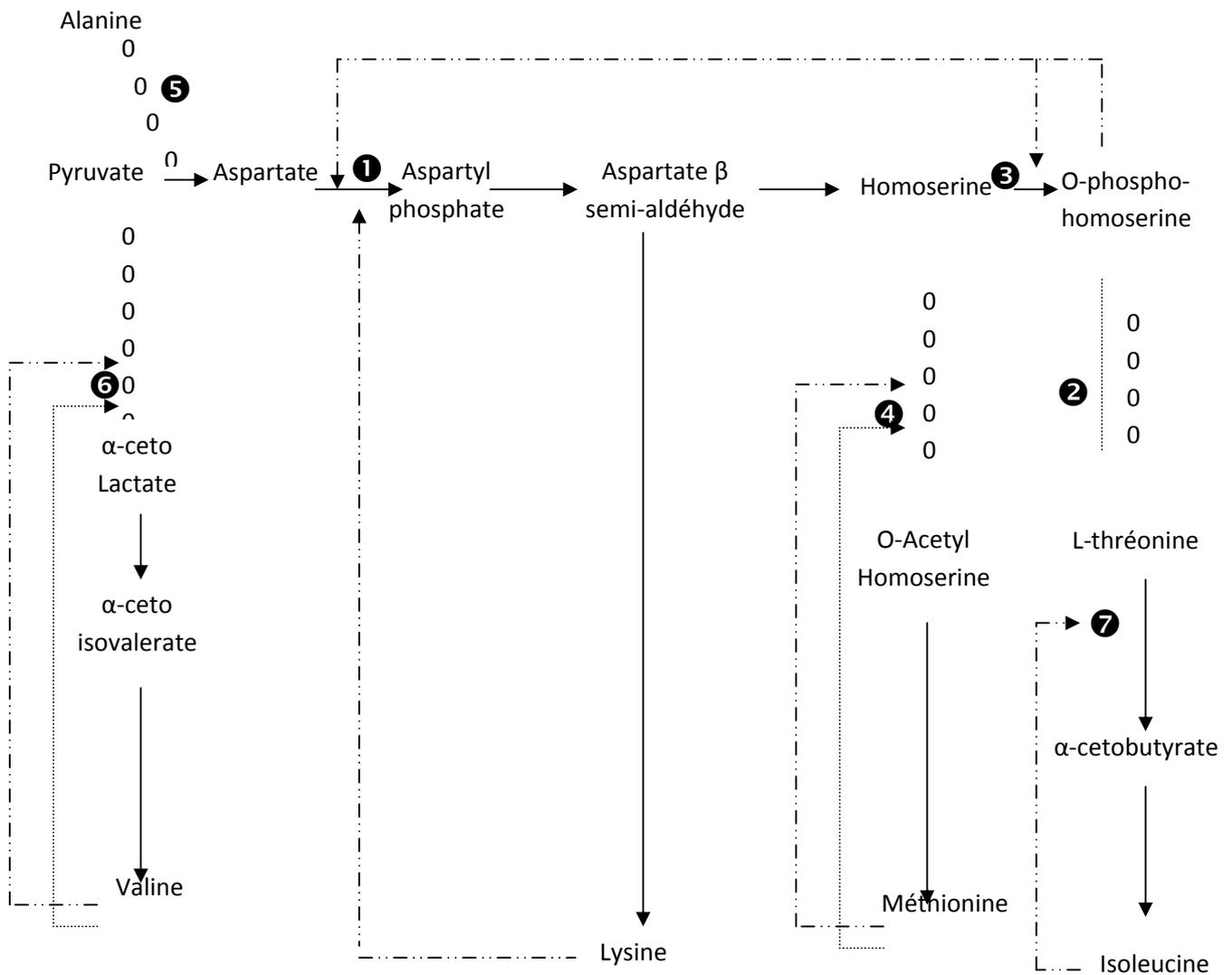
Les coupures ont eu lieu au niveau de la thréonine synthetase responsable de la conversion de l'O-phosphohomoserine en L-thréonine, et au niveau de l'homoserine O-acetyl transferase qui convertit l'homoserine en O-acétyl homoserine donnant par la suite la méthionine (Kinoshita, 1985 ; Shimura, 1989 ; Sing et Shamer, 1995 ; Glanemann et *al.*, 2003)

Une autre coupure au niveau de l'aspartate aminotransferase qui transforme le pyruvate en alanine et la dernière coupure a eu lieu au niveau de l'acetoxyacide synthetase responsable de la transformation du pyruvate en α -acétolactate donnant par la suite l' α -cétoisovalérate et enfin la valine (Hirose et *al.*, 1985 ; Guillouet et *al.*, 1999 ; Delaunay et *al.*, 2001 ; Lessard et Sinsky, 2003).

La levée de la rétro-inhibition et la répression exercée sur la thréonine deshydrogenase, la thréonine synthetase, l'homoserine deshydrogenase, l'aspartokinase, l'homoserine acetyl transferase et l'acetoxyacide synthetase par l'absence de la synthèse de la thréonine, méthionine, valine, isoleucine ainsi que celle de l'alanine peut expliquer la production de la lysine par un tel type de mutant thréonine⁽⁻⁾, méthionine⁽⁻⁾, valine⁽⁻⁾, isoleucine⁽⁻⁾ et alanine⁽⁻⁾, à cause de l'accumulation de l'aspartate et l'orientation de la voie de biosynthèse uniquement vers la synthèse de la lysine.

On suppose donc qu'un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine et alanine tend à surproduire la lysine.

On a observé, dans l'analyse de la plaque de C.C.M, des tâches qui ont le même rapport frontal que celui de la lysine



① : Aspartokinase

② :Thréonine synthetase

③ : Homoserine dehydrogenase.

④ : Homoserine O-Acetyl transferase

⑤ : Aspartate aminotransferase

⑥ : Acetohydroxyacide synthetase

⑦ :Thréonine deshydrogenase

.....▶ Répression -.-.-.-▶ Rétro-inhibition, 000 : Coupure de la chaîne de biosynthèse.

Figure n°46 : Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine, l'isoleucine et alanine de *Corynebacterium glutamicum*

(Kinoshita, 1985 ; Lessard et Sinsky, 2003 ; Lynch, 2003).

Dans le tableau suivant sont représentés les différents sites où a lieu la mutation, les acides aminés produits par les différents mutants auxotrophes obtenus :

Tableau n°22: Sites de mutation et acides aminés produits par dix huit (18) mutants auxotrophes obtenus.

Mutants auxotrophes à la :	Site où a lieu la mutation	Acide(s) aminé(s) produit(s)
1- Valine	Dihydroxysynthetase	Isoleucine
2- Alanine	Alanine valine aminotransferase	Isoleucine
3- Méthionine	Homoserine dehydrogenase	Lysine
4- Thréonine	Thréonine synthetase	Lysine, Méthionine
5- Thréonine, Alanine	Thréonine synthetase Aspartate aminotransferase	Valine , Méthionine et Lysine
6- Thréonine, Méthionine	Homoserine dehydrogenase	Lysine
7- Thréonine, Valine	Thréonine synthetase Acetohydroxyacide synthetase	Méthionine et Lysine
8- Isoleucine, Thréonine	Acetohydroxyacide synthetase Thréonine synthetase	Lysine, Leucine et Valine
9- Isoleucine, Alanine	Acetohydroxyacide synthetase Aspartate aminotransferase	Valine, Leucine et Thréonine
10- Isoleucine, Valine	Acetohydroxyacide synthetase	Méthionine et Thréonine

11- Méthionine, Alanine	Homoserine O-acetyl- transferase Aminotransferase	Lysine
12- Valine, Alanine	Acetohydroxyacide synthetase	Lysine et Méthionine
13- Thréonine, Méthionine et Alanine	Homoserine dehydrogenase Aspartate aminotransferase	Lysine
14- Thréonine, Méthionine et Valine	Homoserine dehydrogenase Acetohydroxyacide synthetase	Lysine
15- Méthionine, Valine et Isoleucine	Homoserine O-acetyl- transferase Acetohydroxyacide synthetase	Lysine
16- Thréonine, Méthionine, Valine et Isoleucine	Thréonine synthetase Acetohydroxyacide synthetase Aspartate aminotransferase	Lysine
17- Thréonine, Valine, Isoleucine et Alanine	Thréonine synthetase Acetohydroxyacide synthetase Aspartate aminotransferase	Lysine et Méthionine
18- Thréonine, Méthionine Valine, Isoleucine et Alanine	Thréonine synthetase Homoserine O-acetyl- transferase Aspartate aminotransferase Acetohydroxyacide synthetase	Lysine

De ce que précède, on peut donc regrouper les différents mutants en fonction des acides aminés produits.

Tableau n°23: Groupes de mutants auxotrophes obtenus selon acides aminés produits.

Mutant produisant Mutant auxotrophe à la	1 acide aminé	2 acides aminés	3 acides aminés
Valine	Isoleucine		
Alanine	Isoleucine		
Thréonine, Méthionine	Lysine		
Thréonine, Méthionine et Valine	Lysine		
Méthionine, Valine et Isoleucine	Lysine		
Thréonine, Méthionine, Valine et Isoleucine	Lysine		
Thréonine, Méthionine, Valine, Isoleucine et Alanine	Lysine		
Thréonine, Méthionine et Alanine	Lysine		
Méthionine	Lysine		
Méthionine, Alanine	Lysine		
Thréonine		Lysine, Méthionine	
Thréonine, Valine		Lysine, Méthionine	
Valine, Alanine		Lysine, Méthionine	
Thréonine, Valine, Isoleucine et Alanine		Lysine, Méthionine	
Isoleucine, Valine		Méthionine, Thréonine	
Thréonine, Alanine			Valine , Méthionine et Lysine
Isoleucine, Thréonine			Lysine, Leucine et Valine
Isoleucine, Alanine			Valine, Leucine et Thréonine

A partir de ce tableau, on peut alors dire qu'on a obtenu :

- Deux mutants auxotrophes produisant l'isoleucine et huit produisant de la lysine.
- Quatre mutants auxotrophes produisant la lysine et la méthionine.
- Un mutant auxotrophe produisant la méthionine et la thréonine.
- Un mutant auxotrophe produisant la valine, la méthionine et la lysine.
- Un mutant auxotrophe producteur de la lysine, la leucine et la valine.
- Un mutant auxotrophe producteur de la valine, la leucine et la thréonine.

Les mutants auxotrophes produisant un seul acide aminé donne une grande quantité de cet acide aminé par comparaison avec les mutants auxotrophes produisant deux ou trois acides aminés.

Car le diamètre de la tâche sur la plaque de CCM pour les mutants auxotrophes produisant un seul acide aminé est plus grand par rapport à celui des tâches correspondant aux acides aminés produits par les mutants auxotrophes à deux ou trois acides aminés.

De même sa couleur est intense, elle est donc plus vive pour les mutants auxotrophes produisant un seul acide aminé que pour les mutants produisant deux ou trois acides aminés.

Par exemple un mutant auxotrophe producteur de la lysine est représenté sur la plaque de CCM par une tâche plus grande et de couleur vive plus que celle d'un mutant producteur de la lysine, la leucine et la valine.

IV- Taux de croissance des souches mutées et sauvages

IV- 1- Cinétique de croissance des deux souches

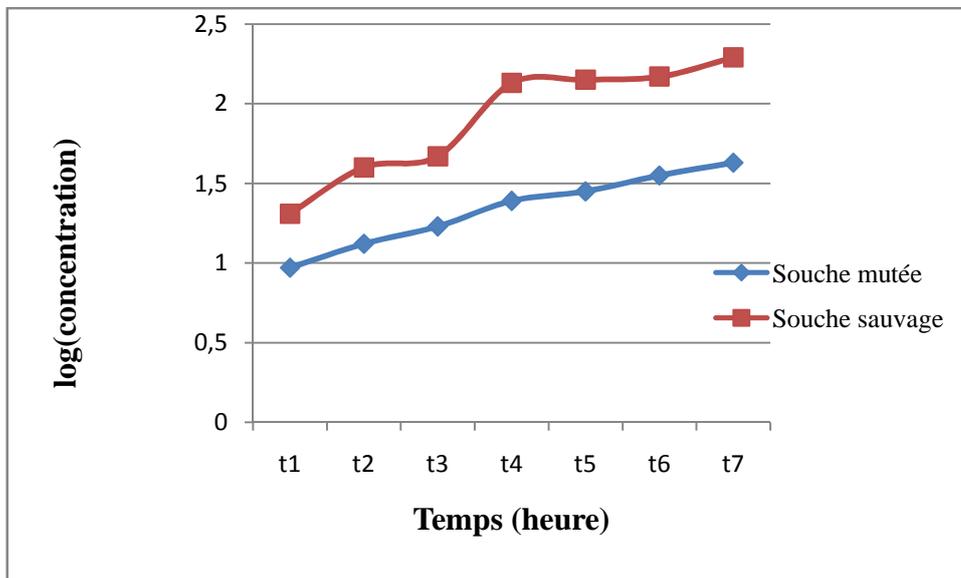


Figure n°47 : La cinétique de croissance des souches sauvage et mutée

La courbe de la cinétique de croissance des souches sauvage et mutée est obtenue à partir des concentrations, des prélèvements effectués à des intervalles de 2 heures 30 min, déduites de la courbe d'étalonnage, elle présente une allure croissante pour les deux souches car il s'agit seulement de la phase exponentielle.

On remarque à partir des résultats que :

La concentration de la souche mutée obtenue à partir du premier prélèvement (c'est-à-dire après 2 heures et demi) est de l'ordre de 9,46 g/l, elle augmente progressivement jusqu'à ce qu'elle atteigne presque le double (environ 17,04 g/l) après un intervalle de temps de 5 heures, puis continue à croître lentement jusqu'à une concentration de 24,61 g/l après 19 heures, enfin, poursuit une croissance lente pour aboutir à une concentration de l'ordre de 43,55 g/l qui représente presque 5 fois plus que la concentration obtenue au premier prélèvement après 49 heures.

Cependant la concentration de la souche sauvage obtenue lors du premier prélèvement est de l'ordre de 20,82 g/l (obtenue à t_1 c'est à dire après 2,5 heures de temps), et croit rapidement pour arriver au double, à t_2 , seulement après 5 heures d'intervalle (39,76 g/l), ensuite la croissance ralentit pour atteindre 47,34 g/l après 19 heures, puis la croissance se poursuit rapidement jusqu'à une concentration de 134,44 g/l après 49 heures, représentant environ 7 fois la concentration obtenue lors du premier prélèvement.

VI -2- Taux de croissance des souches mutée et sauvage

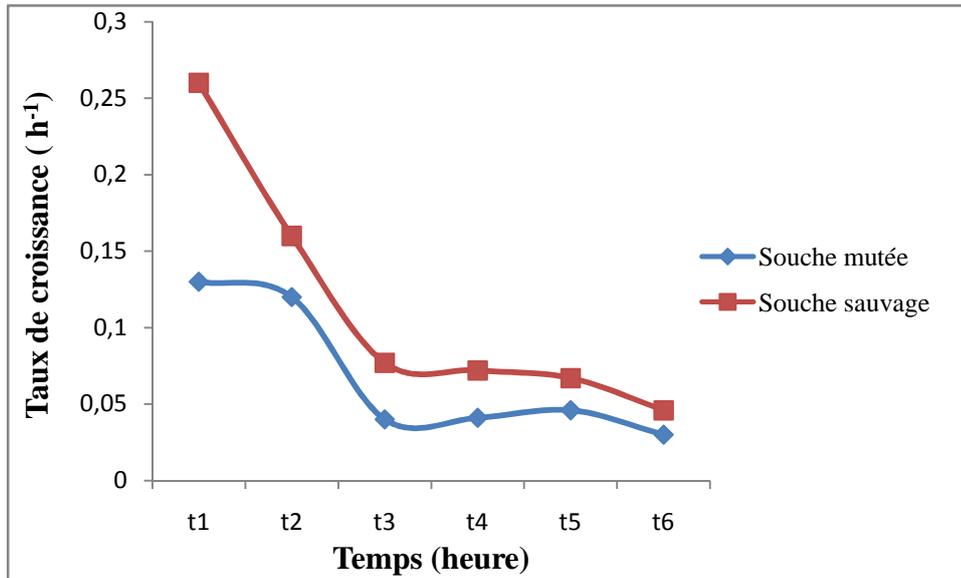


Figure n°48:Taux de croissance des souches sauvage et mutée

Le taux de croissance (μ), est déterminé à partir de la phase exponentielle de la courbe de croissance en utilisant les équations suivantes (El-Mansi et Bryce, 1999).

$$\text{Log } n - \text{log } n_0 / t - L = \text{log } 2/T$$

$$\text{Ln } 2 = \mu T \quad \longrightarrow \quad \mu = \text{ln } 2/T$$

Tel que :

T : le temps où le nombre de cellules est double ;

L : temps de latence ;

n : nombre de cellules à un temps (t) ;

n_0 : nombre initial des cellules bactériennes ;

μ : taux de croissance.

La détermination de μ_{max} est donnée par la relation suivante : $\mu = \mu_{\text{max}}/2$.

Exemple

Pour la souche sauvage :

$$(\text{Log } 39,76 - \text{log } 20,82) / 2,5 = \text{log } 2/T \quad \longrightarrow \quad T = 10,70 \text{ h}$$

$$\text{ln } 2 = \mu T \quad \longrightarrow \quad \mu = \text{ln } 2/T = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_{\max} = 2 \times \mu = 0,26 \times 2 = 0,52 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_{\max} = 0,52 \text{ h}^{-1}$$

Pour la souche mutée:

$$(\log 13,25 - \log 9,46) / 2,5 = \log 2 / T \quad \longrightarrow \quad T = 5,14 \text{ h}$$

$$\ln 2 = \mu T \quad \longrightarrow \quad \mu = \ln 2 / T = 0,13 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_{\max} = 2 \times \mu = 0,13 \times 2 = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_{\max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

Après 19 heures de fermentation, la souche mutée de *Corynebacterium glutamicum*, atteint un taux de croissance de l'ordre de $0,13 \text{ h}^{-1}$, autrement dit le taux de croissance observé après cette étape de culture est de $0,13 \text{ h}^{-1}$.

Le taux de croissance diminue faiblement après un intervalle de temps de 2,5 heures, en passant de $0,13 \text{ h}^{-1}$ à $0,12 \text{ h}^{-1}$ puis subit une chute libre pour atteindre seulement $0,04 \text{ h}^{-1}$ après un même intervalle de temps, ensuite le taux de croissance reste presque stable même après 21,5 heures, enfin subit une faible diminution en passant de $0,046 \text{ h}^{-1}$ à $0,031 \text{ h}^{-1}$ après 49 heures.

En revanche, pour la souche sauvage, le taux de croissance atteint après 19 heures est de $0,26 \text{ h}^{-1}$, puis vient une diminution significative en passant de $0,26 \text{ h}^{-1}$ à $0,16 \text{ h}^{-1}$ après seulement 2,5 heures d'intervalle, puis la décroissance se poursuit fortement pour arriver seulement à $0,077 \text{ h}^{-1}$ (environ la moitié du taux de croissance précédent) après un intervalle de temps identique (2,5 heures), ensuite le taux de croissance reste presque stable c'est-à-dire $0,072 \text{ h}^{-1}$ après 19 heures puis commence à décroître pour atteindre $0,067 \text{ h}^{-1}$ après seulement 2,5 heures et enfin continue à diminuer légèrement pour aboutir à $0,046 \text{ h}^{-1}$ après 49 heures.

La diminution du taux de croissance pour la souche sauvage et la souche mutée est due à l'épuisement des nutriments qui sont consommés par ces dernières, surtout le glucose qui est considéré parmi les principaux produits de croissance (Lee, 1994), et à la production de l'acide glutamique par la souche sauvage qui rend le milieu acide, cette acidité exerce une

action toxique sur cette dernière, ainsi qu'à la surproduction de lysine par la souche mutée qui peut rendre le milieu basique perturbant ainsi sa croissance (Guiraud, 2003), sachant que le pH optimum de *Corynebacterium glutamicum* est neutre ou légèrement basique (7-9) d'où la nécessité de réajustement de pH au cours de la fermentation (Kinoshita, 1972).

VI- 2- 1- Consommation du glucose

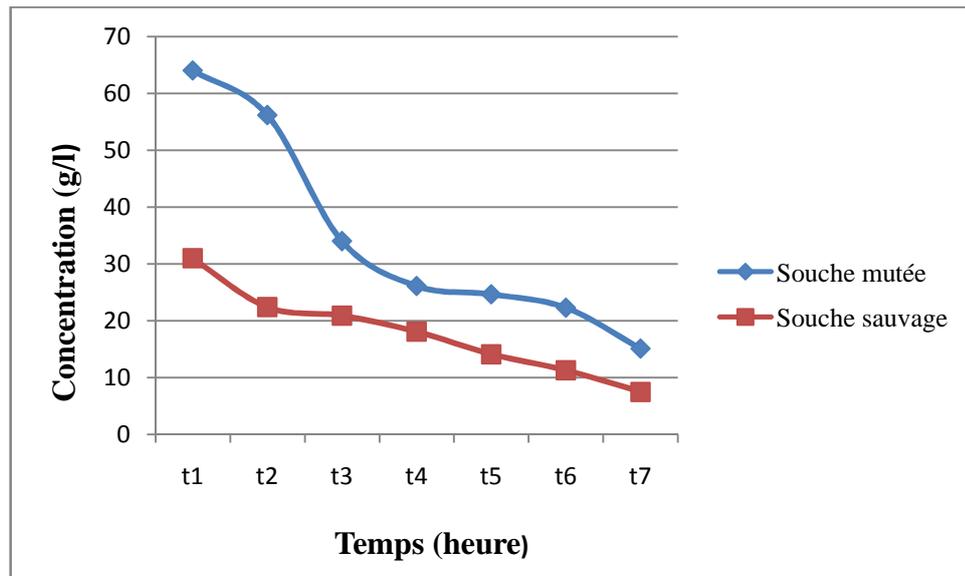


Figure n°49 : Consommation de glucose par les deux souches

Les résultats montrent que la consommation du glucose par la souche sauvage est plus importante que celle de la mutée. Au départ, la concentration en glucose était de 100 g/l dans le milieu des deux souches ; le premier prélèvement, effectué après 19 heures de culture, a montré qu'il ne restait que 30,95 g/l dans le milieu contenant la souche sauvage par rapport à 64 g/l pour la mutée, puis une consommation progressive se poursuit en passant de 30,95 g/l à 07,48 g/l et de 64 g/l à 15,07 g/l au dernier prélèvement pour les deux souches respectivement.

La consommation du glucose est plus importante pour la souche sauvage que pour la mutée, puisque les transporteurs de glucose de cette dernière sont inhibés (système de Phosphoénol pyruvate transférase) lors de la production de la lysine (Lee, 1994), tandis que ceux de la sauvage sont intacts se traduisant par une augmentation de la biomasse.

VI- 2- 2- Dosage de la lysine produite

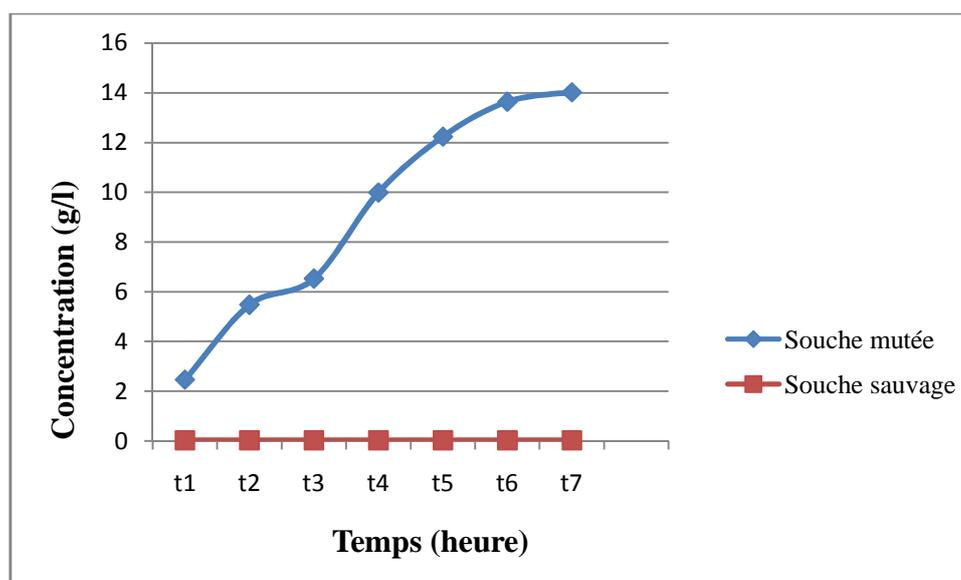


Figure n° 50 : Dosage de la lysine produite par la souche mutée

Selon les résultats obtenus, la souche sauvage produit des quantités infimes de lysine sous forme de traces dans le milieu par excrétion, puisque *Corynebacterium glutamicum* excrète seulement les acides aminés basiques comme la lysine et les acides aminés neutres dans le milieu extérieur, tandis que pour la souche mutée la production de la lysine est élevée et augmente progressivement jusqu'à une concentration de 14g/l, car le but de la mutation est la surproduction de la lysine.

La mutation a été effectuée sur un gène entraînant un blocage de L-homosérine qui résulte de la suppression de l'activité enzymatique de l'homosérine déshydrogénase, cette voie de biosynthèse aboutissant à la synthèse de la méthionine et thréonine est préférentielle car l'activité de cette enzyme est 15 fois plus importante que celle de la dihydrodipicolinate synthétase (la première enzyme de la voie de biosynthèse de la lysine) (Plachy, 1984 ; Shiio et Nakamori, 1989), d'où la nécessité de supprimer l'activité de l'homosérine déshydrogénase entraînant ainsi la surproduction de lysine (Shiio et Nakamori, 1989).

D'après tous les résultats obtenus, les concentrations et le taux de croissance de la souche sauvage sont presque le double de ceux de la mutée puisque 39 % de source de carbone (glucose), pour la souche mutée sont destinés à la production de la biomasse et 61% à la production de la lysine (Simon, 2004), alors que pour la souche sauvage, tout le glucose est utilisé pour la croissance, où cette dernière peut synthétiser des micro-quantités de

métabolites dont la souche a besoin pour la croissance (Dominguez, 1994) car les systèmes de régulation sont en place, de ce fait le glucose est considéré parmi les composés principaux de croissance (Lee, 1994),

V-Etude de l'effet de la source de carbone sur la productivité en lysine et la croissance de la souche mutée

❖ le 1^{er} milieu (milieu de base + 30 g/l de glucose).

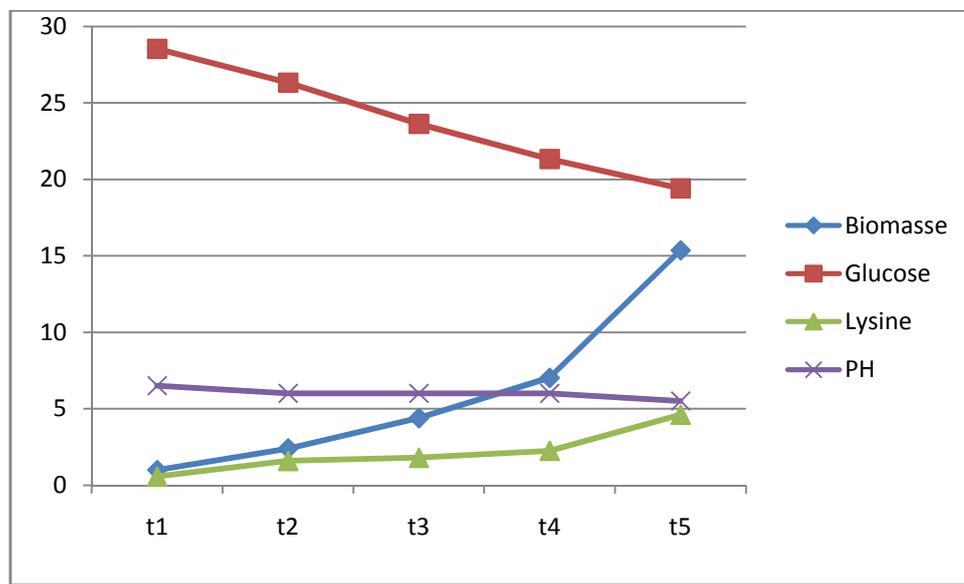


Figure n° 51 : Résultats du dosage de lysine, du glucose, du pH et de la biomasse.

La fermentation se caractérise par une période d'adaptation de la bactérie au milieu et sera voué essentiellement à la synthèse des enzymes nécessaires au métabolisme.

Mais on remarque une vitesse de consommation du glucose assez importante et ce dès le début de la fermentation à l'inverse de la production de lysine ou l'augmentation de la biomasse où la vitesse de production est assez lente due principalement à ce phénomène d'adaptation qui dure de deux à quatre heures et dépend de l'espèce bactérienne, de la quantité d'inoculum introduite dans le milieu, de l'âge des bactéries et de la composition du milieu (Lee, 1994).

Puis, on signale une augmentation, rapide et exponentielle, de la biomasse correspondant à la phase d'accélération ou phase exponentielle. On remarque, durant cette période, que le

taux de croissance est maximum et constant, la biomasse est de l'ordre de 15,36 g/l est associée à une production relativement significative de lysine qui atteint 4,6 g/l après 24h de fermentation.

La production de lysine et de biomasse est inversement proportionnelle à la consommation de glucose qui atteint en fin de fermentation les 19,46g/l.

De son coté on observe une diminution progressive du pH qui atteint en fin de fermentation une valeur de 5,5. Cet abaissement est entrainé par un déséquilibre ionique qui agit sur les composants de la membrane cytoplasmique qui est peu perméable aux ions H^+ et OH^- (Senz, 1968) et il est surtout dû au métabolisme de la bactérie qui produit, en plus de l'acide aminé, de l'acide lactique mais aussi du CO_2 . Mais c'est surtout la consommation des produits basiques, du milieu, qui l'acidifie.

❖ le 2^{ème} milieu (milieu de base + 30 g/l de saccharose).

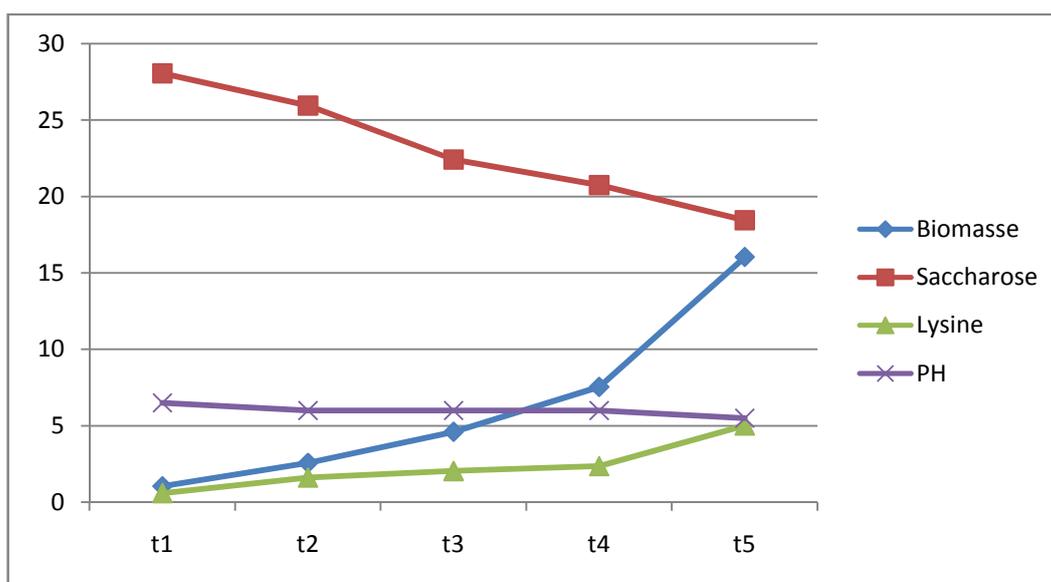


Figure n°52: Résultats du dosage de lysine, du saccharose, du pH et de la biomasse.

La fermentation du milieu contenant le saccharose comme source de carbone se caractérise, aussi, par une phase d'adaptation où les productions de biomasse et de lysine sont très infimes, à l'inverse la vitesse de consommation de saccharose est relativement importante et cette énergie sera, presque exclusivement utilisée par la bactérie pour son adaptation et la mise en sa disponibilité d'enzymes nécessaires à son métabolisme (Guiraud, 2003).

Une seconde phase correspondant à une période intense où le taux de croissance est maximum et constant et après 24h de fermentation, on remarque aussi que la production de la lysine atteint sa valeur maximale avec une concentration de 5,02 g/l. Cette production est accompagnée d'une augmentation de la turbidimétrie de l'ordre de 16,03 g/l et en fin de la fermentation la quantité de saccharose est de 18,44 g/l. On constate aussi une diminution du pH qui était, en début de fermentation, neutre et ayant une valeur de 7,3 pour atteindre à la fin du processus les 5,5 suite au métabolisme de la bactérie et à la composition du milieu influant, donc, sur la productivité en lysine car selon Kinoshita (1972), le pH optimum pour la croissance des bactéries productrices des acides aminés est au voisinage de la neutralité ou légèrement alcalin et pour la production de lysine, le pH optimum doit-être au voisinage de 7,3 où il y'a un équilibre ionique du milieu ce qui agit sur la perméabilité (Guiraud, 1998).

De ce qui précède, on peut avancer que le glucose est plus rapidement assimilé car c'est un sucre simple alors que le saccharose est un sucre complexe formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose il prendra un peu plus de temps pour se dégrader.

Le deuxième milieu contenant le saccharose présente un meilleur rendement en lysine avec 5,02g/l produits pour une consommation de substrat de 11,56g/l alors que pour le glucose, on observe une production de 4,6g/l pour une consommation de substrat de 10,54g/l, de même pour la biomasse où on est en présence de 16,03g/l pour le saccharose et 15,36g/l pour le glucose.

VI-Etude de l'influence de l'acétate sur la productivité en lysine ainsi que la croissance de la souche

VI - 1 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le premier milieu de culture à base de glucose et de sulfate d'ammonium

❖ le 1^{er} milieu (milieu de base + 30 g/l de glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

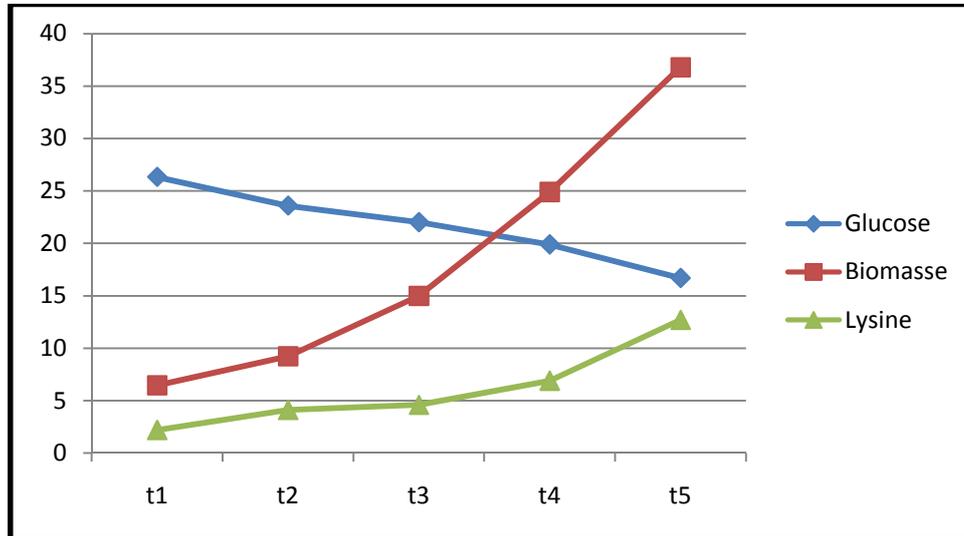


Figure n° 53: Résultats de dosage de lysine, de glucose et biomasse dans le 1^{er} milieu

La souche mutée de *Corynebacterium glutamicum* servi à inoculer un milieu contenant le glucose comme source de carbone dont la fermentation se caractérise par une augmentation, rapide et exponentielle, de la biomasse ainsi qu'une production relativement rapide de la lysine.

L'augmentation de biomasse atteint les 36,78g/l, celle-ci est associée à une production considérable de lysine qui atteint 12,7g/l après 24h de fermentation.

On remarque que la production de lysine et de biomasse par *Corynebacterium glutamicum* est proportionnelle à la consommation de glucose qui atteint en fin de fermentation 16,7g/l.

VI - 2 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le second milieu de culture à base de glucose, d'acétate d'ammonium et de sulfate d'ammonium

❖ Le 2^{ème} milieu (milieu de base + 7 g/l d'acétate d'ammonium+(NH₄)₂SO₄)

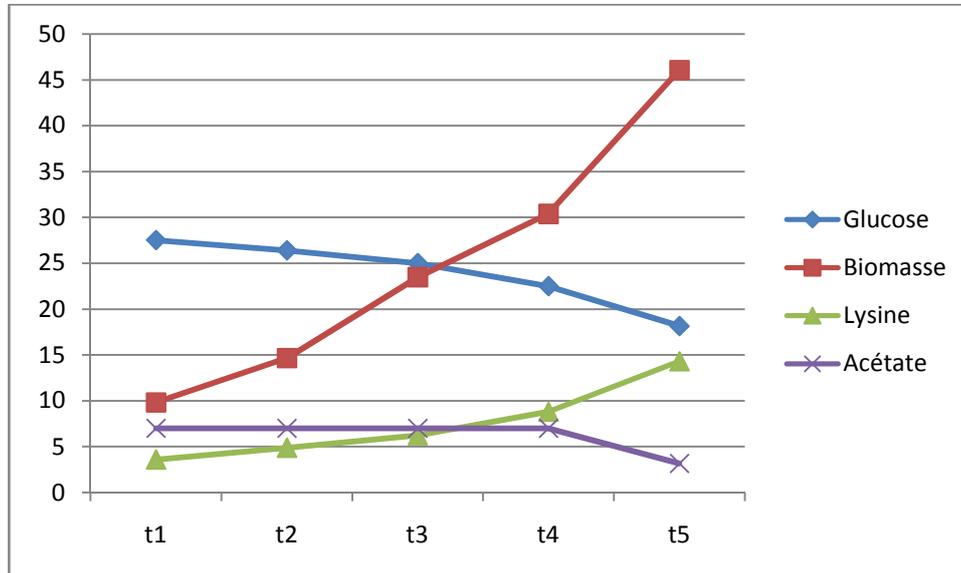


Figure n° 54: Résultats de dosage de lysine, de glucose, biomasse et l'acétate dans le 2^{ème} milieu.

La croissance des corynébactéries dépend d'un apport de composés carbonés. Le milieu de fermentation est à base de glucose comme sources de carbone et d'acétate d'ammonium comme source de carbone et d'azote. On observe une consommation continue de glucose et ce dès le début de la fermentation tandis que celle de l'acétate ne se déclenche qu'après 14h de fermentation. Cela peut être expliqué par le fait que les bactéries commencent à utiliser le glucose qui est le substrat le plus simple afin de synthétiser les enzymes indispensables pour pouvoir assimiler l'acétate (phase d'adaptation), on remarque aussi que la synthèse de lysine est stationnaire et ne se déclenche effectivement et significativement qu'à la fin de t₁ et le début de t₂, c'est-à-dire que la consommation de glucose a servi à la croissance de la souche ainsi qu'à la synthèse des enzymes spécifiques à la dégradation et à l'assimilation de l'acétate.

A t₄, on remarque un démarrage de la consommation de l'acétate en parallèle avec une accélération de la vitesse de production de la lysine

Après 24h de fermentation, la production de lysine atteint sa valeur maximale avec une concentration de 14,3g/l accompagnée par une augmentation remarquable de la turbidimétrie de l'ordre de 46,06g/l.

En fin de fermentation, la quantité de glucose et l'acétate restant dans le milieu est de 18,16g/l et 23,19g/l respectivement.

VI-3 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le troisième milieu de culture à base d'acétate d'ammonium et de sulfate d'ammonium

❖ Le 3^{ème} milieu (milieu de base + 7 g/l d'acétate d'ammonium+ $(NH_4)_2SO_4$)

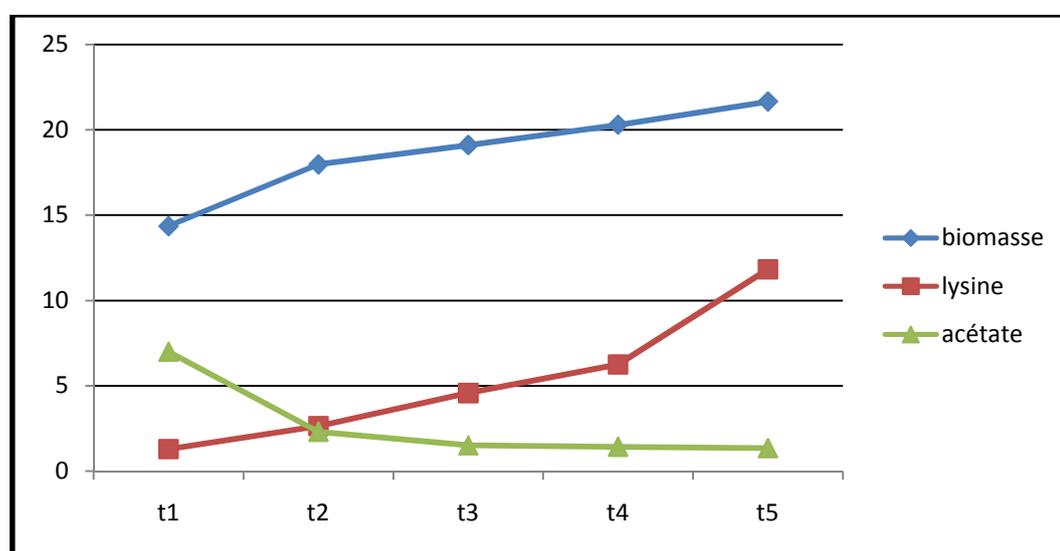


Figure n° 55: résultats de dosage de biomasse, lysine et acétate

Dans ce milieu, la fermentation se caractérise par un démarrage très faible dû à la nature des sources de carbone et d'azote, la production de biomasse à t₁ n'est que d'environ 70% que celle produite dans le milieu n°2, pour atteindre la quantité de 21,65g/l avec une augmentation faible et lente par opposition à la période comprise entre t₁ et t₂ où on a remarqué qu'il y avait une vitesse de production très importante suivi d'un certain ralentissement dû au pH très acide du milieu inhibant ou entravant la croissance car l'acétate est un composé très complexe pour la souche et sa consommation serait très lente. Mais cela n'a pas de relation avec la production de la

lysine qui marque une certaine stabilité pour atteindre les 11,82g/l après 24h. Autrement dit, il n'y a aucune relation entre le rendement en biomasse et le rendement en lysine et la souche utilise l'acétate pour produire la lysine malgré que sa croissance soit entravée par ce même substrat.

VI – 3 – Dosage de la biomasse, glucose et lysine dans le quatrième milieu de culture à base d'acétate de sodium et d'acétate d'ammonium

❖ Le 4^{ème} milieu (milieu de base + acétate de sodium + acétate d'ammonium)

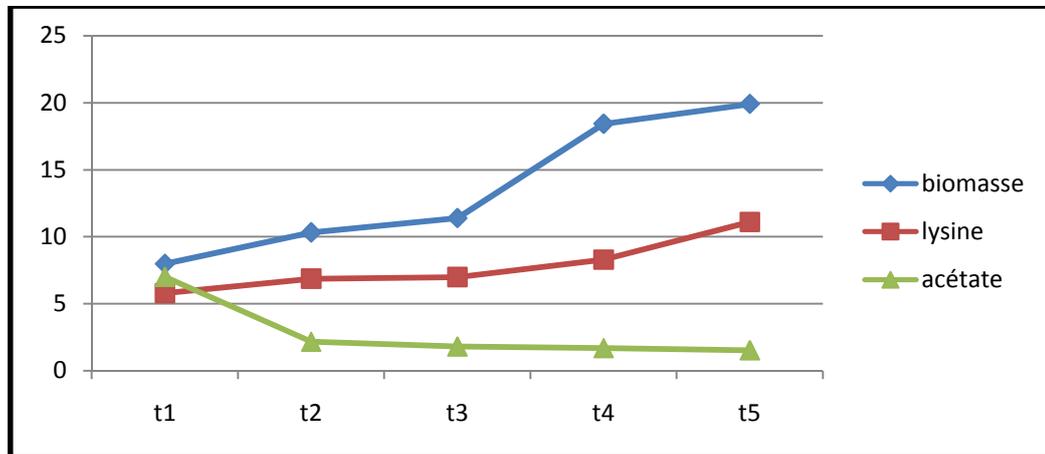


Figure n° 56 : Résultats de dosage de biomasse, de lysine et de l'acétate dans le 4^{ème} milieu.

Les résultats pour le 4^{ème} milieu montrent que la consommation de l'acétate d'ammonium et d'autres sels d'acétate (acétate de sodium) aboutit à une croissance encore plus faible et que la consommation d'acétate n'est effective que durant la première période entre t₁ et t₂, car au-delà la consommation est faible et malgré l'acidité élevée du milieu, une production de lysine, faible au début apparait et atteint presque le même taux que celle produite dans le milieu n° 3.

VII - Etude de l'influence de la pression osmotique sur la productivité en lysine et la viabilité des deux souches mutée et sauvage

VII- 1 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le premier milieu

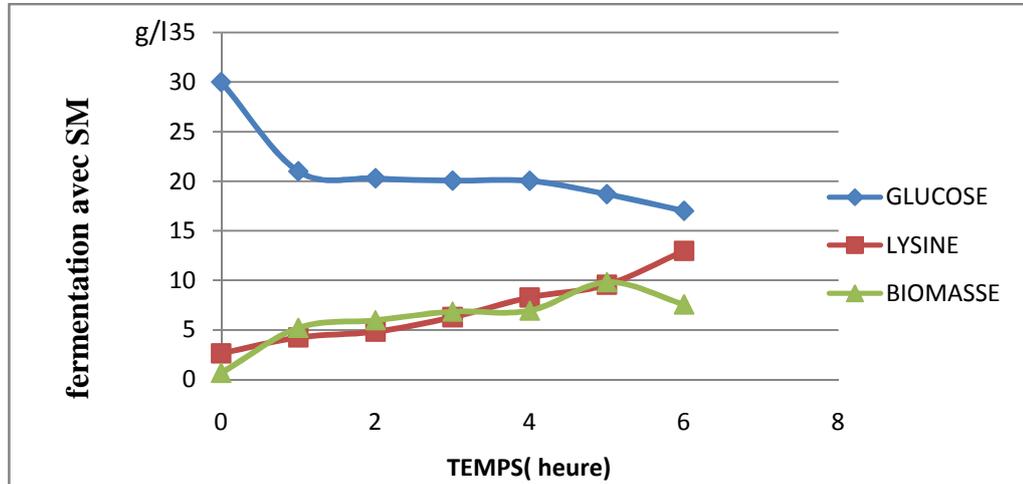


Figure n° 57: les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 0,5g/l d' NaCl pour la souche mutée

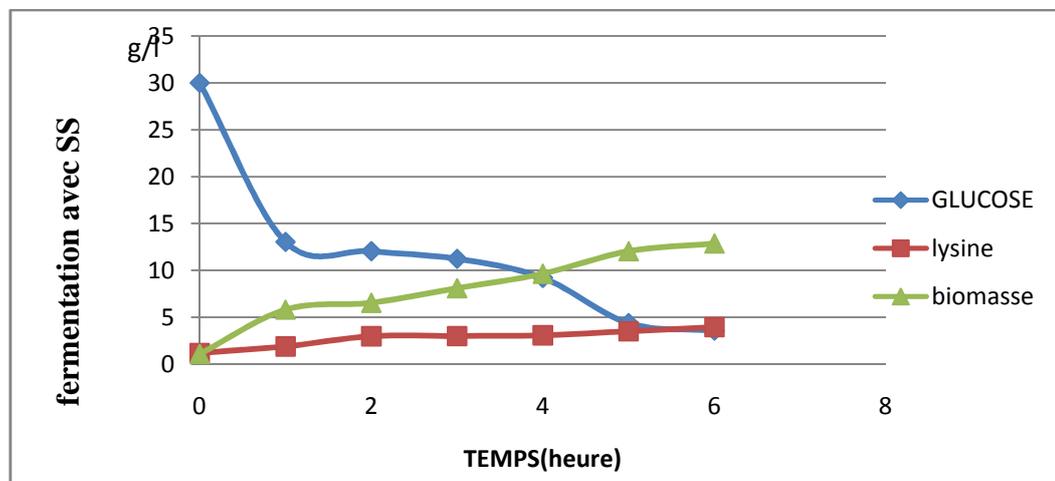


Figure n°58 : les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 0,5g/l d' NaCl pour la souche sauvage

Concernant le premier milieu qui comporte une concentration en sel de 0,5g/l on remarque que la consommation de glucose est relativement plus rapide pour la souche sauvage que pour la mutée. On constate que dès le premier prélèvement la quantité de glucose dans le milieu chute de 30g/l à 13,05g/l pour la souche sauvage et uniquement de 30g/l à 21,01g/l pour la souche mutée, en même temps la croissance est plus rapide pour la souche

sauvage que pour la souche mutée (12,87g/l et 7,57g/l respectivement) alors pour la production de lysine, la souche mutée produit relativement beaucoup plus de lysine que la souche sauvage (12,98g/l et 3,98g/l respectivement), ceci est vrai car la souche sauvage de *Corynebacterium glutamicum* ne produit pas ou produit très peu de lysine alors que la souche mutée utilisée est une souche auxotrophe donc les mécanismes de régulation ont été levés permettant à la bactérie d'excréter la lysine dans le milieu de culture.

De ce qui précède, on peut avancer que la quantité d'NaCl (0,5g/l) ajoutée dans le milieu de culture n'influe pas sur la viabilité de la bactérie ni sur la productivité en lysine malgré que cette quantité qui affecte, forcément, la pression osmotique du milieu mais cette augmentation ne provoque pas de conséquences sur le métabolisme de la souche.

VII- 2 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 2^{ème} milieu

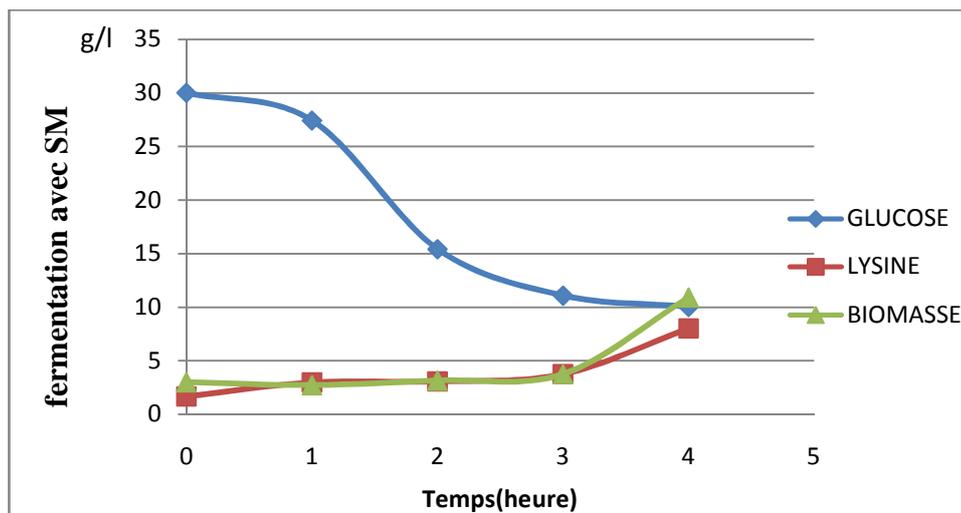


Figure n° 59: les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1g/l d' NaCl pour la souche mutée

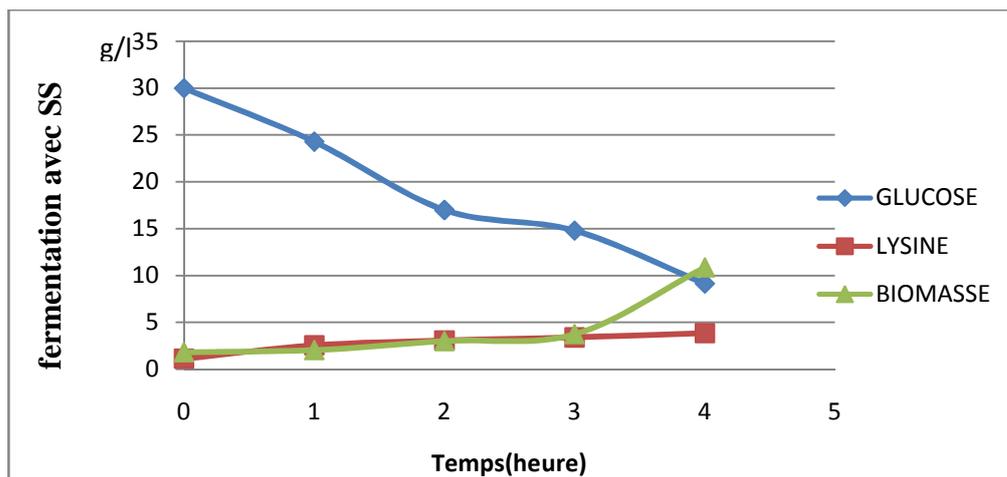


Figure n° 60 : les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1g/l d' NaCl pour la souche sauvage

Concernant le deuxième milieu dont la concentration en NaCl est de 1g/l, la consommation de glucose durant la 1^{er} période c'est-à-dire t_1 est très rapide pour la souche sauvage que pour la souche mutée mais s'accélère beaucoup plus dans les autres phases, alors que la production de lysine et l'évolution de la biomasse, avec le temps, suivent une cinétique presque analogue où on atteint des valeurs de 10,89g/l pour les deux souches pour la biomasse et de 3,87g/l et 10,02g/l (souche sauvage et souche mutée respectivement) pour la lysine. Nous remarquons que la pression osmotique n'a pas d'effet notable sur la croissance ni sur la viabilité de la bactérie ni sur la production de lysine par la souche mutée de *Corynebacterium glutamicum* et que la quantité de 1g/l d'NaCl n'a aucun effet sur la pression osmotique. Ce résultat est analogue à celui trouvé pour le milieu à 0,5g/l de NaCl.

VII- 3 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 3^{ème} milieu

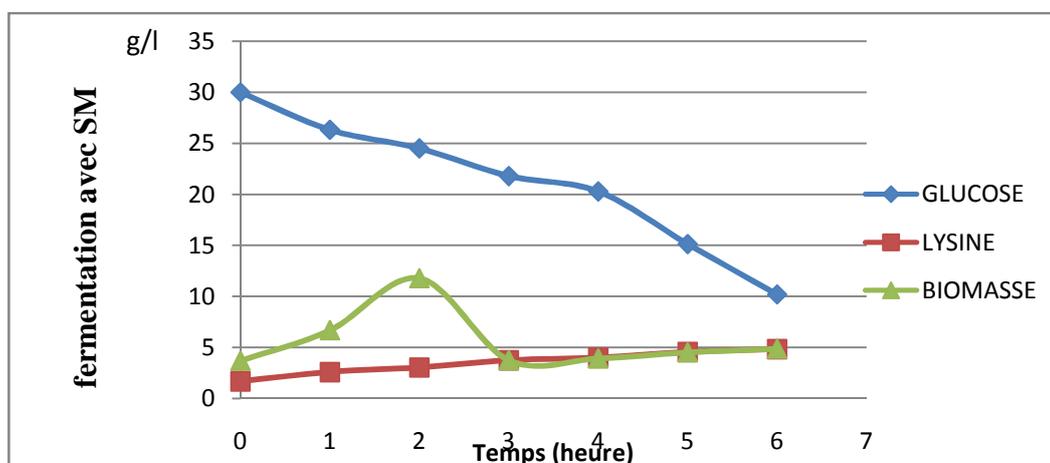


Figure n° 61 : les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1,5g/l d' NaCl pour la souche mutée

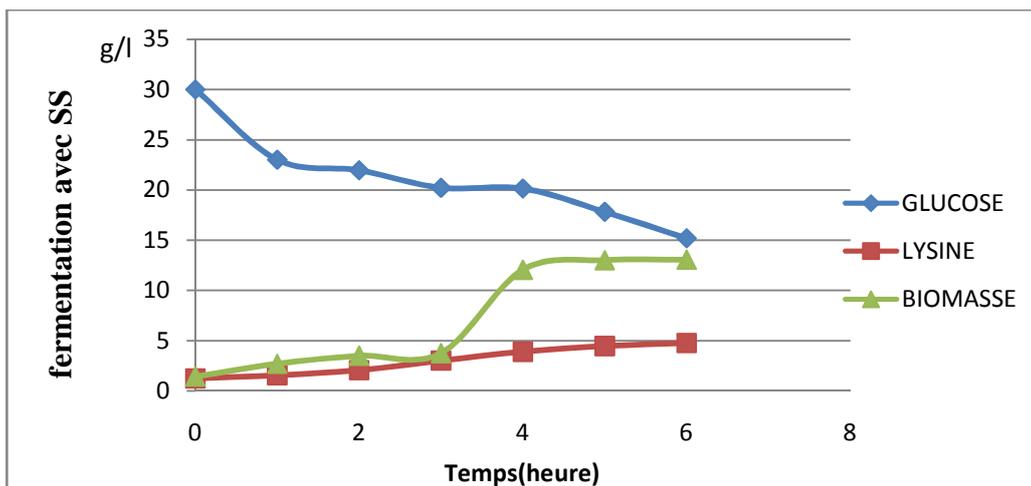


Figure n° 62 : les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1,5g/l d' NaCl pour la souche sauvage

Pour le 3^{ème} milieu où on ajoutée une quantité d'NaCl de 1,5g/l milieu et concernant la consommation du glucose le même constat est relevé. Nous remarquons une consommation rapide du glucose beaucoup plus accentuée chez la souche mutée que la souche sauvage, par contre l'évolution de la biomasse est totalement différentes ou nous assistons à un développement graduel chez la souche sauvage alors que pour la souche mutée elle débute par une augmentation rapide de la biomasse puis une chute très importante entre t_2 et t_3 et puis un semblant de stabilité de cette biomasse jusqu'à la fin de fermentation, alors que pour la production de lysine nous remarquons une augmentation mais lente et régulière jusqu'à la stabilité à la fin du temps de fermentation.

Nous suspectons un effet de la pression osmotique qui s'est déclenché à la concentration de 1,5g/l du sel car l'augmentation de l'osmolarité induit une diminution du taux de croissance et du rendement en biomasse qui traduit une redistribution du flux carboné vers les mécanismes de réponse au stress osmotique (Guillouet et Engasser, 1996).

Alors que cet effet n'est pas établi chez la souche sauvage, ceci peut être dû la fragilisation de la paroi cellulaire de la souche mutée à cause de l'effet de mutation ou à une modification des flux énergétiques associés à la redistribution du métabolisme.

VII- 4 – Dosage du glucose, lysine et biomasse dans le 4^{ème} milieu

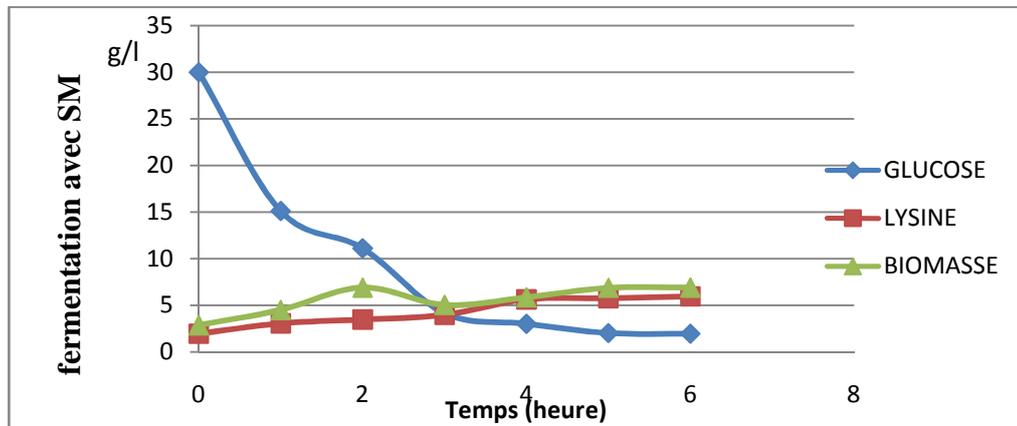


Figure n° 63: les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 2 g/l d' NaCl pour la souche mutée

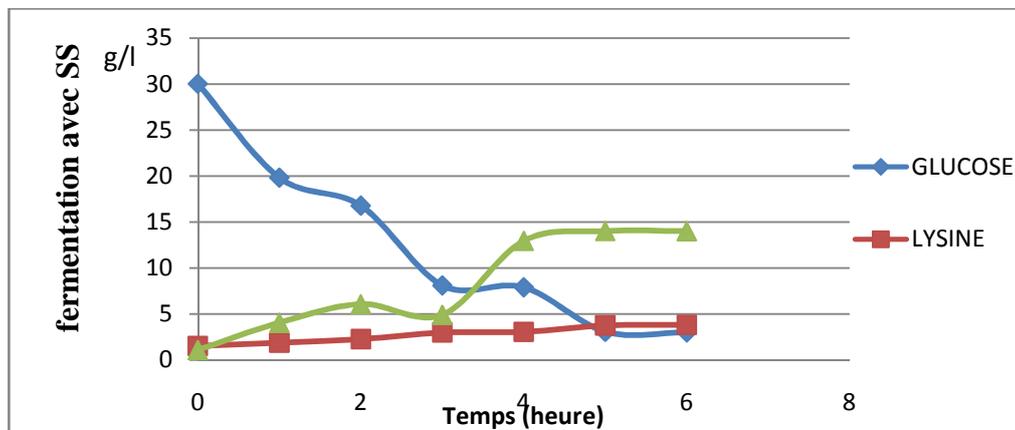


Figure n° 64 : les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 2 g/l d' NaCl pour la souche sauvage

Pour le 4^{ème} milieu dont la composition comporte 2 g/l d'NaCl, les mêmes constatations sont faites que pour le 3^{ème} milieu que se soit pour la consommation de glucose que pour la production de lysine et l'évolution de la biomasse. Mais à t_5 c'est-à-dire vers la fin de la fermentation, nous remarquons un arrêt de la production de lysine, un arrêt de la consommation de glucose ainsi qu'arrêt de la croissance de la biomasse et ce pour les deux souches sauvage et mutée, donc établissement d'une pression osmotique assez prononcée entraînant l'arrêt total du métabolisme des deux souches. Nous pouvons, aussi, avancer que

l'effet de l'osmolarité sur la souche sauvage commence à partir d'une concentration à 2g/l de sel.

Dans un tel milieu, la pression osmotique représente une menace sérieuse pour l'intégrité des cellules microbiennes, qui pourraient éclater (lyse cellulaire). Chez tous les microorganismes, une paroi cellulaire contenant des polymères tels que le peptidoglycane, chez les bactéries et la chitine, chez les levures et les moisissures donne une rigidité aux cellules et leur confère ainsi une protection contre la lyse osmotique. Par contre, si les cellules sont placées dans un milieu hypertonique, fortement concentré en ions ou autres solutés, la pression osmotique s'inverse et l'eau contenue dans les cellules traverse la membrane plasmique pour se retrouver dans le milieu. Cette perte d'eau entraîne la diminution du volume cellulaire, ce qui perturbe l'activité enzymatique et ralentit le métabolisme au point d'inhiber complètement la croissance si le milieu est très hypertonique (Charbonneau et *al.*, 2007).

VIII – Etude de l'effet de la quantité de thréonine et de méthionine sur la production et la croissance de la souche mutée

VIII – 1 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le premier milieu

❖ *Le 1^{er} milieu* (milieu de base + 50 g/l de glucose + 200 mg/l méthionine + 300 mg/l thréonine)

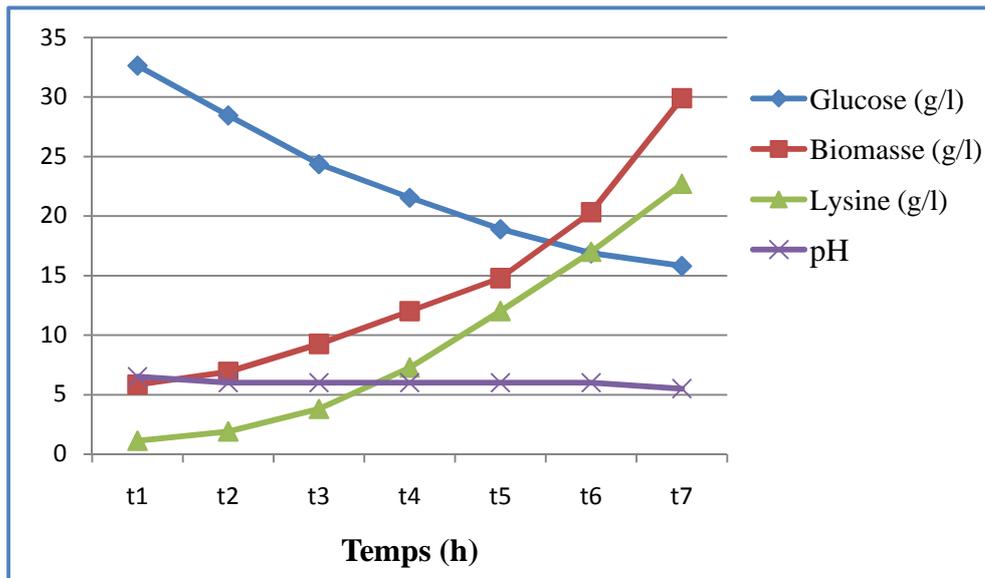


Figure n° 65 : Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 1^{er} milieu

Une souche mutée *Corynebacterium glutamicum* a servi à inoculer un milieu contenant le glucose comme source de carbone, 200 mg/l de méthionine et 300 mg/l de thréonine et dont la fermentation se caractérise par une augmentation de la biomasse ainsi qu'une production de la lysine qui apparaît être linéaire car nous remarquons une croissance rapide et avec une allure exponentielle. Durant cette période, le taux de croissance est constant, nous remarquons qu'au premier prélèvement (après 13 heures) la concentration de biomasse est de l'ordre de 5,85 g/l associée à une production de lysine de 1,13 g/l, mais la production n'apparaît en phase exponentielle que dès t₃ alors que l'augmentation de la biomasse ne change de vitesse qu'à t₅ pour atteindre les 29,89 g/l après 50 heures alors que la concentration de lysine atteint les 22,69 g/l. Ceci s'explique par le fait que la production de métabolites et en relation avec la croissance bactérienne. Cette production de lysine par les

auxotrophes en homoserine, apparaît, lorsque le milieu de culture contient de l'homoserine ou la thréonine plus méthionine en quantité suboptimale pour la croissance (Kinoshita, 1985).

La quantité de méthionine et de thréonine présente dans le milieu de culture favorise à la fois la croissance et la production de métabolite.

On remarque aussi que la production de lysine et de biomasse par *Corynebacterium glutamicum* est proportionnelle à la consommation de glucose qui atteint après 50 heures de fermentation 15,8g/l.

Une diminution progressive du pH, atteint en fin de fermentation une valeur de 5,5. Cet abaissement est surtout dû au métabolisme de la bactérie qui produit en plus de l'acide aminé en consommant une partie importante d'ammonium.

VIII – 2 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le second milieu

❖ *Le 2^{ème} milieu* (milieu de base + 50 g/l de glucose + 200 mg/l méthionine + 150 mg/l thréonine)

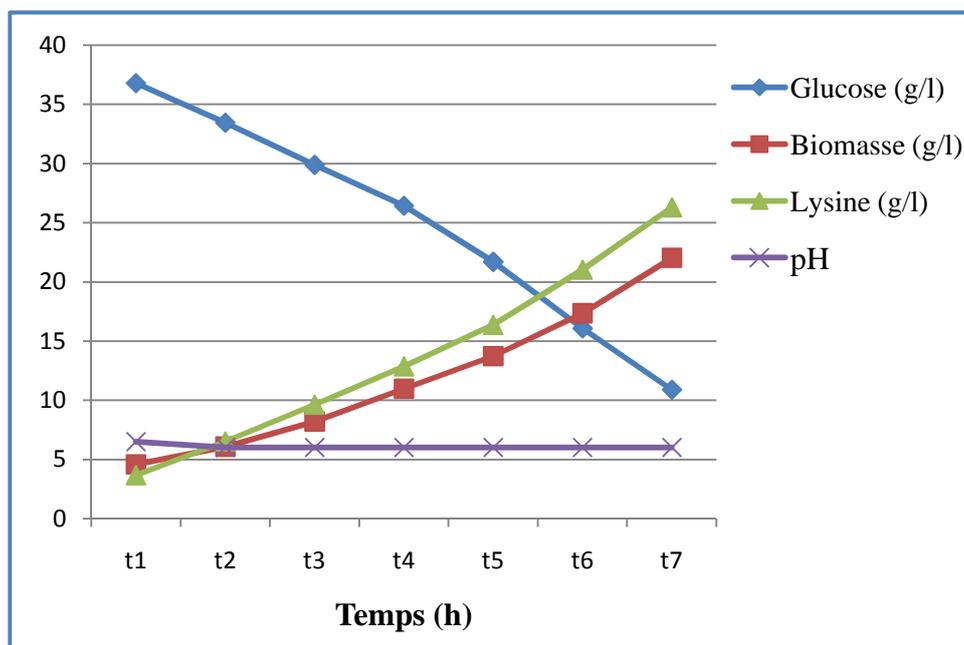


Figure n° 66: Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 2^{ème} milieu

Dans le deuxième milieu de culture, avec moins de thréonine que le premier milieu mais avec la même quantité de méthionine, on remarque une production plus importante en lysine, de l'ordre de 26,30 g/l alors qu'elle était de 22,69 g/l dans le premier milieu, à la fin de la fermentation, contre une diminution de la croissance par rapport au premier milieu, avec une quantité de biomasse de l'ordre 22,02 g/l alors qu'elle atteignait les 29,89 g/l dans le premier milieu, et une vitesse de consommation du glucose plus accrue.

Ceci suggère, d'une part, une augmentation du transport du glucose à l'intérieur de la bactérie et d'autre part, cet excès du glucose est dirigé vers la production de lysine au dépend de la croissance de la souche.

La quantité de lysine produite dans ce milieu est relativement élevée, cette production est due au faible effet de thréonine car la rétro-inhibition concertée de lysine et thréonine est levée par l'addition de méthionine, au milieu, en quantité suffisante.

VIII – 3 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le troisième milieu

❖ *Le 3^{ème} milieu* (milieu de base + 50 g/l de glucose + 75 mg/l méthionine + 200 mg/l thréonine)

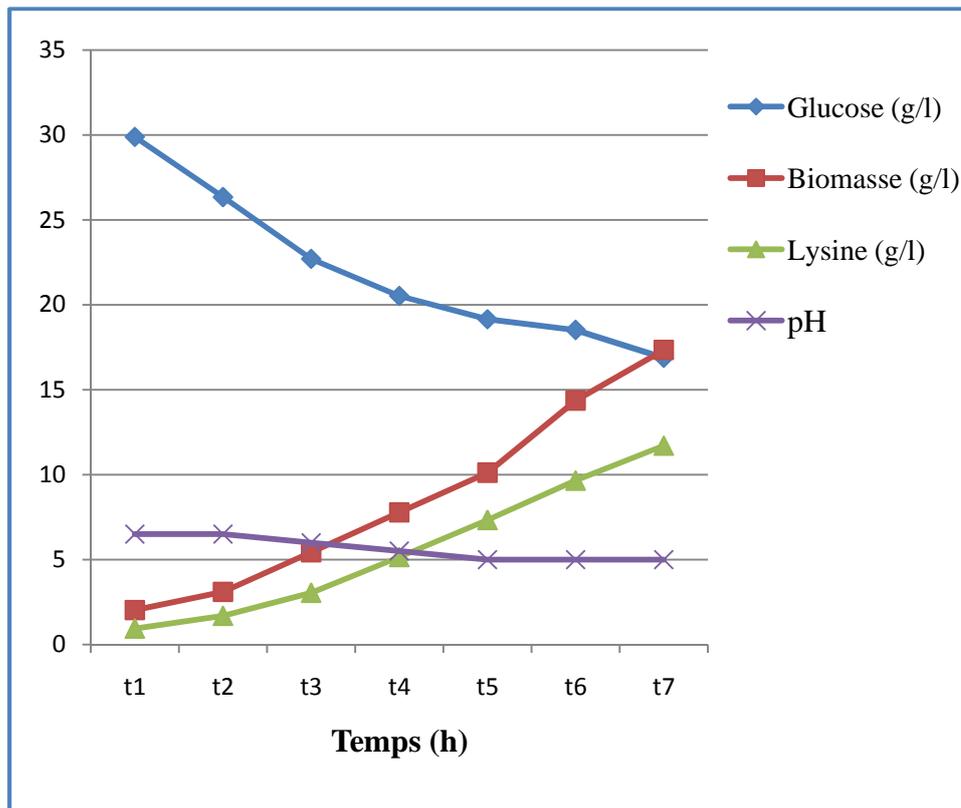


Figure n° 67 : Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 3^{ème} milieu

Dans le troisième milieu de culture, une limitation de la quantité de méthionine ajoutée bloque tout le métabolisme de la bactérie où nous remarquons que cette limitation en méthionine impose une diminution qui n'est pas « nette » de la biomasse qui atteint les 17,34 g/l mais qui bloque la production de lysine qui n'arrive à atteindre que les 11,71 g/l.

De la voie de biosynthèse et de régulation de la famille de l'aspartate, il apparaît qu'une diminution en méthionine lève la répression exercée sur l'homoserine deshydrogenase

et de ce fait la thréonine est produite car le gros du flux va vers sa biosynthèse entraînant un rétablissement de la rétro-inhibition concertée (lysine-thréonine) sur l'aspartokinase donnant de ce fait une croissance de la bactérie (la biomasse baisse mais pas de façon significative), par contre la production de lysine se trouve bloquée (Dale et Park, 2010). Deux aspects peuvent avoir lieu, d'un côté la diminution de la méthionine fait que la croissance est moins forte de l'autre côté, il n'y a plus de période de production au-delà de la période de croissance ce qui suppose qu'il y a eu une sélection d'un autre phénotype, par mutation naturelle, quand la croissance est bloquée.

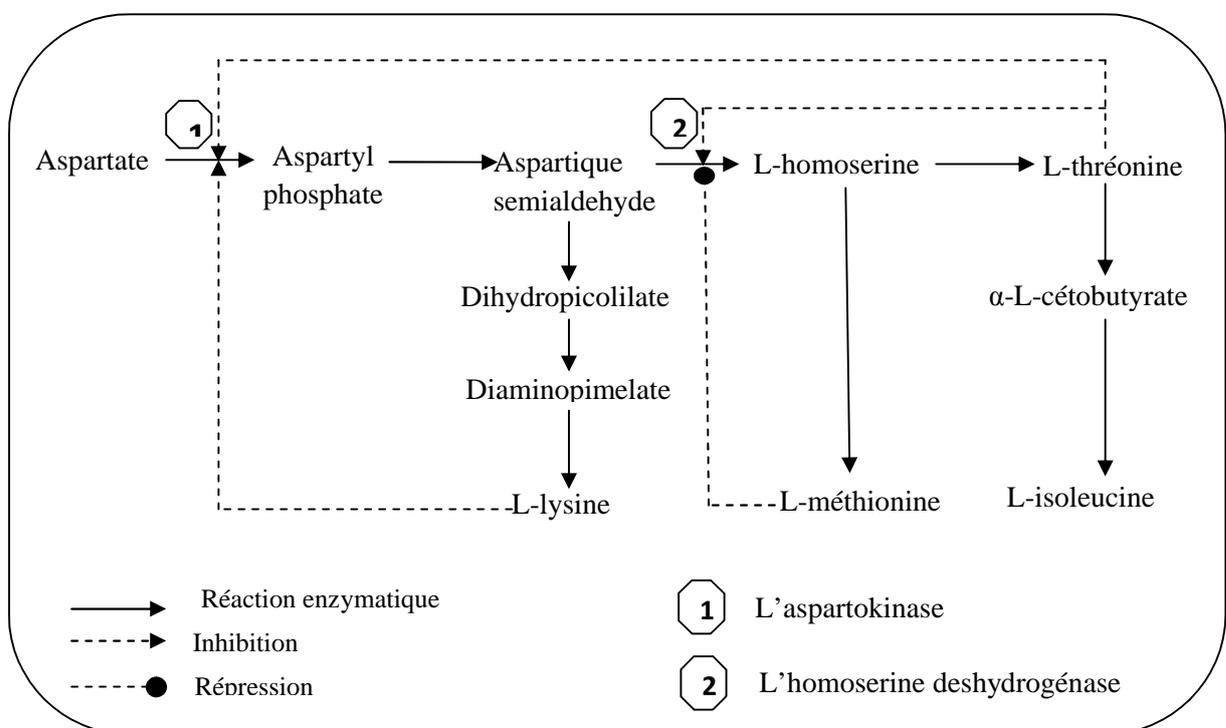


Figure n° 68 : Régulation de la biosynthèse de la L-lysine chez *Corynebacterium glutamicum* (Tryfona et Bustard, 2005)

VIII – 4 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le quatrième milieu

❖ *Le 4^{ème} milieu* (milieu de base + 50 g/l de glucose + 25 mg/l méthionine + 200 mg/l thréonine)

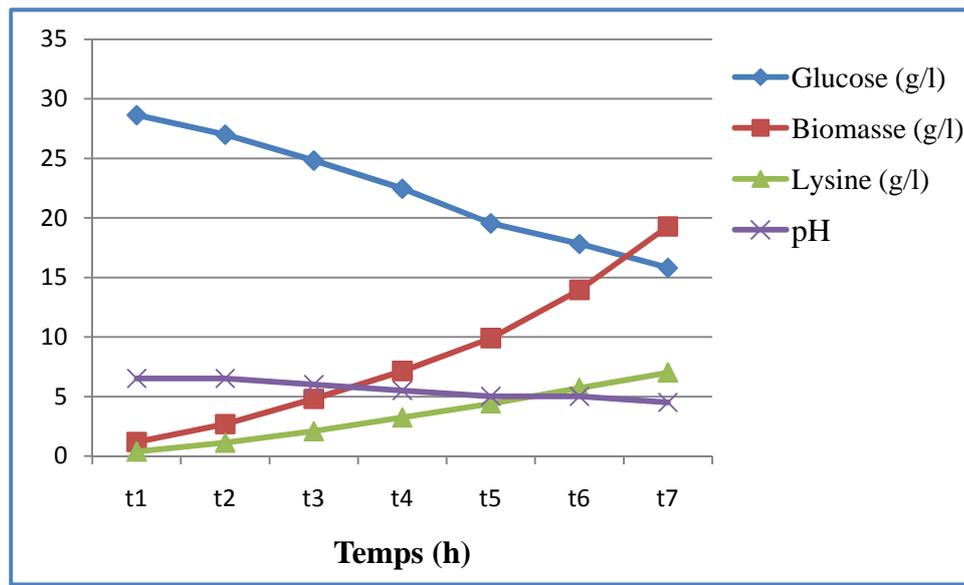


Figure n° 69: Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 4^{ème} milieu

Le quatrième milieu contenant des quantités plus faibles en méthionine, on observe une diminution plus nette de la production de lysine avec un taux de 7 g/l, une croissance, relativement, plus accrue de la biomasse de l'ordre de 19,26 g/l et enfin une vitesse de consommation de glucose plus grande.

Ceci suggère qu'il y a apparition de révertants, c'est-à-dire que la souche mutée est revenue à son état « sauvage », et cette apparition n'est remarquable qu'à partir de t₅ mais qu'elle est progressive et la vitesse de croissance commence à augmenter car la vitesse de sélection devient importante au moment de l'épuisement de la méthionine.

VIII – 5 – Dosage de la lysine, de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose dans le cinquième milieu

❖ *Le 5^{ème} milieu* (milieu de base + 50 g/l de glucose + 10 mg/l méthionine + 200 mg/l thréonine)

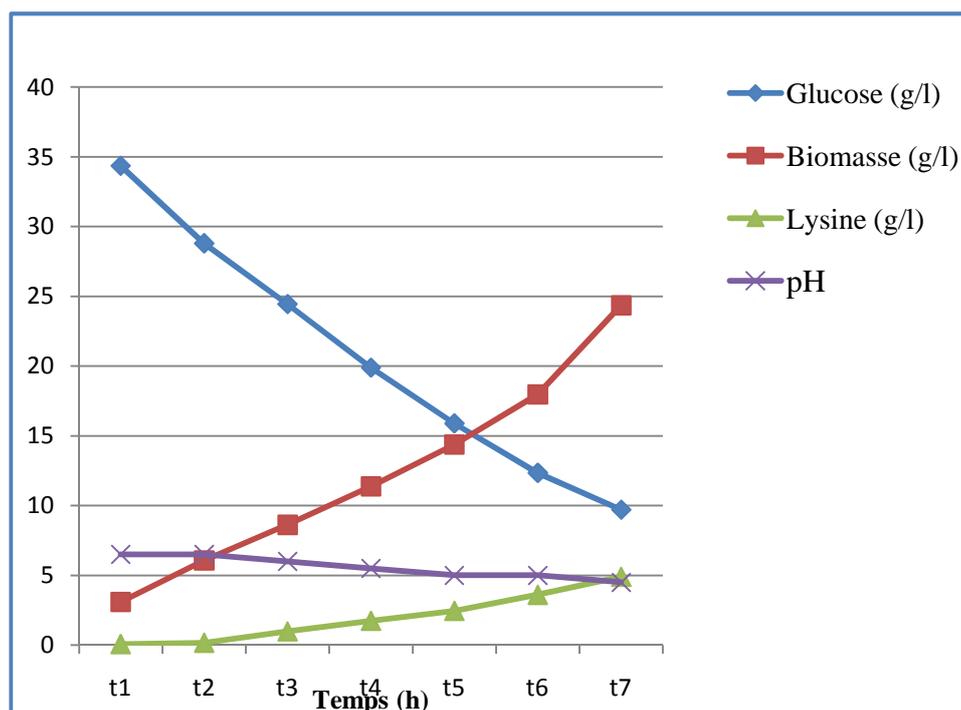


Figure n° 70: Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 5^{ème} milieu

Dans le cinquième milieu, la faible quantité de méthionine ajoutée, accentue encore plus le phénomène où on remarque que la quantité de lysine produite est faible et de l'ordre de 4,90 g/l est due à la forte rétro-inhibition exercée sur l'aspartokinase par l'excès de thréonine ajouté au milieu et cette faible quantité de lysine n'est due qu'aux traces de méthionine dans le milieu de fermentation.

Un rendement élevé en biomasse avec 24,36g/l confirme l'apparition de plus en plus de révertants dans le milieu de culture par rapport au nombre des souches mutées qui deviennent minoritaire d'où le faible rendement en lysine et l'augmentation de la croissance

qui atteint les 24,36g/l , car la souche sauvage a un taux de croissance de 0,52 h⁻¹ alors que la souche mutée n'a qu'un taux de croissance égal à 0,26 h⁻¹ et que cette croissance est accompagnée par une augmentation de la vitesse de consommation de glucose, et ce au fur et à mesure de l'apparition de révertants.

La figure suivante résume, bien, l'effet de la thréonine et de la méthionine sur la production de la lysine ainsi que la croissance d'un mutant auxotrophe homoserine (-) de *Corynebacterium glutamicum*.

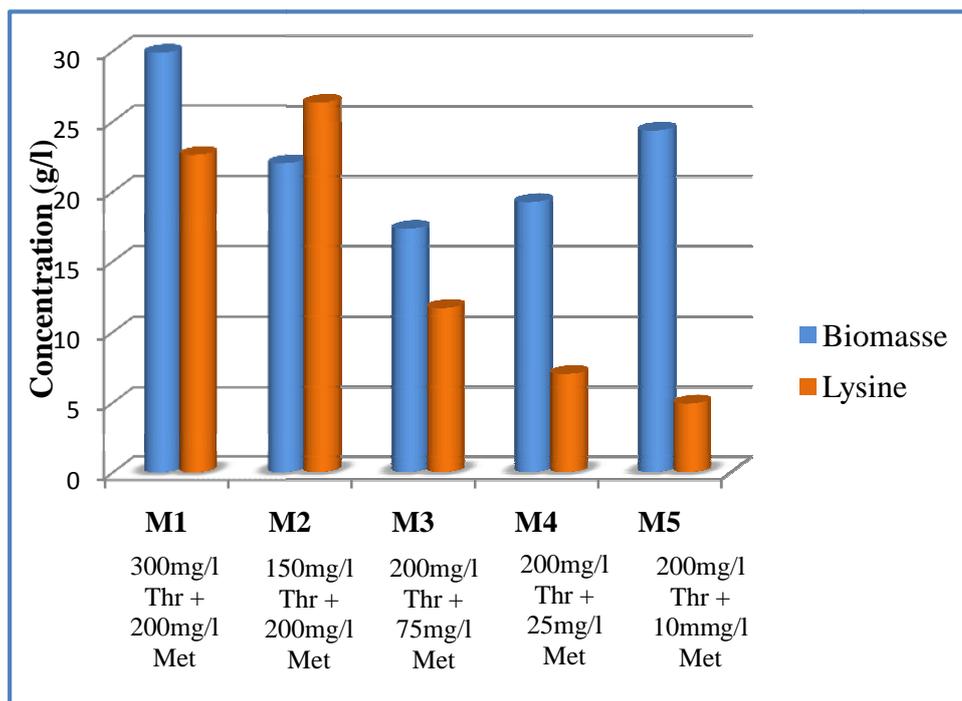


Figure n° 71 : Effet de la thréonine et de la méthionine sur la croissance et la production de la lysine d'un mutant auxotrophe homoserine (-) de *C. glutamicum* après 50 heures de culture

De ce qui précède, on remarque que la production de lysine, chez les auxotrophes homoserine (-), est inhibée par la présence de la lysine et de la thréonine. L'inhibition n'apparaît pas lorsqu'un seul des acides aminés est présent (Othmer, 1984) donc le glucose consommé par la souche est dirigé vers l'augmentation de biomasse.

La surproduction de lysine par les auxotrophes homoserine (-) peut être expliquée par la levée de la rétro-inhibition concentrée sur l'aspartokinase (Nakayama, 1985) suite à l'addition de la méthionine (Abe et Takayama 1972) et que les quantités de thréonine et de méthionine idéales

à la production de lysine oscillent autour de 150 mg de thréonine et 200 mg/l de méthionine. Le glucose consommé par la souche est dirigé vers la production de lysine.

Que la diminution des quantités de méthionine ajoutées au milieu influe sur les quantités de lysine produites ainsi que sur la croissance de la souche et que les révertants n'apparaissent que dès que les quantités de méthionine ajoutées diminuent accélérant de ce fait la vitesse de croissance de la souche.

IX- Influence de l'ajout de lysine sur la productivité de la souche

IX – 1 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le premier milieu sans lysine

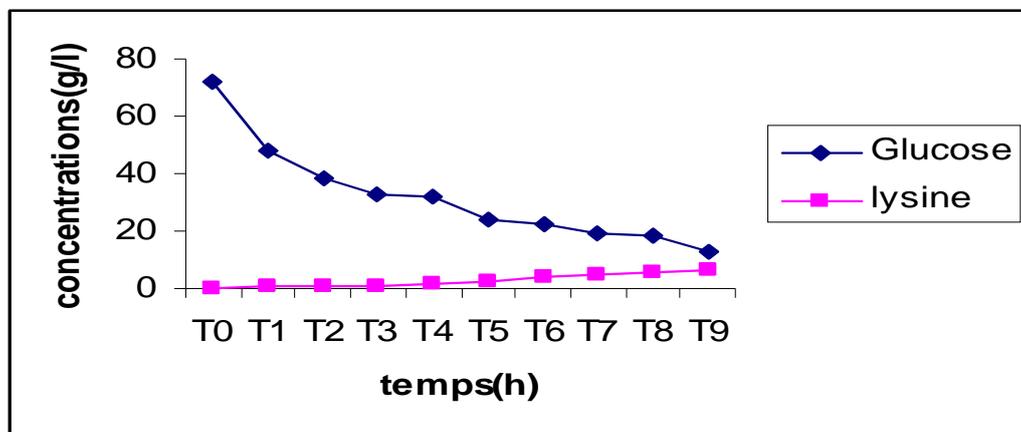


Figure n°72: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu sans lysine

Le premier milieu de fermentation, avec 0 g/l de lysine ajoutée, a donné un rendement de l'ordre de 6,03 g/l. Résultat, relativement, analogue au rendement trouvé par Plachy (1970). De plus, la vitesse de consommation du glucose semble plus rapide au début de la fermentation, puis diminue pour se stabiliser à force de se rapprocher de la fin. Ce qui est l'opposé de la courbe de production de lysine, ceci suggère qu'au début de fermentation, le plus gros de la source de carbone est orienté vers la croissance et donc l'augmentation de biomasse au dépend de la production de métabolite et puis, la tendance sera inversé pour observer une production de lysine assez importante.

IX – 2 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 10 g/l de lysine

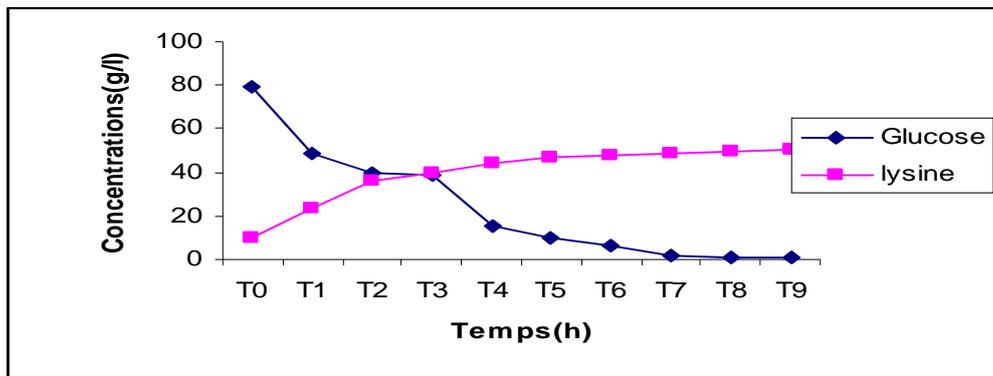


Figure n°73: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 10 g/l de lysine

En comparant les résultats du premier milieu (sans ajout de lysine) avec ceux du second milieu contenant 10 g/l de lysine, on constate que cet ajout a dopé la production et que la quantité produite tourne autour des 40 g/l, on remarque aussi que la production commence avec une vitesse de production très rapide pour se stabiliser à partir de t_6 et rester à ce niveau jusqu'à la fin de fermentation. A l'inverse, la vitesse de consommation de glucose débute rapidement pour diminuer en milieu de fermentation et s'annuler à la fin. Autrement dit, tout le glucose a été utilisé pour la production de métabolite ainsi que la croissance de la souche.

IX – 3 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 20 g/l lysine

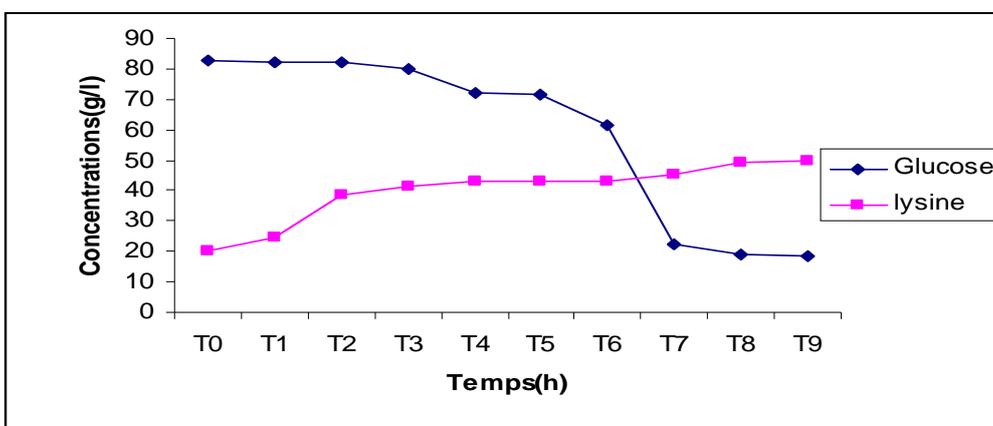


Figure n°74: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 20 g/l de lysine

Le milieu contenant 20 g/l de lysine a donné lieu à une production de ce métabolite de l'ordre de 29, 73 g/l, de même la consommation de glucose faible et stationnaire au début de la fermentation pour s'accélérer à partir de t_5 et ce jusqu'à la fin.

L'ajout de quantité de lysine dans le milieu, assez élevée, entraîne une diminution des quantités de métabolites produites.

IX – 4 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 30 g/l lysine

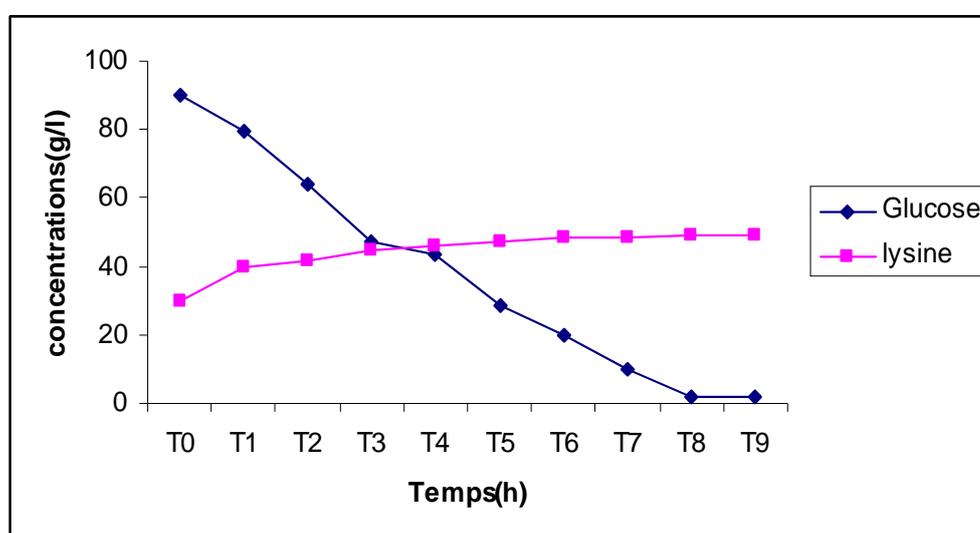


Figure n° 75: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 30 g/l de lysine

Le milieu avec 30 g/l de lysine a donné un rendement de 19,3 g/l de lysine, la vitesse de production du métabolite est analogue à celle contenant 20g/l de lysine et elle se stabilise aux environs de t_4 alors que la vitesse de consommation du glucose a une allure rapide et linéaire pour s'annuler aux environs de t_8 . On peut dire que la production de métabolite s'arrête à t_4 , due probablement au déclenchement d'un effet inhibiteur par la mise en place des mécanismes de régulation.

La consommation du glucose de t_4 est orientée vers la production de biomasse et de métabolites autres que la lysine.

IX – 5 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 40 g/l lysine

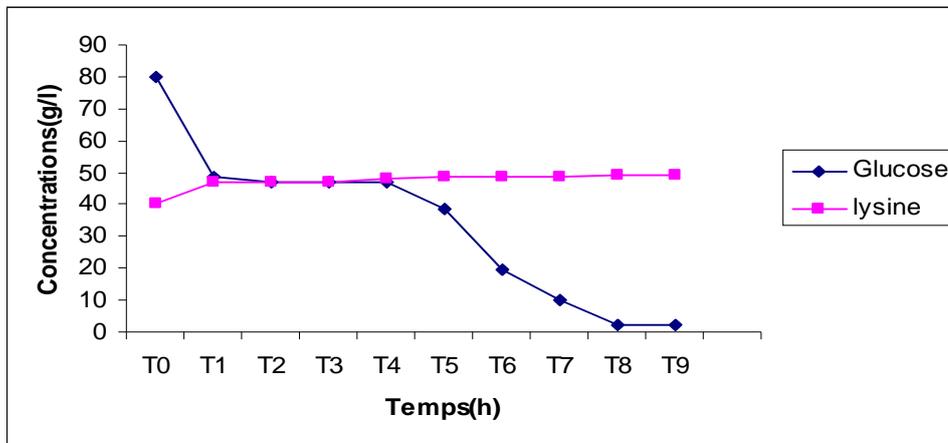


Figure n°76: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 40 g/l de lysine

Ce milieu de culture a donné un rendement de 9,2 g/l de lysine et on remarque aussi que cette production s'arrête dès le début de la fermentation et se maintient à ce niveau jusqu'à la fin de la fermentation. La consommation de glucose s'arrête lorsque la production de lysine arrive à son maximum puis reprend pour combler des besoins énergétiques.

IX – 6 – Dosage de la lysine produite et de la consommation de glucose dans le second milieu contenant 50 g/l lysine

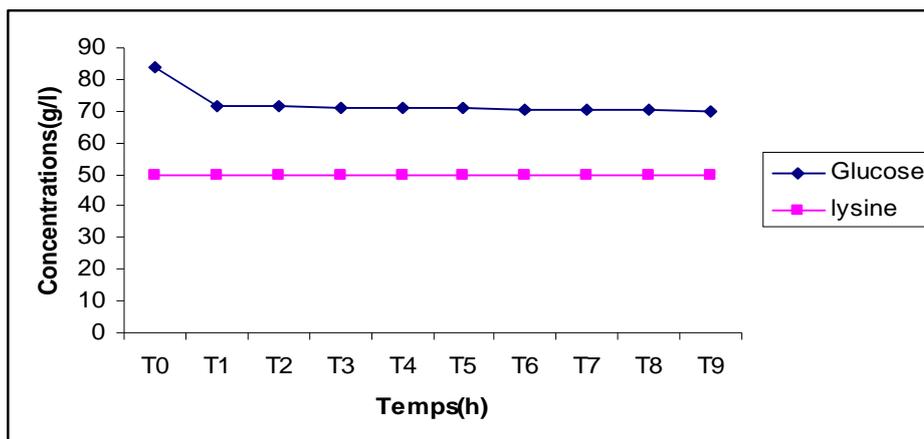


Figure n° 77: Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 50 g/l de lysine

Les mécanismes de régulations se déclenchent dès le début de la fermentation où on remarque que la vitesse de consommation du glucose commence très rapidement pour s'arrêter et s'annuler et ce jusqu'à la fin de fermentation, de plus il n'y a aucune production de lysine. La reprise de la consommation du glucose est arrêtée dès qu'il y a blocage de la croissance. La productivité en lysine est le produit de la productivité d'une bactérie (productivité spécifique) et de la quantité de cellules bactériennes et s'il n'y a pas de biomasse automatiquement il y a absence de métabolites (Simon, 2004). Il apparaît que la quantité produite va en diminuant, c'est-à-dire que l'augmentation de la quantité de lysine ajoutée dans le milieu entraîne une diminution de la quantité de lysine produite jusqu'au moment où elle n'est plus produite et ce lorsqu'on ajoute 50 g/l.

On sait que la lysine augmente l'activité de l'homoserine deshydrogenase (Cremer et al., 1988), ce qui entraîne une augmentation de la production de thréonine et de méthionine. La thréonine en s'accumulant dans la cellule, avec la lysine, va réinstaller la rétroinhibition concertée de l'aspartokinase (Nakayama, 1985).

On peut avancer que le maximum de lysine que peut produire la souche utilisée (homoserine⁻) ne peut pas aller au-delà de 50 g/l.

X- Calcul des flux métaboliques

Les besoins des métabolites pour 1g de biomasse (Holms, 1986) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°24: Demande en précurseurs pour la biosynthèse des macromolécules constituant la cellule (Holms, 1986).

Précurseurs	Quantités (mmol/g)
G6P	0,21
F6P	0,07
Pentose P (Ri5P)	0,88
Erythrose 4P	0,27
Triose P (GAP)	0,13
3PGA	1,29
PEP	0,53

Pyruvate	1,81
AcétylCoA	2,5
α -KG	1,25
OAA	1,71
ATP	29,2
NADH	0,39
NADPH ₂	14,85

Le transport de glucose est assuré par le système phosphoénolpyruvate-dépendant phosphotransférase (PTS), de plus nous partons avec les hypothèses suivantes, à savoir la répartition pentose/glycolyse est un rapport de 65/35 et il y a carboxylation du pyruvate pour la synthèse de l'oxaloacétate (OAA).

La vitesse de consommation de glucose est fixée à 4,6mmol glucose/g/h avec un taux de croissance μ de 0,59h⁻¹.

Pour estimer les vitesses d'utilisation de chaque métabolite par les voies de synthèse cellulaire, nous devons multiplier chaque valeur par le taux de croissance μ .

De plus, nous sommes en présence d'une souche auxotrophe à la thréonine plus la méthionine, autrement dit nous devons ajouter dans le milieu de culture et la méthionine et la thréonine à des quantités sub-optimales empêchant le rétablissement de la rétroinhibition.

Cette auxotrophie exige l'ajout dans le milieu de 275 μ mol/g de thréonine, exigeant une molécule d'oxaloacétate et 3 NADPH₂, et de 146 μ mol/g de méthionine, exigeant aussi une molécule d'oxaloacétate et 8 NADPH₂.

La demande de la souche en OAA sera donc réduite de 1,71- (0,275+0,146)= 1,289 mmol/g, de même pour la demande en NADPH₂ qui sera de 14,85-(3*0,275)-(8*0,146)= 12,857 mmol/g.

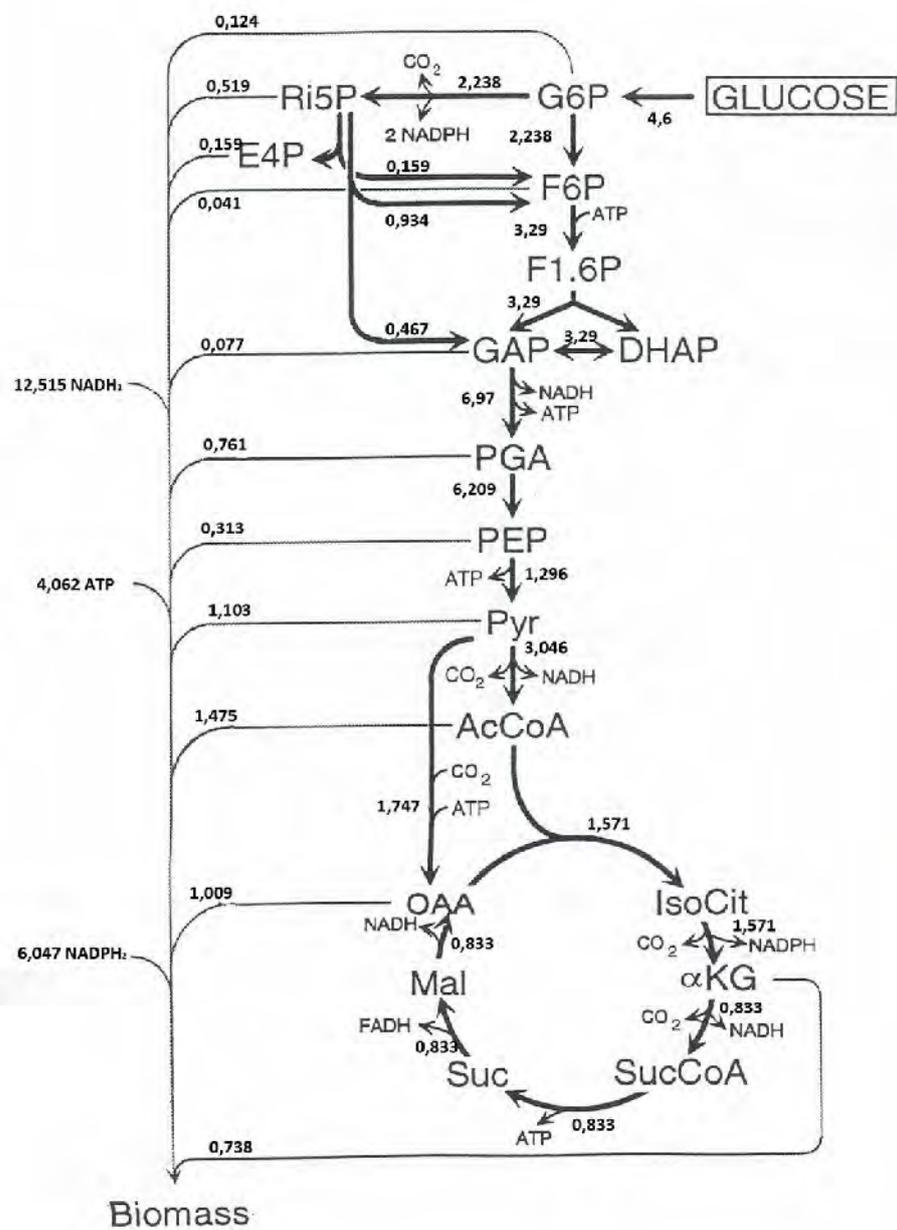


Figure n° : Calcul du flux surglucose

Dans le bilan énergétique, nous remarquons qu'il manque 2,714 NADPH₂ et 13,166 ATP mais il y a un excédent de 12,285 NADH₂.

Aussi, pour chaque Glucose 6P transformé en Pentose, on gagne 2 NADPH₂ mais on perd dans le cycle de Krebs 1/6 d'NADPH₂ (0,167 NADPH₂ en moins) et donc pour chaque transformation G6P en Pentose, on génère 1,833 NADPH₂.

Il est donc nécessaire d'ajuster le rapport glycolyse / pentose pour avoir 0,757 **G6P** → **F6P** et 3,719 **G6P** → **6PG** et puis en **Ri5P**. Ce sont des valeurs importantes dans la voie des pentoses mais déjà observé dans ce type de bactérie.

Pour situer la performance de la souche, les estimations des flux métaboliques seront développées dans la partie discussion.

XI- Discussion générale

Partant de quatre échantillons de substrats naturels, une première sélection a été faite sur la base des caractères morphologiques des colonies établies par Abe et *al.*(1967), on a pu sélectionné 289 colonies qui ont subi des tests de coloration de Gram ainsi qu'une sélection par la forme caractéristique des bactéries corynéformes notamment leur tendance à former des lettres chinoises (Liebl, 2005).

La sélection microscopique préliminaire permis de présélectionner 20 souches bactériennes.

L'analyse des chromatographies sur couche mince (CCM) réalisées sur les surnageants de culture après fermentation a montré que dans le milieu M₁, les 20 souches ont produit une variété d'acides aminés, principalement l'acide glutamique. Cependant dans le milieu M₂, contenant l'urée comme source d'azote, les souches S_{1T}, S_{2T}, S_{3T}, S_{1E}, S_{2E}, S_{1L}, S_{3L} et S_{6L} n'ont pas développé ou produit des acides aminés sans doute parce qu'ils ne possèdent pas activité uréasique. Toutes les souches se sont avérés avoir une exigence pour la biotine et ont développé des colonies gris/noir sur milieu de culture au tullerite, caractéristique spécifique des bactéries corynéformes.

Aucune des souches n'a produit de spores et toutes étaient aérobie ou aéro-anaérobie facultatives. La croissance a été optimale à des températures de 30-35 °C, pauvre à 20 °C et

impossible à 40°C. Un pH neutre était le meilleur pour la croissance, aucune croissance observée à pH 4 ni à pH 10.

Parmi les souches isolées, 14 ne possédaient pas d'enzymes de décarboxylation capables de dégrader les acides aminés confirmant la théorie de Kinoshita (1985) que de nombreuses bactéries produisant les acides aminés n'ont que des capacités de dégradation des acides aminés relativement faibles. Seules les souches isolées à partir de lait possèdent ces enzymes cataboliques de dégradation des acides aminés.

De plus et sur la base des critères de classement d'Abe et Takayama (1972) impliquant des réponses à la croissance sur le glucose, l'urée, le saccharose et le mannitol, la capacité naturelle à produire des acides aminés.

Les souches mannitol⁻ étaient les meilleurs producteurs et ont donné lieu à la production de petites quantités d'un certain nombre d'acide aminé à savoir, l'acide glutamique, acides aminés ramifiés et l'alanine mais aucune production de lysine n'a été détecté.

En se basant sur la capacité de croissance et le profil de production des acides aminés, la souche isolée à partir des excréments d'oiseaux a été sélectionnée pour les études de mutation et de screening.

Cette souche dont l'identité a été confirmée taxonomiquement comme appartenant taxonomiquement à *Corynebacterium glutamicum* possédait une uréase, était saccharose positif mais ne pouvait se développer sur le mannitol.

Le profil de production des acides aminés est intéressant, car il a montré une capacité à accumuler, naturellement, des acides aminés à chaînes ramifiés (isoleucine et valine) ainsi que l'acide glutamique et des traces de l'alanine.

L'éthyl méthane sulfonate (EMS) a été utilisé pour provoquer des mutations aléatoires dans le génome et de détecter par un processus de screening les souches ayant développées des capacités de produire des acides aminés autres que ceux produits avant la mutation. Le but de l'utilisation des mutants auxotrophes est la négation du mécanisme de rétro-inhibition par limitation de l'accumulation intracellulaire des rétro-inhibiteurs ou répresseurs (Kinoshita, 1985).

La mutation a donné lieu à l'apparition d'un grand nombre de mutations qui ont développé des colonies sur un milieu gélosé complexe. Il a été observé la présence d'une

grande variété de pigmentation des colonies variant du blanc à l'orange et parfois du rose. La production des pigments est un indice de mutation (Abe et *al.*, 1967) et cette variabilité en pigmentation a été exploitée industriellement (Heider et *al.*, 2012).

Environ 4% de ces colonies se sont révélées être des auxotrophes pour un ou plusieurs acides aminés.

Lors de l'examen de leur capacité à produire de la lysine (ou d'autres acides aminés essentiels), 70 souches ont donné lieu à l'accumulation d'acides aminés dans un milieu minéral supplémenté en certains acides aminés. Les souches avec double auxotrophie à la méthionine et la thréonine ont accumulé dans leur milieu, spécifiquement, de la lysine. Quatre souches ont montré les mêmes niveaux de croissance que de productivité en lysine dont l'une d'elles a été sélectionnée pour une caractérisation physiologique plus poussée.

Les critères de choix de la souche mutée sélectionnée par rapport à la souche parentale sont basés sur le taux de croissance, la vitesse de consommation de sucre et la production des acides aminés sur milieu minimum à base de glucose et supplémenté de thréonine et de méthionine afin de surmonter l'effet de l'auxotrophie.

Le taux de croissance de la souche mutée était d'environ 50% par rapport à celui de la souche parentale (μ est de $0,23 \text{ h}^{-1}$ pour la souche mutée contre $0,52 \text{ h}^{-1}$ pour la souche parentale), tandis que la vitesse de consommation de sucre était presque similaire pour les deux souches ($4,3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans la souche mère et $4,6 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans la souche mutée). Cette légère différence dans la consommation du substrat peut être due à la présence dans le milieu de substrats supplémentaires à savoir la thréonine et la méthionine nécessaire à la compensation de l'auxotrophie. La présence de ces acides aminés ferait diminuer, effectivement, les exigences anaboliques, respectivement, de l'oxaloacétate et de l' NADPH_2 nécessaires à la synthèse de la biomasse d'environ 25 et 13% favorisant ainsi la synthèse de la lysine.

Bien que la souche parentale produise, seulement, des traces d'acides aminés dans les conditions normales de croissance (surtout de l'acide glutamique mais pas de lysine), la souche mutée produit 14 g/l de lysine après 7 heures de culture sur glucose (figure n°84) et des quantités mineures d'autres acides aminés à savoir de l'alanine et de la valine, mais aucune quantité détectable d'acide glutamique n'a été produite.

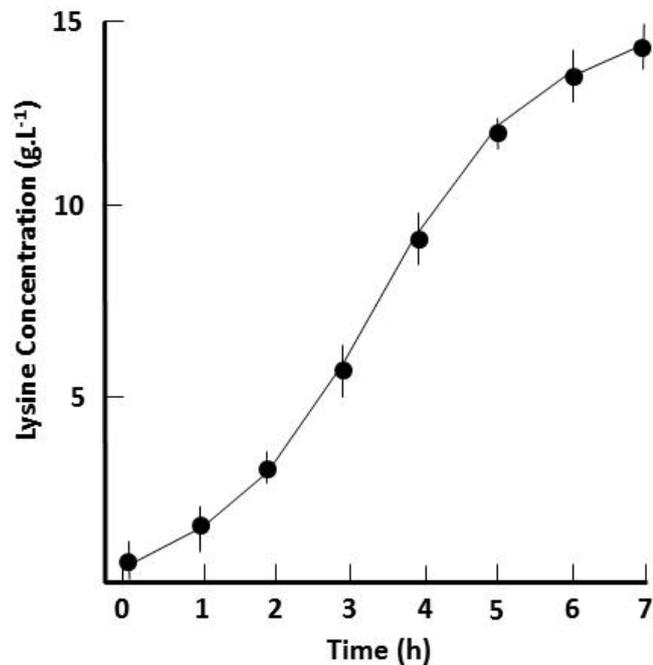


Figure n° 79 : Profil de la production de lysine par la souche mutée de *C. glutamicum* cultivée en erlens.

L'accumulation de la lysine dans le milieu de culture est directement couplée à la croissance de la bactérie avec un profil de production de métabolite primaire.

Lorsque le glucose a été remplacé par le saccharose, la souche mutée produit moins fortement la lysine malgré un taux de croissance similaire, probablement liée au fait que la consommation de saccharose est plus lente que celle observée pour le glucose. De même, la production de lysine sur acétate est faible (6,5g/l), due à la mauvaise répartition de la balance énergétique associée à la consommation de l'acétate (Cocaign et *al.*, 1993).

L'utilisation de l'acétate d'ammonium comme source d'azote favorise la production de lysine avec des concentrations finales pratiquement identiques qu'avec l'utilisation de sels d'ammonium inorganiques, de plus aucun gain en rendement ou en taux de production n'ont été observés.

L'un des facteurs potentiellement limitant de la production de lysine est l'inhibition par son accumulation dans le milieu.

Les capacités de la souche mutée à accumuler naturellement la lysine a été examinée par l'inoculation d'une série de milieu de culture avec divers concentrations initiales de lysine (10, 20, 30, 40 et 50g/l).

La concentration de glucose, dans le milieu, a été augmentée pour permettre à la fermentation l'accumulation de la lysine à des niveaux élevés.

Dans tous les cas, la production de lysine est stoppée lorsque la concentration finale atteint les environs de 50 g/l. En effet, dans la fermentation initiée avec cette quantité initiale de lysine, aucune production supplémentaire n'a eu lieu et la consommation de sucre a été extrêmement faible. Ceci suggère que cette valeur de 50 g/l est la concentration maximale ou seuil pouvant être atteint en utilisant cette souche et pour pouvoir aller au-delà de cette valeur nécessitera une évolution supplémentaire de la souche utilisée et examiner ses potentialités à utiliser des substrats bon marché tels que les sous-produits des procédés agronomiques.

Néanmoins, la souche isolée montre un bon potentiel pour la production de lysine malgré que la concentration finale reste relativement faible par rapport à beaucoup de souches industrielles, mais en gardant à l'esprit que cette souche a été sélectionnée après un unique tour de mutation chimique sans qu'il y ai d'autres facteurs spécifiques pouvant favoriser la surproduction de l'acide aminé, on peut raisonnablement s'attendre à ce que d'autres sélection permettront d'atteindre des niveaux élevés de lysine.

Les souches développées en Allemagne (Stäbler, 2011) montrent que l'exportation de l'acide aminé vers le milieu extérieur peut être l'obstacle majeur pour l'accumulation de hautes concentrations d'acides aminés et que l'accumulation intracellulaire de l'acide aminé est régie, en grande partie, par la sélection génétique qui peut éliminer les commandes allostériques de mise en place de la rétroinhibition sur sa voie de biosynthèse.

L'analyse stœchiométrique des flux métaboliques est étudié afin d'examiner l'influence du métabolisme central sur les rendements en acides aminés (Marx, 1997)

Lorsqu'elle est utilisée, une telle analyse montre que les rendements en lysine, basés sur les taux de consommation de sucre, qui sont déterminés expérimentalement, et le taux de croissance spécifique étaient proches des niveaux maximums attendus (figure n°78).

En effet, les rendements de récupération de carbone sont de près de 30% qui sont exactement les rendements prédits pour la souche lorsque le taux de croissance et le taux de consommation de substrat sont utilisés.

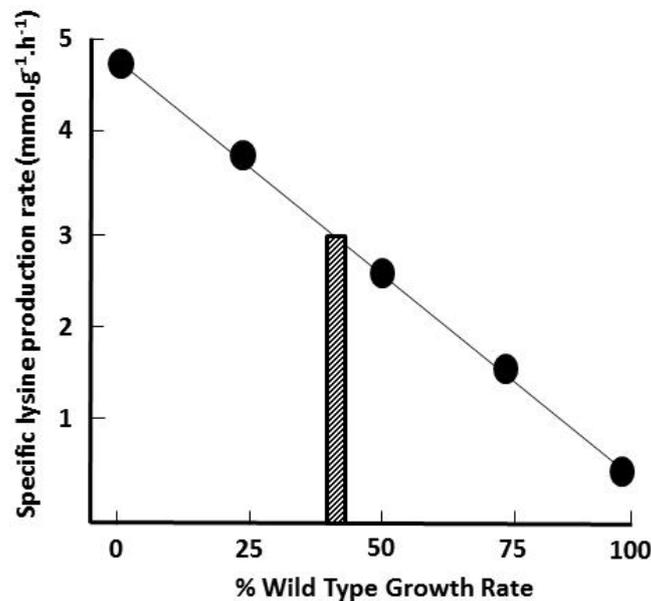


Figure n° 80 : Estimation des rendements en lysine par l'utilisation de l'approche de la balance de flux stœchiométrique de *C.glutamicum*. La colonne montre la performance de notre souche mutée avec son taux de croissance actuel et un rendement en lysine proche du maxima possible sans modifications supplémentaires de la souche ou la mise en place d'une stratégie de type fed-batch pour faciliter le découplage entre croissance et production.

L'analyse de ces calculs de flux stœchiométriques nécessite toujours de fixer certaines variables : Le taux d'absorption du substrat est supposé constant par rapport aux taux de croissance théoriques utilisés et le flux à travers la voie des pentoses phosphates a été maintenu constant à 66%, de la disponibilité du glucose-6P, qui conduit à une exigence des voies alternatives de génération de NADPH₂ facilitant une optimisation du flux de carbone nécessaire à l'augmentation en proportion de la quantité de lysine produite théoriquement.

Ceci peut être atteint par l'intermédiaire de l'activité de la transhydrogénase selon laquelle *C.glutamicum* en est dépourvue, ou par des mécanismes d'échange impliquant pyruvate/PEP et des mécanismes d'échange oxaloacétate/carboxylation du malate dans laquelle l'enzyme malique pourrait générer des NADPH₂ (Gourdon, 2000).

Le fait que le rendement expérimental observé est proche de celui prédit, suggère que l'un des mécanismes est en effet fonctionnel ou que le flux à travers la voie des pentoses phosphate était considérablement plus élevé. En fait un flux de 100% de glucose-6P disponible

serait nécessaire pour répondre à la demande en NADPH_2 qui n'a jamais été observé dans beaucoup d'études de flux métaboliques utilisant des souches productrices de lysine, ce qui suggère un rôle pour l'enzyme malique d'atteindre l'équilibre du cofacteur nécessaire pour les rendements élevés en lysine observés dans ce cas.

Si les rendements sont acceptables, elles pourraient être encore améliorées par l'utilisation de techniques appropriées de fermentation comme le fed-batch dans lequel le taux de croissance de la souche peut être diminué tout en maintenant la vitesse de consommation du sucre. Cependant, le développement est nécessaire afin d'améliorer les concentrations finales de lysine qui sont encore relativement faible par rapport aux souches industrielles exploitées à l'heure actuelle.

Il est, cependant, assez promoteur pour une souche ayant subi une seule génération de mutation. Elle est un producteur relativement efficace de lysine dont la valeur biotechnologique pourrait être améliorée par d'autres techniques supplémentaires de mutation et de sélection afin de valoriser une source non-OGM de l'alimentation dans le but d'améliorer la production de volaille.

Les travaux à venir avec cette souche se concentreront sur des techniques mutationnelles afin d'augmenter la concentration finale de lysine qui peut être accumulé par criblage pour l'obtention de souche tolérante pour la lysine, et lorsque ceci est réalisé on peut optimiser le processus par la mise en place d'une fermentation en fed-batch, de prolonger la période de croissance qui sera dissocié de la productivité élevée, ce qui augmente le rendement global en lysine. Cet apport supplémentaire devrait atteindre des caractéristiques de production compatibles avec le développement économique et la production de cet ingrédient essentiel pour le marché de l'alimentation animale.

CONCLUSION

Pour répondre à la hausse de la demande de produits alimentaires, d'aliments de bétail et de biocarburants, les états ont tendance, en plus de la relance de l'agriculture, à rechercher d'autres sources afin de combler les déficits qui, de jour en jour s'intensifient.

La biotechnologie et l'amélioration des souches peuvent apporter des solutions de remplacement ou du moins des suppléments de certains micronutriments limitant.

Les résultats obtenus, dans cette recherche, sont assez promoteur pour une souche ayant subi une seule mutation. C'est, donc, un producteur de lysine relativement efficace et dont la valeur biotechnologique pourrait être encore améliorée par des techniques de mutation et de sélection supplémentaires afin de mettre en valeur une source, non « OGM », d'alimentation améliorant efficacement la production avicole en intervenant sur le prix de revient, déjà très affecté par les multiples augmentations des prix des matières premières entrant dans cette filière.

La souche bactérienne isolée et améliorée a donné des rendements acceptables avec des taux de croissance de 50% entre la souche mutée et parentale ($0,23 \text{ h}^{-1}$ pour la souche mutée et $0,52 \text{ h}^{-1}$ pour la souche parentale) alors que la vitesse de consommation du sucre est approximativement la même pour les deux souches ($4,3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour la souche parentale et $4,6 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour la souche mutée) et peuvent de ce fait, être encore améliorées par des techniques de fermentation en fed batch appropriées dont l'objectif est double, d'un côté il y a diminution de la croissance de la souche et de ce fait le plus du sucre est dirigé vers la biosynthèse de la lysine et d'autre part limiter le transfert gazeux dans le milieu car l'augmentation de biomasse entraîne un grand besoin en oxygène qui, non injecté, entraîne une production d'acides organiques et principalement le lactate au détriment de la lysine.

Le maintien de la vitesse de consommation ou mieux l'améliorer est aussi préconisé afin d'augmenter la productivité en lysine.

De plus, vu le manque de stabilité de la souche dans les conditions limitantes en méthionine ou il y a eu apparition de révertants, toute utilisation de la technique culturale en fed-batch doit tenir compte de cette stabilité de la souche, donc c'est via d'autres limitations de la croissance que la stratégie devrait être construite.

Cependant, le développement de la souche est nécessaire pour améliorer les concentrations finales en lysine, qui sont encore relativement faibles par rapport aux souches

industrielles actuellement exploitées. Il est important de rappeler que ces souches industrielles sont issues des multiples générations de mutagenèse.

Des travaux futures, sur cette souche, se concentreront sur des stratégies pour augmenter la concentration finale de la lysine, qui peut être accumulée, par criblage et sélection de souches tolérantes aux forts taux de lysine, d'autres marquages génétiques (mutation) afin d'augmenter la stabilité de la souche durant les longues fermentations, des fermentations optimisées en fed batch pour prolonger les périodes de croissance qui seront dissociées des productivités élevées, augmentant de ce fait le rendement global en lysine mais surtout les concentrations finales obtenues.

Enfin, la recherche de nouveaux substrats ou rendre les souches capables d'utiliser des substrats, bon marché, non assimilés ou nécessitant des étapes préliminaires en vue d'être dégradé et transformé en lysine par la souche. Actuellement, les recherches étaient menées avec du glucose mais l'exploration des substrats du type déchets agricoles offrent, évidemment, les opportunités de fournir un complément alimentaire sans usage des substrats qui eux-mêmes font partie d'une chaîne alimentaire classique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABE S., TAKAYAMA K. et KINOSHITA S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 13, p. 279-301.
- ABE S. et TAKAYAMA K. (1972).** Amino acid producing microorganisms: variety and classification *In* « the microbial production of amino acids ». Edited by : YAMADA K, p. 3-38.
- ADRIAN J. (1991).** Conserves appertisées et vitamines. Lettre nutrition et appertisation. UPPIA, vol. 3, 337 p.
- ADRIAN J., LEGRAND G. et FRANGNE R. (1981).** Dictionnaire de biochimie et de nutrition. Edition Technique et Documentation Lavoisier. P. 1266137.
- ADRIAN J., POTUS J. et FRANGNE R. (1995).** Mutagenèse. La science alimentaire de A à Z. 2^{ème} édition, Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. p: 199-289.
- AKASHI K., SHIBAI H. et HIROSE Y. (1979).** Effect of oxygen supply on L-phenylalanine, L-proline, L glutamic and L-arginine fermentation. *J. Ferment. Technol.* vol. 57, n. 4, p. 321-327.
- ALAIS C. et LINDEN G. (1997).** Biochimie des principaux aliments. In: “Abrégé de biochimie alimentaire”. Ed. Masson. Paris. P. 129-151.
- ALLINGER N.L., CAVA M.P., DEJONGH D.C., JOHNSON C.R., LEBEL N.A. et STEVENS C.L. (1994).** Chimie organique. Ed. Science International. Paris. P.667-783.
- AREPIT (1986).** L'utilisation des microorganisms. Les positions économiques et technologiques de la CEE. Ed. Technique et documentation Lavoisier. Paris. p.4-6.
- ARNAUD C. (1985).** Cours de chimie organique. Bordas. Paris. p. 391-392.
- AUDIGIE C-L., FIGARELLA J. et ZONSZAINF. (1978).** Manipulation biochimique. (Ed) doin. Paris, 274 p.
- AUGUSTIN J-C. (2005).** Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Habilitation à diriger des recherches « Sciences de la vie ». Paris, 25 p.
- BADUEL P. (2002).** Fermentations, Principales applications industrielles. Ed : Techniques de l'Ingénieur. Paris, p. 2.
- BEAUMONT S. (2007).** Biochimie. Edition : Dunod (2ème édition), Paris, 171 p.
- BEBEAR C. (1989).** Corynébactéries. In : « Bactériologie médicale ». Ed. Flammarion Médecine Science, 2^{ème} édition. 950-964.
- BERTRAND D. et VIROBEN G. (1985).** Les valeurs nutritionnelles des matières protéiques végétales. In : « Protéines végétales ». Ed. Technique et documentation. LAVOISIER. P.525-529.

- BIESALSKI H-K. et GRIMM P. (2001).** Atlas de poche de nutrition. Edition : MALOINE, France, pp : 2-108-112.
- BOULKOUR A. (2009).** Contribution à l'étude de la qualité de variétés de blé tendre. Mémoire d'ingénieur, Université de Jijel, 37 p.
- BOURGEOIS C-M., MESCELE J-F. et ZUCCA J. (1996).** Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. Paris, p. 281-286.
- BOURGEOIS C.M. et LARPENT J.P. (1989).** Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. Paris, p. 231-234.
- BOUSSEBOUA H. (2005).** Eléments de microbiologie. Edition: Campus club. Constantine Algérie, 303p.
- BOUVIER C., PELLAE M., DOMENECH J. et ROUSSEL F. (2010).** Place des protéines animales dans l'alimentation humaine. L'alimentation dans tous ses états. AAER-Cahier thématique, vol. 12, p. 21-26.
- BRACK A. (1999). Origine de la vie. In : Encyclopedia Universalis. 3220-3225.
- CEJCKA A. (1981).** Préparation of media. In « Biotechnology » Vol. 2. *Microbial fundamentals*. Edition : REHM H : 630-698.
- CHAMPBELL P. et SMITH D-A. (2006).** Biochimie métabolique. Edition: Ellipses, 2^{ème} édition. Paris, 50 p.
- CHASSAGNOLE C., LETISSE F., DIANO A. et LINDELY N-O. (2003).** Carbon flux analysis in a pantethenate over producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Laboratoire biotechnologie-Bioprocédés, UMR JNCA/CNRS N° 544 ans UMR ISN / INRA, France, 135p.
- CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. et BESANCON P. (1992).** Les besoins protéiques et qualité nutritionnelles des aliments. In : « Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. » Vol. 2, 95-105.
- CHIKHI A. et BENSEGUENI A. (2006).** Biochimie générale (1^{ère} partie). Edition: Dar Aktab El-Fikr, Algérie, 80p.
- CHINARD F-D. (1952).** Photometric estimations of proline and ornithine. *Journal of biology Chemical*, vol. 199. 95 p.
- CIVITELLI R. et VILLAREAL D-T. (1992).** Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans . Nutrition. Nov-Dec; 8 (6): pp. 400-405.

- CLEMENT Y., ESCOFFIER B., TROMBE M-C. et LANEEL E-G. (1984).** Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 130, p. 2589-2594.
- COCAIGN M., MONNET C. et LINDLEY N.D. (1993).** Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various substrates: use of substrate mixtures to localize metabolic bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 526-530.
- COYLE M.B. et LIPSKY B.A. (1990).** Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 227-246.
- DAGUET G-L. (1972).** Technique en bactériologie. Edition : Flammarion. Médecine. Sciences. Paris, 205 p.
- DALE J-W. et PARK S-F. (2010).** Molecular Genetics of Bacteria . Fifth édition, Jeremy w. Dale and Simon F. John Wiley & Sons, Ltd, P. 231-232.
- DELAUNAY S., LAPUJADE P., ENGASSER J-M. et GOERGEN J-L. (2002).** Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262 , a glutamic acid producing bacterium, in response to temperature upshocks . Nature publishing group, vol. 28, n. 6, p. 155-323-333.
- DELAUNAY S., LAPUJADE P., LEYVAL D., GERMAIN P., GOERGEN J-L. et ENGASSER J-M. (2001).** Problématique de l'amélioration de la production d'acide aminé par voie microbienne . Improvement in the Amino-Acid Microbial Production, p. 155.
- DEMAIN A-L. et BIRNBAUM J. (1968).** Alteration of the permeability for the release of metabolites from the microbiol cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, vol. 46, p. 1-25.
- DOMINGUEZ H., (1994).** Croissance et flux métaboliques de *Corynebacterium glutamicum* sur divers sucres : interaction entre transporteurs PTS et voies métabolique. Thèse de Doctorat, INSA de TOULOUSE.167 p.
- DUBOIS M., GILLES K-A., HAMILTON J-K., REBERS P-A. et SMITH F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28, p350-356.
- DUDECK. (2003).** Biocatalysis. Nature is the best laboratory. BASE, PP: 4.
- DUPERRAY F. (1993).** Les corynebactéries. In « Microbiologie industrielle : les microorganismes ». Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. PARIS : 390-412.
- DUPIN H. et MOREAU J.G. (1981).** Cahiers de nutrition et de diététique. Société de nutrition et de diététique de langue française. Volume XVI., 3.
- DUPIN H., CUQ J.L., MALEWIAK M.I., RENAUD-ROUAUD C. et BERTHIER A. M. (1992).** Protéines. In « Alimentation et Nutrition humaine ». Ed. Est Editeur. 17, rue de la vie. 75017.Paris. P. 167-180.

- EBERLIN T. (1997).** Les infections microbiennes. Edition : NATHAN. Paris : 57-59.
- EGGELING L. et SAHM H. (2001).** The cell wall Barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid afflux . Journal of Bioscience and Bioengineering , vol. 92, n. 3, p. 201-213.
- EGGELING L., PFEFFERLE W. et SAHM H. (2002).** Amino acids In RATLEDGE C. et KRISTIANSEN B. «Basic Biotechnology ». 1^{ère} édition. Ed; Combridg University Press. P.282-283-289.
- EGGELING L. et BOTT M. (2005).** Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. eds, Taylor & Francis Group, LLC, 637 p.
- EI-MANSI H. et BRYCE C., (1998).** Fermentation microbiology and biotechnology. Edition : Taylor and Francis group. USA. P. 30-38.
- EUVERINK G-J-W. (2003).** Aromatic amino acid biosynthesis in Actinomycète. Springer-Verlag Liberica ., p. 14-160.
- FLICKINGER M-C. et DREW S-W. (1999).** Encyclopedia of Bioprocess technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. JOHN WILEY and SONS. INC., 31 p.
- GLANEMANN C., LOOS A., GORRET N., WILLIS L-B., O'BRIEN X-M., LESSARD P-A. et SINSKEY A-J. (2003).** Desparity between changes in mRNA abundance and enzyme activity in *Corynebacterium glutamicum* for DNA microarray analys. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 6, p. 61-68.
- GUIRAUD J-P. (1993).** Génétique microbienne. Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. Paris, p. 80-88.
- GUIRAUD J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition : DUNOD. Paris : 29-34, 93, 298-299.
- GUIRAUD J-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris, 299 p.
- GUIRAUD J-P. et GALZY P-R. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Usine nouvelle. Paris, 229 p.
- GYONVARCH A. (1993).** Les Corynébactéries. In : Microbiologie industrielle : les microorganismes. Edition : Technique et documentation. LAVOISIER. Paris, p. 390-417.
- HALL V., COLLINS M.D., HUTSON R.A., LAWSON P.A., FALSEN E. et DUERDEN B-I. (2003).** *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain Corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, p. 1065-1068.
- HANEL F., HILIGER M. et GRAFE U. (1981).** Effect of oxygen limitation on cellular L-lysine pod and lipid spectrum of *Corynebacterium glutamicum* . *Biotechnology letters* , vol. 3, n. 9, p. 461-464.
- HERMANN T. (2003).** Industrial production of Amino Acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology.* Germany, P: 155-156.

- HESLOT P. (1977).** L'impact de la génétique sur la production des métabolites. In : APRIA : journée d'étude : Génétique et industries alimentaires. Paris, p. 25-49.
- HIRASAWA T., WACHI M. et NAGAI K. (2001).** L-glutamate production by lysozyme - sensitive *Corynebacterium glutamicum* Its a mutant strains. *Biomed central BML biotechnologie*, vol. 1, n. 9, 1472 p.
- HIROSE Y., ENZI H. et SHIBAÏ H. (1985).** L-glutamic acid fermentation *Comprehension biotechnology* , vol. 3, p. 593-600.
- IKIDA M. (2003).** Amino acid production process *In FAURIE R. et THOMMEL J.* « Microbial production of L- Amino Acids ». Ed : springer-Verlag Berlin Hiedelberg, New York. p. 1-2-3.
- ITAYA H. et KIKUCHI Y. (2008).** Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria. In: *Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 78, p. 621–625.
- IVANOV K., STOIMENOVA A., OBRESHKOVA D. et SASO L. (2013).** Biotechnology in the production of Pharmaceutical Industry Ingrédients: Amino Acids *.Biotechnology & Biotechnological*, p. 3620-3624.
- IZUMI Y., KONO Y., INAGAKI K., KAWASE N., TANI Y., YAMADA H., (1981).** Coryneform bacteria. In: *Developement of industrial organisms. Agr. Biol. Chem.*, vol. 45, p. 1983-1989.
- JACOTOT B. et CAMPILLO B. (2003).** Nutriments- protéines in « nutrition humaine » Edition MASSON , Paris.,p 6-8-13.
- JACQUOT R. (1999).** Les mutations in « encyclopedia universalis», p 32.
- JBERNIER J., ANDRIAN J. et VIDON N. (1988).** Les aliments dans le tube digestif. Editions DOIN , 238-333.
- JAVID M-M., IKRAM U-H., SOHAIL M-I. et BOKHARI S-A-I. (2012).** Mutagenesis induced hyperproduction of L-lysine in Shake flask and fermenter by *brevibacterium flavum* iibuv2 .Institute of Industrial Biotechnology, GCU, Lahore. P 347.
- JOFFIN C. et JOFFIN J-N. (1999).** Les produits congelés – les produits surgelés. In : *Microbiologie Alomen.* Edition : Centre régional de documentation pédagogique d'aquitain, 5^{ème} édition, 108 p.
- KAMOUN P. (1997).** Appareils et Méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Edition Flammarion, Paris, 147 p.

- KEDDIE R-M., BOUSFIELD I-J., (1980).** Cell wall composition in the classification and identification of Coryneform bacteria. In: Microbial classification and identification. Eds. Academic press, p. 167-188.
- KENNERKNECHT N., SAHM H., YEN M-R., PATEK M., SAIER J-M. et EGGELING L., (2002).** Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol.* 184p.
- KHACHATOURIANS G. (1995).** Food biotechnology: micro-organisms. Edited by: HUI.Y.H, 461 p.
- KIEFER P., HEUIZLE et WITTMAN C. (2002).** Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum* . Edition: Nature publishing group, vol. 28, n. 6, p. 338-343.
- KIKUCHI M. et NAKAO Y. (1986).** Glutamic acid. Edition : *Prgr. Ind. Microbiol.*, vol. 24, p. 101-116.
- KINOSHITA S. (1959).** The production of amino acids by fermentation processes. Edition: *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 1, p. 201-214.
- KINOSHITA S. (1972).** Glutamic acid In:Biotechnology of industrial microorganisms». Edited by: DEMAIN A.L., p. 115-142.
- KINOSHITA S. (1985).** L-lysine production using microbial auxotroph. Edition: *J.Gen. Appl. Microbiol.*, Vol 4, n° 2, 128-132.
- KINOSHITA S. et TANAKA K. (1972).** Glutamic acid In « Microbiol production of amino acids». (YAMADA et al., eds.), Kodanska., p. 263-624.
- KINOSHITA S. et NAKAYAMA K. (1978).** Amino acids. In: Economic microbiology. Edition (ROSE A.H., eds.) , Academic press, LONDON, p. 209-261.
- KJELDSSEN K-R. (2008).** Optimization of an industrial L-lysine producing *corynebacterium glutamicum* strain .Ed: Center for Microbial Biotechnology, P.13.
- KRÄMER R. (2004).** Production of Amino Acids: Physiological and Genetic Approaches .Food Biotechnology .Institute of biochemistry, University of KOLN.Germany, P. 172.
- KWINN L. (2003).** Regulation of acetyl-CoA carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* . Isolation and cloning of the upstream region of the acc BC gene. Edition : *b o g journal.*, vol. 4, 200 p.
- L'HERITIER P-H. (1975).** Génétique .Edition : MASSON et C^{ie}., p. 135-149.
- LARPENT J-P. (1991).** Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (produits laitiers et carnés). Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires.

- LARPENT J-P. et LARPENT-GOURGAUD M. (1990).** Mémento technique de microbiologie. Techniques et documentations. LAVOISIER., 2^{ème} edt , vol. 46, p. 33-336.
- LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUM J. et WATTRE P. (1977).** Microbiologie appliquée Doin . Paris., vol. 182, p. 66-67.
- LECLERC H., GAILLARD J-L. et SIMONET M. (1995).** Microbiologie générale « la bactérie et le monde bactérien » Doin. Paris, 366 p.
- LEE H-W., (1994).** Effets des limitations en substrats sur la physiologie de la production de la lysine par *Corebacterium glutamicum ATCC 21513* en culture continue. Thèse de Doctorat de l'UTC, 60 p.
- LEHNINGER A-L. (1989).** Réparation, mutation, recombinaison et clonages des gènes.
- LEGLER WJ., DREW G., et SCLEGEL HG. (1999).** Biology of the prokaryotes. Edition : Georg Thieme Verlag, Germany. p : 884.
- LESSARD P-A. et SINSKEY A. (2003).** Amino acids. In: Encyclopedia of genetics. Academie press, London, p. 54-56.
- LETUTOUR L. (1989).** Lysine, thréonine, tryptophane .Les biotechnologies au service de l'alimentation. Industries agro-alimentaires, P. 739-744
- LEVEAU J-Y., LARPENT J-P. et BOUIX M. (2001).** Sécurité microbiologique des procédés alimentaires. Ed : Techniques de l'ingénieur. Paris, P.5-6.
- LEVEAU F. et BOUIX A. (1993).** Les Corynébactéries In « Microbiologie industrielle : les microorganismes ». Edition : Techniques et documentations. LAVOISIER, p. 390-412.
- LIEBL W. (2005).** Corynebacterium taxonomy. In: Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of Corynebacterium glutamicum. CRC Press LLC, Boca Raton, p. 9–34.
- LOOS A., GLANEMANN C., WILLIS L-B., BRIEN X-M-O., LESSARD PH-A., GUILLOUET R-S. et SINSKEY A-J. (2001).** Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. Departement of Biology and biomicro center. Cambrige, 1254 p.
- LOPEZ DEL CASTILLO – LOZANO M. (2007).** Production d'aromes soufrés par les flores d'affinage : catabolisme de la l-cystéine. Thèse de doctorat à L'Institut National Agronomique Paris-Grignon, 64 p.
- LUISOT P. (1980).** Biochimie générale et médicale. Edition SIMEP, p. 320-323.
- LYNCH K. (2003).**Characterization of methyl malonyl CoA mutase promoter. *Bog journal*, vol. 6, 2460 p.
- MADIGAN M-T. et MARTINKO J-M. (2007).** Biologie des micro-organismes. Edition : (11^{ème} édition) Pearson éducation. France, p. 143-144.

- MARCHAL N., BOURDO J-L. et RICHARD C-L. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries. DOIN, Paris, 323 p.
- MARCHAL N., BOURDON J-I., BIMET F., (1988).** Le laboratoire de bactériologie médicale. Edition : DOIN, Paris, 420 p.
- MARQUET M., URILARREA J-P., HUCHENQ A., LANELLE G. et GOMA C. (1986).** Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 223 p.
- MARTIN J-F. et LIRAS P. (1981).** Biosynthetic pathway of secondary metabolites in industrial microorganisms. In: *Biotechnology Microbial fundamentals*. Edited by: REHM, vol. 1, p. 645-665.
- MARX A., GRAAF A-A-D., WEICHERT W., EGGELING L. et SAHM H. (2003).** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by NMR spectroscopy combined with metabolic balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, p. 81-95.
- MAZIGH D., BEJOT J. et DESMAZEAUD M. (1999).** Biologie moléculaire. In : *Encyclopedia Universalis*. p. 10-12.
- MELAOUENE S. (1993).** Les Corynébactéries In « *Microbiologie industrielle : les microorganismes* ». Edition : Technique et documentation. LAVOISIER, p. 390-417.
- MEYER A., DEIANA S. et LECLERC H. (2000).** Cours de microbiologie générale (nouveau programme). DOIN. Paris, 249 p.
- MONTIGNAC M., (1991).** La diététique du manger. Edition: ARTULEV. Paris, p. 30-34.
- MORE J. (1993).** Les Corynébactéries. In : *Microbiologie industrielle : les microorganismes*. Edition : technique et documentation. LAVOISIER, p. 390-417.
- MORITZ B., STRIGEL K., GRAAF A-D. et SAHM H. (2000).** Kinetic proprietics of glucos-6-phosphate and 6 phospho-glutamate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *EUR. J. Biochem.*, vol. 267, p. 3442-3452.
- MOSSED D-A-A., CORRY J-E-L., STRUIJR C-B. et BAIRD R-M. (1995).** Essentials of the microbiology of foods. Edition: JOHN WILEY and SONS. New York, 15 p.
- MOUSSARD C. (2006).** Biochimie structurale et métabolique. Edition De Boeck Université, Bruxelles, 7 p.
- MULSKILKOVA M., NECASEK J., PLACHY J., LOKVENC F., CERKES L., (1966).** Isolation of glutamate producing bacterial strain. *FOLLA Microbial*, vol. 11, p. 301-303.
- NAGAHAMA T., FUGIMOTO S. et KANIG M. (1977).** Isolation of slime producing Corynebacterie and their bacteriological characteristics *Agrc. Biol. Chem.*, vol. 41, p. 9-16.
- NAKAYAMA K., (1976).** The production of amino acid.Pro. *Biochimie* vol. 12, p. 4-9.

- NAKAYAMA K. (1979).** Amino-acid fermentations In « APRIA: Microbiologie et Industries alimentaires ». Annales des congrès international. Paris, 7 au 12/10/1979. Tome III, p. 31-34
- NAKAYAMA K. (1982).** Amino-acids. In: Prescott and Dunn's industrial microbiology. (Reed G., Ed.) 4th Ed, p. 748-801.
- NAKAYAMA K. (1985).** Lysine Comprehension biotechnology. vol. 3, p. 607-690.
- NAKAYAMA K., KITADA S. et KINOSHITA S. (1977).** Studies on lysine fermentation. In: The control mechanism on lysine accumulation by homoserine and threonine. J.Gen. Microbiol., vol. 7, p. 145-154.
- NEIDHARDT F-C., INGRAHAM J-L. et SCHAECHTER M. (1994).** L'adaptation génétique: le génome et sa plasticité – les mutations. In : Physiologie de la cellule bactérienne ». Une approche moléculaire Edition : MASSON. Paris., Milan, Barcelone, p. 240-251.
- NIKOLAIV L. (1991).** Principe de la chimie physique des processus biologiques. Edition: MIR. Moscou, 159 p.
- OTHMER K. (1984).** Amino-acids, manufacture and processing. In: Encyclopedia of chemical technology. JOHN WILL. Y and SONS, eds., vol. 2, p. 397-406.
- PADIRAC D. (1985).** La biotechnologie des cellules domestiques. Chronique sociale. Lyon, 62 p.
- PASCAUD M. (1999).** Nutrition. In : Encyclopedia Universalis.p.2231-2234.
- PATUREAU MIRAND P. et RÉMOND D. (2001).** Viande et nutrition protéique une place confortée par les nouvelles connaissances. Science et Technique, Viandes Prod. Carnés vol. 22, n. 4, p. 103-107.
- PETSKO G-A. et RINGE D. (2009).** Structure et fonction des protéines. Edition : De Boeck, Bruxelles, 05 p.
- PLACHY J. (1984).** Amino acids. In: Modern biotechnology. Edited by: KRUMPHANZI, p. 667-717.
- PONS B-J. (1979).** Economy and engineering of amino-acids fermentation. In: microbiologie et industries alimentaires. APRIA. Paris, Tom. III, p. 45-53.
- PONS B-J., DUCHIRON F., DUPERRAY F., GUYONVARCH A., MELLAOUENE S. et MORE J. (1993).** Les Corynébactéries. In : Microbiologie industrielle (les microorganismes d'intérêt industriel). Techniques et documentation. LAVOISIER, p. 390-417.
- RADMACHER E., VATSIKOVA A., BURGER U., KRUMBACH K., SEHM H. et EGGELING L. (2002).** Linking central metabolism with increased pathway flux : L-valine. Accumulation by *Corynebacterium glutamicum* . Institut for biotechnology. Forshungszentrum, Germany, BIOTIKA, 976 p.

RASTEGARI H., CHIANI M., AKBARZADEH A., CHERAGHI S., SAFFARI Z., MEHRABI M-R., FARHANGI A. et GHASSEMI S. (2013). Improvement in the production of L-lysine by over-expression of Aspartokinase (ASK) in *C-glutamicum* ATCC 21799. Tropical Journal of Pharmaceutical. Pharmacotherapy Group, Faculty of Pharmacy, University of Benin, P.51.

RATH M. (2002). Avancée de la recherche cellulaire dans la lutte contre le cancer. 2^{ème} édition. Ed; MR Publishing B.V., P.31.

REHM H-J. et REED G. (1993). Biotechnology Verlag chemie. Gmhh , bioprocessig, vol. 3, 9p.

RICHTER W., HANEL F., HILLINGER H., (1985). Freeze fracture observations of *C. glutamicum* the occurrence of an outer membrane like structure and the influence of temperature on the cytoplasmic membrane. J. Basic microbial, vol. 25, n. 8, p. 527-536.

RIEGEL L-P. (1998). Les Corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques. Annales de biologie clinique. vol. 56, n. 3, p. 285-296.

RIVIERE J. (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. MASSON et C^{ie}. Paris, 166 p.

ROZIER J. (1985). Classification et principales caractéristiques des microorganismes des denrées alimentaires et d'origine animale. In : Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. Edition : SE PLAC. LAVOISIER, p. 85-87.

SAHM H., EGGELING L., ELKMANN B. et KRAMER R. (1995). Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS microbial. Rev., vol. 16, n. 213, p. 243-252.

SANO K. et SHIIO I. (1967). Microbiol production of L-lysine. In: Production by auxotrophe of *Brevibacterium flavum*. J. Gem. Appl. Microbiol., vol. 12, p. 349-359.

SASSON A. (1985). Les biotechnologies défis et promesses. UNESCO, 167 p.

SCRIBAN R. (1993). Biotechnologie. 4^{ème} édition, Edition : Technique documentation. LAVOISIER, p. 80-120.

SCRIBAN R. (1999). Biotechnologie, préface professeur Alain POMPIDOU, technique et documentation Paris. LAVOISIER, 5^{ème} édition : 119, 123, 158-160, 171-174.

SENEZ J-O-C. (1968). Microbiologie générale DOIN. Paris, p. 283-287.

SEVE. (2010). Les acides amines: Structures. Ed: Université Joseph Fourier de Grenoble, P.531.

SHAVER J-M., BITTEL D-C., SELINER J-M., FRISH D-F., SOMERS D-A., GENGENBACH B-G., (1996). Single amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of

maize dihydropicolinate synthase. Lysine biosynthesis / genetic complementation / mutagenic / Zen mayst / Feed back inhibition. Plant biology, USA, vol. 93, p. 1962-1966.

SHIIO I. (1982). Metabolic regulation and overproduction of amino acids. In: overproduction of microbiol products. p. 463-472.

SHIIO L. et NAKAMORI S. (1989). Coryneform bacteria. In: fermentation process developpement of industrial organisms.p.113-168.

SHIIO I., YOKOTA A., TARIDE Y., SUGIMOTO S., (1989). Threonine production by dihydroprotenate synthetase defective mutants . Agric. Biol. Chem., vol. 53, p. 41-48.

SHUKLA S-K., VEVEA D-N., FRAK D-N., PACE N-R. et REED K. (2003). Isolation and characterization of black pigmented *Corynebacterium Sp.* From a women with spontaneous abortion. **Journal of clinical microbiology**, vol. 39, n. 3, p. 109-113.

SING B-K. et SHANER D-L. (1995). Biosynthesis of branched main amino acids from test tube to fioeld plant cell. vol. 7, p. 935-944.

SINGLETON P. (1999). Biologie moléculaire II : modification du message. Les mutations. In : Bactériologie. Edition : DUNOD, 4^{ème} édition, p. 192.

SIMON J-L. (1995). Lysine. Ed ; Techniques de l'Ingénieur. Paris, 2 p.

SIMON J-L. (2004). Lysine. Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, 7 p.

SIRET C. (2002). Les composants chimiques des produits alimentaires .Ed : Techniques de l'ingénieur. Paris, P.11.

SMITH K-M., CHO K-M. et LIAO J-C. (2010). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. Appl Microbiol Biotechnol. 11 p.

STABLER N., OIKAWA T., BOTT M. et EGGELING L. (2011). *Corynebacterium glutamicum* a host for synthesis and export of D- amino-acids. *J. Bacteriol.*,**193**: 1702-1709.

STANIER RY., (1966). Microbiologie générale. Edition: Masson, Paris.

SU Y. et YAMADA K. (1960). Studies on L-glutamic acids fermentation Part I: Isolation of glutamic acids producing strain and it taxonomical studies.Bull . Agric. Chem. Japon, vol. 24 n° 1, p. 69-74.

TAUCH A., GOTHKER S., PÜCHIER A., KALINOWSKI J. et THIERBACH G. (2002). The alanine racemase gene at is an alternative to antibiotic resistance genes. In: Cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. p. 80-83.

TOME D., (1999). Les besoins en acides aminés indispensables et la qualité des protéines alimentaires. Centre de recherche et d'information nutritionnelle, cholé-doc, AgroParisTech. p 6.

TOME D. (2008). Rapport protéines AFSSA. L'aliment de demain, le pôle de compétitivité agroalimentaire VALORIAL, France. 5 p.

TOME D. (2009). Besoins en protéines et en acides aminés et qualité des protéines alimentaires. Centre de recherche et d'information nutritionnelle, cholé-doc, AgroParisTech. 6p.

TORTORA G-J., CASE C-C., FUKU B-R. et MARTIN L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique, INC , Canada: 131, 132, 864.

TOSAKA O. et TAKINAMI K. (1986). Lysine Prog. Ind. Microbial, vol. 24, p. 152-172.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH (2013) . Lysine and other amino acids (methionine, threonine and tryptophan) market by application (animal feed & dietary supplements, pharmaceuticals) by livestock (swine, poultry, others) - global, size, share, growth, trends and forecast 2012- 2018.

<http://www.transparency market research . com/lysine-aminoacids.html>

TRYFONA T. et BUSTARD M-T. (2005). Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum* : Transmembrane transport and metabolic flux analysis. Process biochemistry, P.500-505.

UDAKA S. (2008). The Discovery of *Corynebacterium glutamicum* and Birth of Amino Acid Fermentation Industry in Japan BURKOVSKI A.. Edition: Caister Academic Press, Norfolk UK ; British. P: 1.

VERTÈS A-A., INUI M. et YUKAWA H. (2013). The Biotechnological Potential of *Corynebacterium glutamicum*, from Umami to Chemurgy In YUKAWA H., INUI M., «*Corynebacterium glutamicum*: Biology and Biotechnology». Springer Heidelberg. New York, P.4.

VOET D. et VOET J.G. (1998). Biochimie. Ed. De Boeck Université, 193, 197, 210.

WALRAND S.(2003). Impacts physiologiques et cellulaires des acides aminés. Clermont-Ferrand, p. 75-79.

WEIL J.H. (1994) . Biochimie générale. Ed. MASSON, 216, 257, 328.

WITTMANN C. et BECKER J. (2007). The L-lysine story : From metabolic pathways to industrial production ; in ; WENDISCH « Amino acid biosynthesis-pathways, regulation and metabolic engineering ». Edition : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. P : 41.

YAMADA K. et KOMAGATA K. (1972). Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18: pp. 417–431.

YUKAWA H. et INUI M. (2013). Cell Division Mechanism of *Corynebacterium glutamicum*. Edition: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. P: 194.

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Les besoins de l'enfant et de l'adulte en acides aminés indispensables (mg/kilocalorie/jour)	9
2	Principales firmes de production des acides aminés par fermentation	15
3	La production mondiale (en tonnes) d'acides aminés par fermentation en 2007, 2011 et les perspectives en 2015	15
4	Principales utilisations des acides aminés	16
5	Evaluation biologique de la fortification des acides aminés des céréales	18
6	Exemple d'utilisation pratique de la L-Lysine-HCl dans les aliments composés	21
7	Production mondiale des principaux acides aminés et les méthodes de leur production	30
8	Caractéristiques communes aux corynébactéries productrices d'acides aminés	36
9	Caractéristiques variables chez les corynébactéries productrices d'acides aminés	37
10	Actinomycètes groupe supra-génériques et principaux genres	39
11	Composition du milieu semi-synthétique M ₁ et M ₂	68
12	Composition en g/l des milieux solides complexe et minimum utilisés pour l'isolement des colonies	79
13	Composition des milieux de fermentation + 1 seul acide aminé	83
14	Composition des milieux de fermentation + 2 acides aminés	83
15	Composition des milieux de fermentation + 3, 4, 5 acides aminés	84
16	Distribution des souches isolées dans les substrats utilisés	99
17	Acides aminés produits par les souches sélectionnées dans les milieux M ₁ et M ₂	102
18	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées	104
19	Nombre de colonies des mutants pour les dilutions des trois erlens	111

20	Résultats de la mutation et de la sélection	115/116
21	Nombre de mutants obtenus pour chaque type d'auxotrophe	118
22	Sites de mutation et acides aminés produits par dix huit (18) mutants auxotrophes obtenus	155/156
23	Groupes de mutants auxotrophes obtenus selon acides aminés produits	157
24	Demande en précurseurs pour la biosynthèse des macromolécules constituant la cellule	189/190

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Structure générale des acides aminés	8
2	Biosynthèse des différentes familles d'acides aminés	49
3	Voies métaboliques de la biosynthèse de l'acide glutamique à partir du glucose	50
4	Biosynthèse de la leucine, valine et isoleucine	51
5	Schéma de biosynthèse de l'aspartate chez les bactéries	53
6	Voie de biosynthèse des acides aminés de l'aspartate	54
7	Rétro inhibition simple chaîne	56
8	Rétro inhibition covalente ou concertée	57
9	Rétro inhibition cumulative ou coopérative	57
10	Rétro inhibition par isoenzymes	58
11	Rétro inhibition séquentielle	58
12	Rétro inhibition plus activation	59
13	La perméabilité cellulaire de l'acide glutamique en relation avec le contenu de la membrane en phospholipides	60
14	Voies métaboliques et régulation de la biosynthèse des acides aminés de la famille de l'acide aspartique	63
15	Incubation sur Shaker	76
16	Schéma de la dilution	77
17	Schéma explicatif de la méthode des matrices	78
18	Schéma de la méthode de répliquat	81
19	Schéma explicatif de la stabilisation des mutants	82
20	Courbe d'étalonnage de turbidimétrie	88
21	Courbe d'étalonnage de glucose	89
22	Courbe d'étalonnage de la lysine	91

23	Coloration de Gram d'une des souches isolées	100
24	Classification des 18 souches isolées	108
25	Colonies des mutants obtenus après application de la méthode des matrices	110
26	Développement des mutants de <i>C.glutamicum</i> sur milieu complexe	113
27	Absence de colonies de mutants de <i>C.glutamicum</i> sur milieu minimum	113
28	Quelques types de mutants auxotrophes obtenus après induction par l'Ethyl Méthane Sulfonate (EMS)	114
29	Régulation de la voie de biosynthèse de l'isoleucine chez un mutant exigeant en valine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	120
30	Régulation de la voie de biosynthèse de l'isoleucine chez un mutant exigeant en alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	122
31	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant exigeant en méthionine de <i>C.gluamicum</i>	124
32	Régulation de la voie de biosynthèse de l'homoserine et la lysine chez un mutant exigeant en thréonine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	126
33	Régulation de la voie de biosynthèse de la valine, de la méthionine et de la lysine chez un mutant thréonine ⁽⁻⁾ , alanine ⁽⁻⁾ de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	128
34	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant double auxotrophe à la thréonine et la méthionine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	130
35	Régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et la lysine chez un mutant exigeant en thréonine et valine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	132
36	Régulation de la voie de biosynthèse de la leucine, la valine, et de la lysine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et la thréonine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	134
37	Régulation de la voie de biosynthèse de la valine, la leucine et de la thréonine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et à l'alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	136
38	Régulation de la voie de biosynthèse de la méthionine et la thréonine chez un mutant double auxotrophe à l'isoleucine et la valine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	138
39	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant exigeant en méthionine et en l'alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	140
40	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine et la méthionine chez un mutant double auxotrophe à la valine et à l'alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	142
41	Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine et alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	144
42	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine, chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine et valine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	146
43	Régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez un mutant exigeant en méthionine, valine et isoleucine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	148

44	Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine et l'isoleucine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	150
45	Régulation de la voie de biosynthèse de lysine et de la méthionine chez un mutant exigeant en thréonine, valine, isoleucine et alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	152
46	Régulation de la voie de biosynthèse de lysine chez un mutant exigeant en thréonine, méthionine, valine, l'isoleucine et alanine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	154
47	La cinétique de croissance des souches sauvage et mutée	159
48	Taux de croissance des souches sauvage et mutée	160
49	Consommation de glucose par les deux souches	162
50	Dosage de la lysine produite par la souche mutée	163
51	Résultats du dosage de lysine, du glucose, du pH et de la biomasse	164
52	Résultats du dosage de lysine, du saccharose, du pH et de la biomasse	165
53	Résultats de dosage de lysine, de glucose et biomasse dans le 1 ^{er} milieu	167
54	Résultats de dosage de lysine, de glucose, biomasse et l'acétate dans le 2 ^{ème} milieu	168
55	Résultats de dosage de biomasse, lysine et acétate	169
56	Résultats de dosage de biomasse, de lysine et de l'acétate dans le 4 ^{ème} milieu	170
57	Résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 0,5g/l d' NaCl pour la souche mutée	171
58	Résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 0,5g/l d' NaCl pour la souche sauvage	171
59	Résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1g/l d' NaCl pour la souche mutée	172
60	Résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1g/l d' NaCl pour la souche sauvage	173
61	les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1,5g/l d' NaCl pour la souche mutée	173
62	les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 1,5g/l d' NaCl pour la souche sauvage	174
63	les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 2 g/l d' NaCl pour la souche	175

	mutée	
64	les résultats de la consommation de glucose, l'évolution de la biomasse et la production de lysine sur le milieu contenant 2 g/l d' NaCl pour la souche sauvage	175
65	Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 1 ^{er} milieu	177
66	Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 2 ^{ème} milieu	178
67	Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 3 ^{ème} milieu	180
68	Régulation de la biosynthèse de la L-lysine chez <i>Corynebacterium glutamicum</i>	181
69	Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 4 ^{ème} milieu	182
70	Résultats de dosage de lysine, de glucose, du pH et de biomasse dans le 5 ^{ème} milieu	183
71	Effet de la thréonine et de la méthionine sur la croissance et la production de la lysine d'un mutant auxotrophe homoserine (-) de <i>C.glutamicum</i> après 50 heures de culture	184
72	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu sans lysine	185
73	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 10 g/l de lysine	186
74	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 20 g/l de lysine	186
75	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 30 g/l de lysine	187
76	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 40 g/l de lysine	188
77	Résultats du dosage de lysine et de la consommation de glucose dans le milieu contenant 50 g/l de lysine	188
78	Calcul du flux sur glucose	191
79	Profile de la production de lysine par la souche mutée de <i>C.glutamicum</i> cultivée en erlens	195
80	Estimation des rendements en lysine par l'utilisation de l'approche de la balance de flux stœchiométrique de <i>C.glutamicum</i>	197

Communications orales:

-**Trad Khodja D.**, Hellal-Benataya A. et Lindley N.(2008).Production de lysine par un mutant auxotrophe de *Corynebacterium glutamicum* sur milieu à base d'acide acétique.1^{ères} journées Algéro-Tunisiennes de Microbiologie, Tébessa,18-19 Mai 2008.

-**Trad Khodja D.**, Hellal-Benataya A. et Lindley N.(2008).Effets inhibiteurs de l'addition de lysine sur la productivité *Corynebacterium glutamicum*.1^{er} Séminaire National sur les Bioprocédés , SNBP1,Médéa,12-13 Octobre 2008.

-**Trad Khodja D.**et Hellal-Benataya A.(2008).Influence de la composition du milieu et des conditions de culture sur la production de lysine par une souche auxotrophe de *Corynebacterium glutamicum*.XIV^{èmes} Journées nationales de Microbiologie,Tlemcen,11-12 Novembre 2008.

-Kehal F.,Hamidi L., Chemache L. et **Trad Khodja D.**(2013).Contribution à l'étude de l'influence de la mutation sur le taux de croissance de *Corynebacterium glutamicum*.5^{ème} congrès Maghrébin de génie des procédés, Boumerdès,2-4 Juin 2013.

Communications affichées:

-**Trad Khodja D.**et Hellal-Benataya A.(2007).Induction de mutants de *Corynebacterium glutamicum*
Colloque international de Biotechnologie "BioTech World 2007", Oran, 24-25 Novembre 2007.

-**Trad Khodja D.**et Hellal-Benataya A.(2008).Isolement et caractérisation de souches bactériennes productrices d'acide glutamique. Séminaire International « La Biotechnologie au service du secteur Agro-alimentaire », Blida, 17-18 Juin 2008.

-Kehal F.,Hamidi L., Chemache L. et **Trad Khodja D.**(2012).Contribution à l'étude de l'influence de la mutation sur le taux de croissance de *Corynebacterium glutamicum*.23^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologies de l'association tunisienne des Sciences Biologiques, (ATSB),Hammamet,Tunisie.

-Boudechicha H.R., Guemra I. et **Trad Khodja D.**(2014).Etude de l'effet de l'acétate d'ammonium sur la productivité d'un mutant auxotrophe de *Corynebacterium glutamicum* homoserine⁻ produisant de la lysine.Séminaire International sur les Sciences Alimentaires,Constantine,14-16 Octobre 2014

Résumé :

Les souches bactériennes de *Corynebacterium glutamicum* isolées à partir de différents milieux naturels ont d'abord été sélectionnées pour leur capacité à accumuler l'acide glutamique et ensuite soumis à l'action de l'EMS, (Ethyl Methane Sulfonate), agent mutagène chimique.

Les souches ont été ensuite sélectionnées pour leur auxotrophies à des acides aminés et de leurs capacités à produire d'autres acides aminés (en particulier la lysine).

Une souche, initialement, isolé à partir des excréments d'oiseaux et ayant une double auxotrophie pour la thréonine et la méthionine a donc été sélectionné et retenu pour la caractérisation quant à sa capacité de produire des quantités importantes de lysine.

Le taux de croissance de la souche mutée a été d'environ la moitié de celle de la souche mère, mais a accumulé la lysine comme métabolite principal tout au long de la croissance. Les concentrations finales en lysine sont d'environ 50 g / L, sur milieu à base de glucose montrant la limite de production de la souche qui est directement liée à la concentration de la lysine maximale pouvant être produite par cette souche.

Le glucose a été montré pour être la meilleure source de carbone alors que le saccharose a montré une capacité similaire mais avec une consommation de sucre et une accumulation de lysine légèrement plus faible. L'utilisation de l'acétate a donné lieu à des performances de fermentation relativement pauvres.

L'analyse stoechiométrique des flux métaboliques a été étudié afin d'examiner les influences des flux du métabolisme central sur les rendements en acides aminés.

Une telle analyse montre que les rendements de lysine, basés sur les taux déterminés expérimentalement de la consommation de sucre, la production de lysine et l'optimisation spécifique de taux de croissance, étaient proches des niveaux maximaux qui peuvent être attendus.

En effet, les rendements de récupération de carbone avoisinent les 30% ce qui se rapprochent des rendements escomptés pour la souche lorsque on utilise les taux de croissance et de consommation de substrat prédéfinis

L'utilisation de l'analyse des flux stoechiométriques nécessite toujours la fixation de certaines variables, à savoir la vitesse de consommation du substrat qui doit être constante à tous les taux de croissance théoriques testés (valeur observée dans la souche mutée).

Si les rendements sont acceptables et qu'ils peuvent être encore améliorés par des un utilisation appropriée de fermentation en fed-batch dans laquelle le taux de croissance peut encore être diminué tout en maintenant la vitesse de consommation de sucre. Cependant, le développement est nécessaire pour améliorer les concentrations finales de lysine qui sont encore relativement faible par rapport aux souches industrielles actuellement exploités. Ils sont cependant plutôt prometteur pour une souche ayant subi un seul tour de mutation.

La souche est donc un producteur de lysine relativement efficace dont la valeur biotechnologique pourrait être encore améliorée par des stratégies de sélection par des mutations supplémentaires afin de mettre en valeur une source non-OGM de l'alimentation et de ce fait améliorer la production de volaille.

Mots clés : *Corynebacterium glutamicum*, souche productrice de lysine, mutation, analyse des flux métaboliques, aliment de bétail.

Abstract:

Bacterial strains of *Corynebacterium glutamicum* isolated from various natural environments were initially selected for their capacity to accumulate glutamic acid and then subjected to EMS (Ethyl Methan Sulfonate), chemical mutagenesis.

Strains were then selected for amino acid auxotrophies and their capacities to produce other amino acids (notably lysine) were examined.

A strain initially isolated from bird droppings and having a double auxotrophy for threonine and methionine was thus selected and retained for characterization as to its capacity to produce significant amounts of lysine.

This strain grew at rates approximately half that of the parent strain but accumulated lysine as a primary metabolite throughout growth. Final concentrations of approximately 50 g/L lysine could be produced on glucose medium and this fermentation limit was shown to be directly related to the end concentration of lysine.

Glucose was shown to be the best carbon source though sucrose showed similar capacity albeit with slightly diminished rates of sugar consumption and lysine accumulation. Acetate gave only relatively poor fermentation performance.

Stoichiometric metabolic flux analysis can be examined to see how flux through central metabolism influences amino acid yields. When used here such an analysis shows that the lysine yields, based on experimentally determined rates of sugar consumption, lysine production and specific growth rate optimization, and were close to the maximal levels which can be expected. Indeed carbon recovery yields are close to 30% which is basically the yields predicted for the strain when growth rate and substrate consumption rates are used. Such calculations of stoichiometric flux analysis need always to fix certain variables: substrate uptake rate was assumed to be constant at all theoretical growth rates tested (value observed in that mutant strain).

If yields are acceptable they could be further improved by appropriate fed-batch fermentation strategies in which growth rate was further diminished assuming that sugar uptake can be maintained. However, further development is necessary to improve the final concentrations of lysine which are still relatively low compared to currently exploited industrial strains.

They are however rather promising for a strain having undergone a single round of mutation. The strain is therefore a relatively efficient lysine producer whose biotechnological value could be further improved by additional mutational selection strategies to facilitate a non-OGM source of feed for improving poultry production.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, lysine production strain, mutational selection, stoichiometric flux analysis, animal feed